

**UNICESUMAR – CENTRO UNIVERSITÁRIO DE MARINGÁ**  
**PROGRAMA DE MESTRADO EM TECNOLOGIAS LIMPAS**

**INDUÇÃO ARTIFICIAL DE LACTAÇÃO EM BOVINOS:  
SEGURIDADE ALIMENTAR E SUSTENTABILIDADE NA CADEIA  
PRODUTIVA DO LEITE**

MARIANA LUÍSA CHIEZI DE OLIVEIRA

MARINGÁ  
2020

**UNICESUMAR – CENTRO UNIVERSITÁRIO DE MARINGÁ**  
**PROGRAMA DE MESTRADO EM TECNOLOGIAS LIMPAS**

**INDUÇÃO ARTIFICIAL DE LACTAÇÃO EM BOVINOS:  
SEGURIDADE ALIMENTAR E SUSTENTABILIDADE NA CADEIA  
PRODUTIVA DO LEITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas do Centro Universitário de Maringá (UniCesumar), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologias Limpas.

Linha de pesquisa: Agroindústria e Agropecuária sustentável

Orientadora: Profa. Dra. Isabele Picada Emanuelli

Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Aparecida Andreazzi

MARINGÁ

2020

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

O48i Oliveira, Mariana Luísa Chiezi de.  
Indução artificial de lactação em bovinos: seguridade alimentar e sustentabilidade na cadeia produtiva / Mariana Luísa Chiezi de Oliveira. – Maringá-PR: UniCesumar, 2020.  
51 f. : il. color ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Isabele Picada Emanuelli.  
Coorientadora: Prof. Dra. Márcia Aparecida Andreazzi.  
Dissertação (mestrado) – UNICESUMAR - Centro Universitário de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas, 2020.

1. Cadeia produtiva leiteira. 2. Detecção hormonal. 3. Lactação induzida. 4. Metabolômica. 5. Segurança alimentar. I. Título.

CDD – 636.2142  
CDD 22.ed

**MARIANA LUÍSA CHIEZI DE OLIVEIRA**

**INDUÇÃO ARTIFICIAL DE LACTAÇÃO EM BOVINOS: SEGURIDADE  
ALIMENTAR E SUSTENTABILIDADE NA CADEIA PRODUTIVA DO  
LEITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas do Centro  
Universitário de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em  
Tecnologias Limpas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

**COMISSÃO JULGADORA**

---

Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau  
Universidade Estadual de Maringá (1º membro)

---

Prof. Dr. Fábio Luiz Bim Cavalieri  
Centro Universitário de Maringá (2º membro)

---

Profª. Dr. Isabele Picada Emanuelli  
Centro Universitário de Maringá (Presidente)

Aprovado em: 28 de fevereiro de 2020.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.  
Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se  
plantou;

Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;

Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;

Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se  
de abraçar;

Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;

Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;

Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.”

Eclesiastes 3:1-8

Ao meu avô, que hoje está no céu, por ser meu intercessor nesta jornada.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, primeiramente, pelas bênçãos e inspirações recebidas diariamente. E à Nossa Senhora, por passar na frente, abrindo estradas e caminhos, portas e portões, casas e corações.

Aos meus pais Sérgio e Mercia, e à minha irmã Beatriz, por todo acalento, suporte, escuta, orações e paciência. Sem vocês, nada seria possível.

A toda minha família, responsáveis por tudo que sou e pela felicidade que tenho.

Ao meu namorado Gustavo, por toda compreensão e por ser um grande incentivador durante todos esses anos.

À minha orientadora, professora Dra. Isabele Picada Emanuelli, pelos ensinamentos que levarei para a vida toda, pela parceria e por todo tempo que dedicou a me auxiliar. A você, toda minha admiração.

Aos meus amigos Carol e Adriano, parceiros do mestrado e da vida. Agradeço pelo companheirismo, pela empatia, pelos conselhos e por todos os momentos de desabafo e acolhimento.

Agradeço à Nathalia, Adriana, Victória, Ângela e Milene por todo apoio no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas do Centro Universitário de Maringá e a todos os professores que dedicaram seu tempo a me passar conhecimento. Em especial à minha coorientadora, Prof. Márcia Aparecida Andreazzi, e aos professores José Eduardo Gonçalves e Fábio Bim, que somaram positivamente na realização deste trabalho.

À Fazenda Unicesumar, que viabilizou o experimento, cedendo espaço e animais para o estudo.

Ao Laboratório de Biomoléculas e Espectrometria de Massas (LaBioMass) do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, em especial aos professores Eduardo Pilau e Carla Porto, e à Cler, pelo auxílio na condução e realização das análises.

À CAPES, pelo apoio financeiro, com a manutenção da bolsa que possibilitou os estudos e pesquisa.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1 OBJETIVOS.....	15
1.1.1 Objetivo geral.....	15
1.1.2 Objetivos específicos.....	15
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1 SUSTENTABILIDADE NA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA DE ORIGEM ANIMAL.....	16
2.2 CADEIA PRODUTIVA DE LEITE.....	18
2.3 LEITE BOVINO.....	19
2.4 PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE LACTAÇÃO.....	21
2.5 ANÁLISE DE RESÍDUOS NO LEITE.....	22
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>24</b>
<b>3. ARTIGO.....</b>	<b>31</b>
<b>4. NORMAS DO ARTIGO.....</b>	<b>48</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>50</b>



## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Modelo P triplo. Demonstração dos três pilares da sustentabilidade, com suas respectivas prioridades, assim como as interligações existentes entre os três, necessárias para atingir a sustentabilidade.....17

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Composição média em 100 g do leite bovino .....	19
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANVISA</b>	Agência nacional de vigilância sanitária
<b>BPP</b>	Boas práticas de produção
<b>bST</b>	Somatotropina bovina
<b>CG</b>	Cromatógrafo gasoso
<b>CLAE</b>	Cromatógrafo líquido de alta especificidade
<b>ODS</b>	Objetivos do desenvolvimento sustentável
<b>ONU</b>	Organização das Nações Unidas
<b>P<sub>4</sub></b>	Progesterona

## RESUMO

A lactação fisiológica só se efetiva quando há gestação. Na ocorrência de falhas reprodutivas não ocorrerá a subsequente produção de leite. Em se tratando de animais de alta produção, isso gera declínio na produção de leite, aumenta o intervalo entre partos e o descarte precoce de animais. Como alternativa, existem os protocolos de indução de lactação artificial compostos por combinações hormonais, simulando os períodos finais da gestação. Embora estes protocolos possam favorecer economicamente a cadeia produtiva leiteira, existem pontos a serem investigados relacionados a sustentabilidade e a segurança alimentar. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo investigar os resíduos hormonais exógenos em leite de vacas submetidas ao protocolo de lactação induzida e realizar uma análise exploratória dos metabólitos comparando-os com o leite de lactação fisiológica. O estudo exploratório ocorreu na fazenda do Centro Universitário de Maringá/UNICESUMAR, utilizou um total de 4 vacas, sendo 2 submetidas ao protocolo hormonal e 2 com lactação fisiológica. O protocolo aplicado foi composto pelos hormônios: bST (500mg) a cada 7 dias, BE (30ml) por 8 dias e (20ml) por mais 6 dias, P<sub>4</sub> (2ml) por 8 dias, DEX (40ml) nos 3 dias que antecedem a ordenha e Cloprostenol (2ml) no dia anterior ao início da adaptação na ordenha. As amostras foram coletadas nos dias 0 (início da ordenha), 1, 7, 10 e 24. Foram coletadas amostras de leite de lactação fisiológica, de lactação induzida e do tanque de resfriamento. As amostras passaram por um processo de extração e foram analisadas por UHPLC-MS/MS para detecção hormonal e metabolômica. Não foram detectados resíduos de P<sub>4</sub> em nenhuma das amostras analisadas. O BE foi detectado apenas no leite induzido no D0. Já o DEX foi detectado em todos os dias de coleta nas amostras de leite induzido e do tanque de resfriamento. A metabolômica identificou 39 metabólitos nas amostras dos 3 grupos, sendo que 21 não estavam presentes no leite controle. O leite produzido por lactação induzida possui a presença de vários metabólitos distintos do leite fisiológico. A detecção hormonal e/ou a identificação de metabólitos associados devem ser levados em conta para aplicação em novos estudos, pois as alterações fisiológicas/patológicas são importantes informações para tomadas de decisões quanto ao período de carência, a segurança do bem-estar do animal, para a qualidade e segurança do leite, bem como para a sustentabilidade da cadeia produtiva do leite.

**Palavras-chave:** Cadeia produtiva leiteira, detecção hormonal, lactação induzida, metabolômica, segurança alimentar.

## ABSTRACT

Physiological lactation is only effective when there is pregnancy. In the event of reproductive failures, subsequent milk production will not occur. In the case of high production animals, this causes a decline in milk production, increases the interval between births and the early disposal of animals. Alternatively, there are protocols for inducing artificial lactation composed of hormonal combinations, simulating the final periods of pregnancy. Although these protocols can economically favor the dairy production chain, there are points to be investigated related to sustainability and food security. Therefore, this work aimed to investigate the exogenous hormonal residues in milk of cows submitted to the induced lactation protocol and to carry out an exploratory analysis of the metabolites comparing them with the physiological lactation milk. The exploratory study took place on the farm of the Centro Universitário de Maringá / UNICESUMAR, used a total of 4 cows, 2 of which were submitted to the hormonal protocol and 2 with physiological lactation. The applied protocol consisted of the hormones: bST (500mg) every 7 days, BE (30ml) for 8 days and (20ml) for another 6 days, P4 (2ml) for 8 days, DEX (40ml) in the 3 days preceding milking and Cloprostenol (2ml) the day before the start of adaptation in milking. Samples were collected on days 0 (start of milking), 1, 7, 10 and 24. Samples of physiological lactation, induced lactation and cooling tank were collected. The samples went through an extraction process and were analyzed by UHPLC-MS / MS for hormonal and meta-economical detection. P4 residues were not detected in any of the analyzed samples. BE was detected only in milk induced in D0. DEX was detected on all collection days in the samples of induced milk and the cooling tank. The metabolomics identified 39 metabolites in the samples of the 3 groups, 21 of which were not present in the control milk. Milk produced by induced lactation has the presence of several metabolites distinct from physiological milk. Hormonal detection and / or the identification of associated metabolites must be taken into account for application in new studies, as physiological / pathological changes are important information for decision making regarding the grace period, the safety of the animal's well-being, for the quality and safety of milk, as well as for the sustainability of the milk production chain.

**Keywords:** Dairy production chain, hormonal detection, induced lactation, metabolomics, food security.

## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial juntamente com o aumento da globalização influencia diretamente na sustentabilidade, principalmente das cadeias produtivas de alimentos de origem animal. Isso ocorre devido aos impactos socioambientais causados pela pecuária (GOVINDAN, 2018). Em especial na criação de bovinos, têm-se os seguintes aspectos impactantes: alto consumo de recursos e de energias não renováveis, emissões de gases de efeito estufa, elevada geração de dejetos e manejo sanitário negligente com os animais. Portanto, investimentos em pesquisas precisam ser realizados para melhorar a produtividade, assegurar a segurança alimentar e a sustentabilidade em seus três pilares dentro de todas as fases da cadeia (ZOCCA et al., 2018; ENAHORO et al., 2019).

O desenvolvimento sustentável é discutido mundialmente e caracteriza-se como uma reorganização de ideias e práticas que promoverão segurança para as gerações futuras. A agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU) propõe um plano de ação com 17 objetivos do desenvolvimento sustentável (ODS) (SILVESTRE; TIRCA, 2019). Em relação à pecuária, a agenda dispõe de 2 objetivos específicos que asseguram a sustentabilidade e a segurança na produção de alimentos, sendo eles: (2) erradicar a fome - acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável; (12) consumo e produção responsáveis - assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis (FAO, 2018).

Dentre os diversos setores da pecuária, destaca-se a cadeia produtiva leiteira, conhecida pela geração de impactos ambientais e sociais. Esta cadeia, é responsável por mais de 15% das emissões de gases de efeito estufa da atividade pecuária, o que contribui para as mudanças climáticas (NOYA et al., 2018; RAFIEE et al., 2016). Possui consumo de grande quantidade dos grãos produzidos, competindo com a alimentação humana (PAOLA; RULLI, SANTINI, 2017; MOTTET et al., 2017). Gera elevado volume de dejetos, impactando o solo e a água (LAUER et al., 2018). Além disso, a administração de fármacos no rebanho e o manejo do mesmo geram preocupações quanto a qualidade do leite (GARCIA; OSBURN; CULLOR, 2019).

O consumo de lácteos vêm crescendo concomitantemente com o interesse pela qualidade dos alimentos e, com isso, os pecuaristas enfrentam o desafio de aumentar a produção, entregar um produto dentro dos padrões de segurança alimentar, porém impactando minimamente o ambiente (ZHANG et al., 2018; GROSS; BRUCKMAIER, 2019). A preocupação com a qualidade do leite deve-se ao seu elevado teor de gordura, açúcares e proteína, o que

dificulta o processo de análises químicas. Além disso, sabe-se que alguns dos possíveis resíduos são de alta estabilidade térmica, resistentes aos processos de pasteurização (WANG et al., 2015).

Apesar dos pontos negativos da cadeia, o leite bovino é um alimento nutricionalmente completo, fonte de proteína, vitaminas e minerais essenciais em todas as fases da vida (SILVA; KANUGALA; WEERAKKODY, 2016). Além de desempenhar uma função importante no fornecimento de nutrientes e energia, são fontes densas de calorias e de bactérias benéficas para o intestino, gerando efeitos positivos na saúde (GARCIA; OSBURN; CULLOR, 2019). Todos os alimentos de origem láctea possuem também o papel de aliados do sistema imunológico, atuando na prevenção de doenças crônicas, cardiovasculares e virais, sendo inclusive fonte de compostos antirotavirais (PARRÓN et al., 2018).

Mais recentemente, inseriu-se tecnologias avançadas baseadas no conceito de “*foodomics*” para aumentar a sustentabilidade na produção de alimentos. Este campo emergente da biologia compreende em estudos com finalidade de elucidar os mecanismos envolvidos nos processos biológicos que possuem sufixo omics, tais como genômica, transcriptômica, proteômica ou metabolômica (SUN; GUAN, 2018). Em especial a metabolômica, analisa um conjunto de metabólitos que representam os produtos finais do genoma, transcriptoma e proteoma que refletem no fenótipo, estes podem servir para avaliar a produtividade animal, a qualidade dos alimentos, a segurança para saúde e o bem-estar dos animais (BÖHME et al., 2019).

Assim como nos humanos, a lactação em vacas é um processo endócrino e exócrino complexo, dependendo de diversos hormônios para a secreção em quantidade e qualidade adequadas. A lactação fisiológica só se efetiva quando ocorre a gestação, portanto o processo de lactação possui dependência com o sistema reprodutivo (TRUCHET; HONVO-HOUÉTO, 2017). Por conseguinte, se ocorrem problemas reprodutivos no animal, não ocorrerá a subsequente produção de leite. Em se tratando de animais de produção, isso gera declínio nos índices produtivos, prejudicando o laticínio (KERSLAKE et al., 2018).

Para solucionar este problema frequente (KERSLAKE et al., 2018), ocorrido em decorrência da ausência gestacional, desenvolveu-se ao longo dos anos um protocolo de indução de lactação composto por combinações hormonais, simulando os períodos finais da gestação (AKERS, 2017). Este protocolo começou a ser aplicado comercialmente na última década em animais de alta produção leiteira. O método é economicamente viável em vacas de alta produção, pois induz a secreção de leite entre 50 a 80% da produtividade anterior do animal (KENSINGER, 2016; LAKHANI et al., 2017).

O protocolo de indução de lactação é uma tecnologia que favorece economicamente a cadeia produtiva leiteira, porém é importante investigar se ele não interfere na segurança alimentar nem na sustentabilidade (BRUL, 2016). Para garantir a segurança alimentar torna-se indispensável a utilização de métodos analíticos confiáveis que identifiquem elementos envolvidos em qualquer etapa do fluxo de informações genéticas: DNA, RNA, proteínas e metabólitos, ou seja, as análises ômicas (SUN; GUAN, 2018).

Contudo, constam na literatura apenas investigações que abordam os tipos de protocolos hormonais, as vantagens econômicas (AKERS, 2017) e os aspectos básicos de qualidade do leite. Os estudos sobre a aptidão para o consumo humano de leite produzido por indução artificial classificam este leite como similar ao de uma lactação fisiológica (KENSINGER, 2016) não investigando possíveis alterações moleculares ocasionadas por interferências metabólicas induzidas pelo protocolo hormonal.

É importante destacar ainda as limitações dos protocolos indutores de lactação relacionadas principalmente ao elevado manejo do animal, a qualidade zootécnica, sanitária e nutricional dos animais, e ao bem-estar dos mesmos (PESTANO et al., 2015). Sabe-se que os hormônios podem alterar a expressão de genes, a sinalização e as vias metabólicas nas células, o que posteriormente altera o status fisiológico e, finalmente, leva a diferentes fenótipos (FAUDEUR et al., 2018), no caso específico deste estudo, o leite.

Baseado na problemática apresentada dos protocolos de indução de lactação e no surgimento das análises de alimentos altamente precisas multi-ômicas, percebe-se a existência de uma lacuna do conhecimento sobre a caracterização molecular do leite gerado por indução artificial. Tal pesquisa poderia diagnosticar um perfil quanto os aspectos de segurança para o consumo e de sustentabilidade socioambiental da aplicação deste protocolo na produção leiteira, contribuindo para tomadas de decisões mais cautelosas quanto a qualidade do alimento, ao bem-estar animal e ao desenvolvimento sustentável na indústria de laticínios.



## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Investigar os resíduos hormonais exógenos em leite de vacas submetidas ao protocolo de lactação induzida e realizar uma análise exploratória dos metabólitos comparando-os com o leite de lactação fisiológica.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Adaptar a metodologia de detecção hormonal no leite por UHPLC-MS/MS
- Realizar um diagnóstico da presença de resíduos hormonais no leite de vacas submetidas a indução de lactação e comparar com o leite de lactação fisiológica.
- Determinar o período de carência dos hormônios encontrado e comparar com o preconizado na bula dos laboratórios.
- Adaptar a metodologia de metabolômica em amostras de leite
- Realizar uma análise exploratória dos metabólitos produzidos no leite de lactação induzida e comparar com os metabólitos de lactação fisiológica.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 SUSTENTABILIDADE NA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA DE ORIGEM ANIMAL

Com o crescimento populacional, a melhora no padrão mundial de vida e o consequente aumento da demanda alimentar, a terra, a água, o clima e a biodiversidade foram afetados em uma tentativa de suprir as necessidades da população (ROJAS-DOWNING et al., 2017). A busca por estratégias para aumento de produção sem degradação do ambiente se torna tema de grande relevância na atualidade. Os desafios de segurança alimentar e sustentabilidade ambiental estão conectados e precisam ser solucionados juntos, com adequações de produtividade, das dietas e emergencial redução de desperdício, para sanar o problema da desnutrição que atinge um bilhão de pessoas no mundo, poupando os recursos naturais (RAFIEE et al., 2016).

O hábito de inserir ingredientes de origem animal na dieta humana é criticado, entre outros motivos, por seu relativamente alto impacto ambiental (VAN HAL et al., 2019). Sabendo-se que o setor agropecuário de produção de alimentos consome 30% da energia elétrica distribuída no mundo e que existe uma grande dependência econômico-energética, torna-se indispensável que a extensão rural leve conhecimento acerca das energias renováveis até os produtores, proponha mudanças no processo e apresente de forma prática como devem ser realizadas. Assim, a eficiência energética e econômica se tornará mais um indicativo de sustentabilidade (ZHANG et al., 2018; GLOVER et al., 2014).

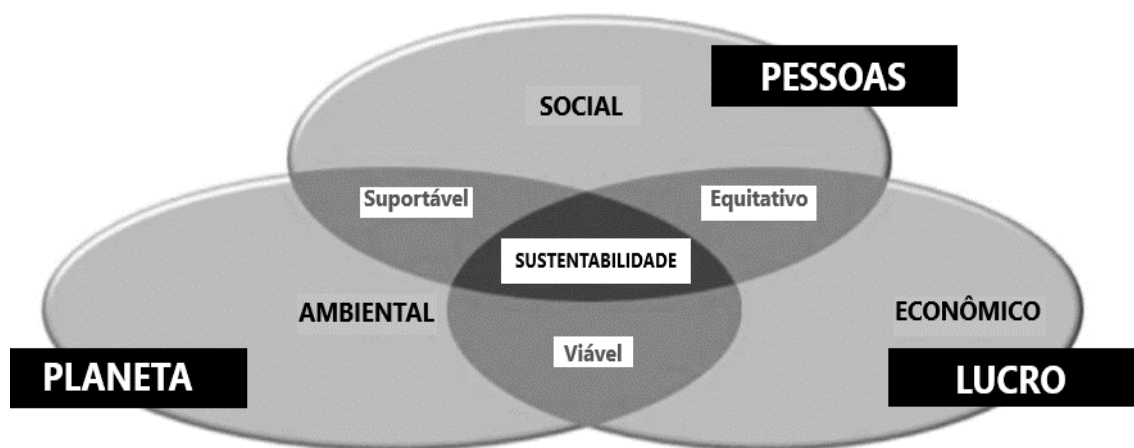
Além do aumento da população mundial, também há aumento no consumo de alimentos de origem animal, principalmente a carne e o leite, acarretando, além de outras consequências, em competição alimentar. Isto porque grande parte dos grãos produzidos, com capacidade para alimentar bilhões de pessoas, são destinados à alimentação animal (EISLER et al., 2014). Sabendo-se que tanto os ingredientes provenientes de animais como os de vegetais são importantes para a saúde humana, estudos e experimentações científicas acerca de pecuária sustentável se tornam essenciais, a fim de maximizar a produtividade animal (rendendo mais com menos animais) e a lucratividade do produtor, sem prejudicar a qualidade e a quantidade alimentar das pessoas (SPOELSTRA, 2013).

Em se tratando de pecuária bovina, o manejo do gado, desde a genética até a comercialização do produto final, possui papel importante no desenvolvimento sustentável (HOFFMANN, 2011). Portanto, inicialmente é necessário que o produtor compreenda a relação existente entre a pecuária e o meio ambiente e, principalmente, como isso pode ser gerenciado

de forma que o resultado final do processo seja positivo para ambos. Trabalhando para reduzir as emissões de gases de efeito estufa, o desperdício de água, a poluição dos rios e para conter a perda da biodiversidade existente (SWAIN et al., 2018).

Dados indicam que o consumo de produtos de origem animal tende a crescer até 70% nas próximas décadas, podendo gerar grandes prejuízos caso a produção destes alimentos continue sendo executada de forma insustentável em todas as etapas da cadeia (PRADÈRE, 2014). Por isso foi criada a Agenda Global da Pecuária Sustentável, trata-se de uma parceria entre diversos países, organizações públicas e privadas, com o objetivo de alcançar desenvolvimento da sustentabilidade no setor pecuário. Nas reuniões da agenda são discutidas formas de produção mais adequadas para os pilares ambiental, social e econômico, a fim de obter concomitantemente sustentabilidade e segurança alimentar (BREEMAN; DIJKMAN; TERMEER, 2015).

Um sistema de produção de alimentos é avaliado como sustentável quando todas as etapas do processo atendem as suas três dimensões (VAN ASSELT; CAPUANO; FELSKLERX, 2015). A Figura 1, conhecida como modelo P triplo, demonstra as três dimensões da sustentabilidade e a prioridade de cada uma delas: (1) ambiental – planeta, (2) social – pessoas, (3) econômico – lucro, estando estas sobrepostas na figura, demonstrando nas intersecções o necessário para que ocorram concomitantemente. E finalmente, evidenciando que apenas quando os três pilares forem praticados haverá sustentabilidade no processo (KAUFMANN, 2015).



**Figura 1:** Modelo P triplo. Demonstração dos três pilares da sustentabilidade, com suas respectivas prioridades, assim como as interligações existentes entre os três, necessárias para atingir a sustentabilidade.

Fonte: Kaufmann (2015). Adaptado pelo autor (2019).

Um dos segmentos que possui papel importante na produção de proteína de origem animal, e que pela forma intensiva de criação causa grande impacto ao ambiente, é o de produção de leite (BRITO, 2017). O gado leiteiro do país tem aproximadamente 218 milhões de cabeças, sendo o segundo maior rebanho do mundo, representando cerca de 22% do total de bovinos existentes (EMBRAPA, 2017; FAO, 2017).

Apesar do desenvolvimento econômico positivo gerado pelo crescimento da pecuária leiteira no Brasil, cada bovino produz cerca de 10 Kg de dejetos por dia e o meio ambiente sofre danos causados por esta grande quantidade, pois muitas vezes a destinação é incorreta, poluindo a água, o solo e a atmosfera (GOMES et al., 2014). Além disso, esta cadeia destaca-se como a segunda maior contribuinte para as emissões de gases de efeito estufa (PAOLA; RULLI; SANTINI, 2017; SUN et al., 2017). Portanto, a cadeia deve ser analisada em todas as suas etapas, desde a produção até o consumo, para avaliação dos impactos gerados e diagnóstico a respeito da sustentabilidade da mesma (GOVINDAN, 2018).

## 2.2 CADEIA PRODUTIVA DE LEITE

Apesar da existência de mais de 2 mil espécies de animais leiteiros no planeta, a maior parte do leite consumido em todo o mundo é proveniente de vacas, configurando 85% da produção global de leite (FAYE; KONUSPAYEVA, 2012). A cadeia produtiva de leite bovino inclui todas as etapas do processo de criação do gado leiteiro, desde a alimentação dos animais, equipamentos utilizados, instalações, cuidados com o rebanho, manejo, ordenha, até a comercialização do produto final (COSTA, 2009).

A produção leiteira do Brasil cresceu 43% entre os anos de 2005 e 2014. Em 2014 o país produziu um total de 35,17 bilhões de litros, colocando-o na quinta posição no ranking mundial, atrás apenas da União Europeia, Índia, Estados Unidos e China (IBGE, 2016). Em contrapartida, a quantidade de leite produzida por animal e a qualidade do produto são os maiores desafios para os pecuaristas e para a consolidação da indústria de laticínios no país (LANGE et al., 2017).

Projeções indicam que até o ano de 2025 a produção de leite no Brasil seja capaz de atingir 44,2 bilhões de litros ao ano (VILELA et al., 2016). Porém, a ausência de indicadores de sustentabilidade que auxiliem no planejamento dos agricultores constitui um dos grandes desafios para que esta evolução impacte minimamente o ambiente (ENAHORO et al., 2019).

Portanto, o futuro da cadeia leiteira depende de pesquisas que busquem por ações para reduzir seus impactos socioambientais (ZUCALI et al., 2017).

A produção leiteira mundial cresceu quase 50% nos últimos trinta anos e a meta é aumentar ainda mais (ZUCALI, 2017). Mas, para isso, será necessário a melhoria na qualidade dos alimentos oferecidos às vacas, cruzamentos entre animais de alto mérito genético garantindo raças mais produtivas e adequações no manejo, com a finalidade de produzir mais com menos animais, aumentando a quantidade de leite, de lucro e reduzindo os impactos climáticos (WONDEGEBRIEL, 2017).

### 2.3 LEITE BOVINO

O leite é o principal produto do setor lácteo e a base para a produção de outros produtos lácteos (NOYA et al., 2018), destacando-se como uma fonte de proteína animal de alto valor biológico, pois confere fornecimento constante de aminoácidos, auxilia na síntese muscular, beneficia o sistema imunológico e contribui para a saciedade (BÄR et al., 2019). Devido a sua conhecida vantagem nutricional, além do volume de leite produzido, o teor de proteína também é um fator que interfere na lucratividade do produtor (WU et al., 2018).

Fatores como raça, idade, estado nutricional, saúde dos animais, estação do ano, temperatura, entre outros, são responsáveis pela variação na composição do leite, sendo que em todos os casos os constituintes de maior quantidade são: gordura, lactose e proteína. A caseína, proteína contida no leite bovino, é de fácil digestão, tornando o alimento um aliado importante na erradicação da desnutrição (DOMINGUEZ-SALAS et al., 2018). A Tabela 1 demonstra uma média da composição do leite bovino.

**Tabela 1** – Composição média em 100 g do leite bovino.

<b>Componentes</b>	<b>Em 100g de leite</b>
Gordura (g)	3
Lactose (g)	4,7
Proteína (g)	3
Energia (Kcal)	57
Cálcio (mg)	105
Fósforo (mg)	93,4
Vitamina A (RE)	31

---

Vitamina D (mcg)	1
------------------	---

---

Fonte: Philippi (2017). Adaptado pelo autor (2019).

Seguir a recomendação diária de ingestão de leite é indispensável, pois fornece grande diversidade de nutrientes essenciais. Além disso, os laticínios aumentam o tempo de trânsito gastrointestinal, o que auxilia, entre outras coisas, na regulação glicêmica, evitando picos de insulina e controlando o apetite (ISSA; TAHERGORABI, 2019). O consumo em quantidades adequadas auxilia no metabolismo das vitaminas lipossolúveis e em outras funções orgânicas, não contribuindo para dislipidemias (GÓMEZ-CORTÉS; JUÁREZ; FUENTE, 2018).

Apesar de ser conhecido como alimento para crianças e idosos, o leite também tem importância comprovada para os adultos. Seu consumo pode prevenir doenças como câncer, diabetes e obesidade. Assim como na prevenção, atua também na promoção da saúde, pois é fonte de vitaminas A, D, E, do complexo B e de minerais, como cálcio e fósforo (PEREIRA, 2014). Estas características fazem do leite um alimento essencial na dieta humana. No entanto, se o leite não é produzido com boas práticas de produção (BPP), pode ser uma fonte de diversos contaminantes, como drogas veterinárias (PACHECO-SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014).

O leite bovino é considerado um alimento muito sensível, sofrendo alterações físico-químicas e microbiológicas com facilidade, portanto sua qualidade está diretamente relacionada com as BPP, sendo primordial a higiene da ordenha, do manejo do rebanho e a cautela na administração de fármacos aos animais (KASHONGWE et al., 2017). Qualquer irregularidade em alguma dessas práticas pode resultar em alterações nas características do produto final, gerando diversos prejuízos à saúde do comensal, desde pequenos desconfortos gástricos até patologias mais onerosas, como por exemplo tuberculose, brucelose, salmonelose, entre outras (MARTIN, 2011).

Sabendo-se que o leite bovino é um dos ingredientes de origem animal mais consumidos pela população brasileira, torna-se importante o acompanhamento rígido dos padrões de qualidade pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (MATRASZEK-ZUCHOWSKA; WOZNIAK; POSYNIAK, 2016). Um dos pontos importantes no padrão de qualidade é referente a presença de resíduos farmacológicos no leite. Os animais são medicados com substâncias distintas e cada uma delas possui sua particularidade, sendo assim, é essencial que os médicos veterinários e os funcionários das propriedades sigam às bulas e aos períodos determinados de carência (NOVAES et al., 2017).

Dentre os medicamentos administrados em vacas leiteiras destacam-se os antibióticos, utilizados nos tratamentos de mastites; os fármacos hormonais utilizados em protocolos reprodutivos; e por fim os fármacos hormonais indutores da lactação. Estes medicamentos visam melhorar a eficiência produtiva e reprodutiva do rebanho leiteiro, no entanto, após metabolizados são excretados pelo animal inclusive pela glândula mamária. (DOEHRING; SUNDRUM, 2019) Cada medicamento deve seguir um período de carência onde o leite ordenhado deverá ser descartado como resíduo podendo impactar o ambiente (KAZANCOGLU; OZKAN-OZEN; OZBILTEKIN, 2018). Em particular, nos indutores de lactação a carência gira em torno de 7 dias (LAKHANI et al., 2017).

#### 2.4 PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE LACTAÇÃO

Falhas reprodutivas em vacas de leite representam custos indesejados, diminuição na lucratividade para o produtor e são motivo para descarte precoce dos animais. Uma solução para este problema é a indução artificial de lactação (PESTANO et al., 2015). Trata-se de um protocolo estudado desde a década de 40, com aplicações hormonais que simulam o período pré e pós parto no sistema endócrino do animal, alcançando a produção de leite. Assim, se tratando de vacas saudáveis, com alto mérito genético, em idade reprodutiva, caso estas não fiquem prenhas por algum motivo, o protocolo é ideal para evitar o abate do animal e torná-lo produtivo novamente (OLIVEIRA; FERREIRA, 2016).

A produtividade é crucial para vacas leiteiras (SUN et al., 2017). Porém, os problemas de infertilidade são comuns, acometendo animais de todas as raças, qualidade genética e condições de criação. Por isso, a tecnologia para se induzir a lactação é muito estudada e constantemente aprimorada, com a finalidade de aplicar hormônios para desenvolver as glândulas mamárias, não prejudicando a saúde das vacas e não alterando a composição do leite (KENSINGER, 2016).

Atualmente existem diferentes tipos de protocolos para indução de lactação no mercado farmacêutico veterinário, cada um deles têm variados períodos de duração, de dosagens, de carência e de hormônios constituintes. Os fármacos mais utilizados nos protocolos atuais são: progesterona ( $P_4$ ), prostaglandina, estrógeno e somatotropina bovina (bST). Com o auxílio destes medicamentos as vacas chegam a produzir, em média, 80% da produção anterior (MACHADO; GONÇALVES, 2014). O método é considerado confiável, prático e acessível, pois mesmo não atingindo quantidades de produção elevadas o custo é baixo se comparado com a substituição ou descarte do animal (ECCO; BERBER, 2014; MELLADO et al., 2011).

Para que a indução artificial tenha eficácia é necessário que ocorra desenvolvimento das mamas e proliferação dos ductos, esta é a função dos hormônios estrógeno e P<sub>4</sub>. Já a prostaglandina tem a função de gerar as contrações e sintomas de parto. Havendo secreção de leite, a composição do mesmo é observada como semelhante ao leite de vacas não induzidas. (KENSINGER, 2016). O protocolo se encerra quando cessa a administração de bST, utilizada para prolongar o período de lactação (MORAIS et al., 2017).

É importante destacar que existem algumas limitações nos protocolos indutores de lactação relacionadas principalmente ao elevado manejo do animal, a qualidade zootécnica, sanitária e nutricional dos animais, e ao bem-estar dos mesmos (PESTANO et al., 2015). No entanto, a literatura científica disponível não investiga a sustentabilidade socioambiental relacionada ao descarte de leite no período de carência. Abordando apenas os aspectos tecnológicos e econômicos, com o constante aperfeiçoamento de técnicas para tornar o sistema mais lucrativo (AKERS, 2017).

## 2.5 ANÁLISE DE RESÍDUOS NO LEITE

Atualmente, a função das análises químicas em alimentos encontra-se intimamente relacionada com a promoção de sistemas alimentares sustentáveis, interagindo com aspectos sociais e ambientais, o que auxilia nas decisões políticas e ações em prol da sustentabilidade (HALLSTRÖM et al., 2018). O crescimento da indústria alimentar é exponencial, o que exige uma constante evolução dos métodos analíticos, tornando possível medir traços cada vez menores e mais complexos de diversos elementos (DANEZIS et al., 2016a).

Grande parte dos produtos utilizados no dia-a-dia do campo e da população, tais como remédios, agrotóxicos, materiais de limpeza, alimentos, embalagens, produtos de uso veterinário, entre outros, apresentam compostos químicos em sua composição. Estes compostos, quando não são devidamente monitorados e quando utilizados em condições inadequadas, são prejudiciais à saúde humana, sendo potenciais causadores de câncer, distúrbios endócrinos, reprodutivos e indutores de bactérias maléficas (SILVA; COLLINS, 2011). Por isso, torna-se necessário a utilização de instrumentos que detectem e identifiquem resíduos químicos, contribuindo para o meio ambiente e para a qualidade de vida dos seres humanos (SUN; GUAN, 2018).

A segurança alimentar está diretamente relacionada com a saúde pública e, para garanti-la, técnicas de detecção são essenciais. Desde a década de 70, a técnica de análises químicas



mais utilizada no mundo todo é a cromatografia líquida, esta quando acoplada ao espectômetro de massas é uma ferramenta útil para autenticação alimentar (FU et al., 2017). A metodologia se destaca por sua alta capacidade de análise de substâncias presentes em amostras complexas, devido ao potencial de separação e de resolução das colunas modernas (CASTRO-PUYANA et al., 2017; MARTÍN-POZO et al., 2019).

O método cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utiliza detectores (índice de refração, ultravioleta, espalhamento de luz, fluorescência, etc) em combinação com sistemas operacionais eficientes, isto permite a análise de substâncias em concentrações muito reduzidas (DANEZIS et al., 2016b). Ao comparar a CLAE com a cromatografia gasosa (CG), ambas são capazes de separar um grande número de compostos, permitindo a sua identificação ao utilizar diferentes tipos de detectores, comparando com informações contidas em uma base de dados. Sendo a CG mais adequada para verificar compostos voláteis e semi-voláteis (ABBAS et al., 2018).

Métodos modernos, como as tecnologias de sequenciamento genômico, apresentam a possibilidade de investigar os principais tópicos relacionados à autenticação de alimentos, tais como autenticação de espécies, determinação de origem, adição de ingredientes não declarados, autenticação de métodos de produção ou detecção de organismos geneticamente modificados (BRUL, 2016). Isto é possível, pois as técnicas analíticas ômicas são superiores às metodologias clássicas de análise, principalmente nos quesitos de sensibilidade, rendimento e capacidade de separação (BÖHME et al., 2019).

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, O. et al. Analytical methods used for the authentication of food of animal origin. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 246, p.6-17, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.007>.
- AKERS, R. M. A 100-Year Review: Mammary development and lactation. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 100, n. 12, p.10332-10352, dez. 2017. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-12983>.
- BÄR, C. et al. Protein profile of dairy products: Simultaneous quantification of twenty bovine milk proteins. **International Dairy Journal**, [s.l.], p.1-10, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.01.001>.
- BÖHME, K. et al. Recent applications of omics-based technologies to main topics in food authentication. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 110, p.221-232, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.005>.
- BREEMAN, G.; DIJKMAN, J.; TERMEER, C. Enhancing food security through a multi-stakeholder process: the global agenda for sustainable livestock. **Food Security**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.425-435, 11 mar. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12571-015-0430-4>.
- BRITO, M. M. Leite na produção familiar: hoje e o futuro. **Revista Balde Branco**, v. 632, de junho 2017.
- BRUL, S. Editorial overview: The rise of the ‘omics’ technologies and their relevance to food. **Current Opinion In Food Science**, [s.l.], v. 10, p.6-8, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2016.10.001>.
- CASTRO-PUYANA, M. et al. Application of mass spectrometry-based metabolomics approaches for food safety, quality and traceability. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 93, p.102-118, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2017.05.004>.
- COSTA, Z. F. **Eficiência energética e econômica da produção de leite bovino em explorações familiares no Município de Pardinho, região de Botucatu-SP**. 2009. xiv,132 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2009.
- DANEZIS, G. P. et al. Food authentication: state of the art and prospects. **Current Opinion In Food Science**, [s.l.], v. 10, p.22-31, ago. 2016a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2016.07.003>.
- DANEZIS, G. P. et al. Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 85, p.123-132, dez. 2016b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.026>.
- DOEHRING, C.; SUNDRUM, A. The informative value of an overview on antibiotic consumption, treatment efficacy and cost of clinical mastitis at farm level. **Preventive**

**Veterinary Medicine**, [s.l.], v. 165, p.63-70, abr. 2019. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.02.004>.

DOMINGUEZ-SALAS, P. et al. **Contribution of milk production to food and nutrition security**. In: Ferranti, P., Berry, E.M. and Anderson, J.R. (eds), *Encyclopedia of Food Security and Sustainability 3*: 278–291, 2018.

ECCO, D. L. M.; BERBER, R. C. A. Indução Artificial da Lactação em Bovinos Leiteiros: Revisão. **Scientific Electronic Archives**, v. 6, p. 67-80, 2014.

EISLER, M. C. et al. Agriculture: Steps to sustainable livestock. **Nature**, [s.l.], v. 507, n. 7490, p.32-34, 5 mar. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/507032a>.

EMBRAPA. **Indicadores: Leite e Derivados**. – Ano 8, n. 65 (Abril/2017) – Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2017  
[http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2017\\_04\\_Indicadores\\_leite.pdf](http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2017_04_Indicadores_leite.pdf)

ENAHORO, D. et al. Supporting sustainable expansion of livestock production in South Asia and Sub-Saharan Africa: Scenario analysis of investment options. **Global Food Security**, [s.l.], v. 20, p.114-121, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gfs.2019.01.001>.

FAO. Food Outlook. **Biannual report on global food markets**. 2017  
<http://www.fao.org/3/a-i7343e.pdf>

FAO. 2018. **World Livestock: Transforming the livestock sector through the Sustainable Development Goals**. Rome. 222 pp.

FAUDEUR, G. et al. Transgenic Artifacts Caused by Passenger Human Growth Hormone. **Trends In Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 29, n. 10, p.670-674, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2018.05.005>.

FAYE, B.; KONUSPAYEVA, G. The sustainability challenge to the dairy sector – The growing importance of non-cattle milk production worldwide. **International Dairy Journal**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.50-56, jun. 2012. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.12.011>.

FU, Y. et al. Nontargeted screening of chemical contaminants and illegal additives in food based on liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 96, p.89-98, nov. 2017. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2017.07.014>.

GARCIA, S. N.; OSBURN, B. I.; CULLOR, J. S. A one health perspective on dairy production and dairy food safety. **One Health**, [s.l.], v. 7, p.100086-100095, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100086>.

GLOVER, J. L. et al. An Institutional Theory perspective on sustainable practices across the dairy supply chain. **International Journal Of Production Economics**, [s.l.], v. 152, p.102-111, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpe.2013.12.027>.

GOMES, A. C. A. et al. Incentivos para a viabilização do biogás a partir dos resíduos da pecuária leiteira no Estado de Minas Gerais. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 30, p. 149-160, jul. 2014.

GÓMEZ-CORTÉS, P.; JUÁREZ, M.; LAFUENTE, M. A. Milk fatty acids and potential health benefits: An updated vision. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 81, p.1-9, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.014>.

GOVINDAN, K. Sustainable consumption and production in the food supply chain: A conceptual framework. **International Journal Of Production Economics**, [s.l.], v. 195, p.419-431, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpe.2017.03.003>.

GROSS, J.; BRUCKMAIER, R. Invited review: Metabolic challenges and adaptation during different functional stages of the mammary gland in dairy cows. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 102, n. 4, p.2828-2843, abr. 2019. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2018-15713>.

HALLSTRÖM, E. et al. Using dietary quality scores to assess sustainability of food products and human diets: A systematic review. **Ecological Indicators**, [s.l.], v. 93, p.219-230, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.071>.

HOFFMANN, I. Livestock biodiversity and sustainability. **Livestock Science**, [s.l.], v. 139, n. 1-2, p.69-79, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2011.03.016>.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Prod. Pec. munic.**, Rio de Janeiro, v. 44, p.1-51, 2016.

ISSA, A. T.; TAHERGORABI, R. Milk Bacteria and Gastrointestinal Tract. **Dietary Interventions In Gastrointestinal Diseases**, [s.l.], p.265-275, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-814468-8.00022-3>.

KASHONGWE, O. B. et al. Associations between milking practices, somatic cell counts and milk postharvest losses in smallholder dairy and pastoral camel herds in Kenya. **International Journal Of Veterinary Science And Medicine**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.57-64, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.01.001>.

KAUFMANN, T. Sustainable livestock production: Low emission farm – The innovative combination of nutrient, emission and waste management with special emphasis on Chinese pig production. **Animal Nutrition**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.104-112, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2015.08.001>.

KAZANCOGLU, Y.; OZKAN-OZEN, Y. D.; OZBILTEKIN, M. Minimizing losses in milk supply chain with sustainability: An example from an emerging economy. **Resources, Conservation And Recycling**, [s.l.], v. 139, p.270-279, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resconrec.2018.08.020>.

KENSINGER, R. S. Induced Lactation. **Reference Module In Food Science**, [s.l.], 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00845-3>.

KERSLAKE, J. et al. Economic costs of recorded reasons for cow mortality and culling in a pasture-based dairy industry. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 101, n. 2, p.1795-1803, fev. 2018. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13124>.

LAKHANI, P. et al. Artificial Induction of Lactation in Bovines: Scope and Limitations. **International Journal Of Livestock Research**, [s.l.], p.102-112, 2017. ScopeMed International Medical Journal Management and Indexing System. <http://dx.doi.org/10.5455/ijlr.20170324031735>.

LANGE, M. J. et al. Tipologia de manejo de ordenha: análise de fatores de risco para a mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s.l.], v. 37, n. 11, p.1205-1212, nov. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2017001100004>.

LAUER, M. et al. Making money from waste: The economic viability of producing biogas and biomethane in the Idaho dairy industry. **Applied Energy**, [s.l.], v. 222, p.621-636, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.04.026>.

MACHADO, J. M C.; GONÇALVES, A. F. C. Protocolo de indução de lactação para vacas holandesas. **Revista científica eletrônica de ciências aplicadas da fait**, v. 3, 2014.

MARTIN, J. G. P. Resíduos de antimicrobianos em leite – uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.80-87, 10 fev. 2015. Universidade Estadual de Campinas. <http://dx.doi.org/10.20396/san.v18i2.8634680>.

MARTÍN-POZO, L. et al. Analytical methods for the determination of emerging contaminants in sewage sludge samples. A review. **Talanta**, [s.l.], v. 192, p.508-533, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.056>.

MATRASZEK-ZUCHOWSKA, I.; WOZNIAK, B.; POSYNIK, A. Determination of Hormones Residues in Milk by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.727-739, 19 ago. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-016-0620-5>.

MELLADO, M. et al. Effect of lactation number, year, and season of initiation of lactation on milk yield of cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 94, n. 9, p.4524-4530, set. 2011. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4152>.

MORAIS, J. P. G. de et al. Lactation performance of Holstein cows treated with 2 formulations of recombinant bovine somatotropin in a large commercial dairy herd in Brazil. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 100, n. 7, p.5945-5956, jul. 2017. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11965>.

MOTTET, A. et al. Livestock: On our plates or eating at our table? A new analysis of the feed/food debate. **Global Food Security**, [s.l.], v. 14, p.1-8, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gfs.2017.01.001>.

NOVAES, S. F. et al. Residues of veterinary drugs in milk in Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 8, p. 1-7, 2017.

NOYA, I. et al. Environmental and water sustainability of milk production in Northeast Spain. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 616-617, p.1317-1329, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.186>.

OLIVEIRA, M. L.; FERREIRA, C. Indução da lactação em vacas. **Alm. Med. Vet. Zoo**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.1-7, 2 jun. 2016.

PACHECO-SILVA, E.; SOUZA, J. R.; CALDAS, E. D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química Nova**, [s.l.], v. 37, n. 1, p.111-122, 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422014000100020>.

PAOLA, A.; RULLI, M. C.; SANTINI, M. Human food vs. animal feed debate. A thorough analysis of environmental footprints. **Land Use Policy**, [s.l.], v. 67, p.652-659, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.landusepol.2017.06.017>.

PARRÓN, J. A. et al. Antiviral activity of bovine milk components: Extending the list of inhibitory proteins and seeking a better understanding of their neutralization mechanism. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 44, p.103-111, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.002>.

PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, [s.l.], v. 30, n. 6, p.619-627, jun. 2014. **Elsevier BV**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>.

PESTANO, H. S. et al. Indução artificial de lactação em bovinos: histórico e evolução. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.39, n.3, p.315-321, jul./set. 2015.

PHILIPPI, S. T. **Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional**. 6. ed. Barueri: Manole, 2017. 161 p.

PRADÈRE, J. P. Links between livestock production, the environment and sustainable development. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz**, [s.l.], v. 3, n. 33, p.765-781, 2014.

RAFIEE, S. et al. Sustainability evaluation of pasteurized milk production with a life cycle assessment approach: An Iranian case study. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 562, p.614-627, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.070>.

ROJAS-DOWNING, M. M. et al. Climate change and livestock: Impacts, adaptation, and mitigation. **Climate Risk Management**, [s.l.], v. 16, p.145-163, 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crm.2017.02.001>.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Quim. Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

SILVA, S.; KANUGALA, K.; WEERAKKODY, N. Microbiological Quality of Raw Milk and Effect on Quality by Implementing Good Management Practices. **Procedia Food Science**, [s.l.], v. 6, p.92-96, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.profoo.2016.02.019>.

SILVESTRE, B. S.; TIRCA, D. M. Innovations for sustainable development: Moving toward a sustainable future. **Journal Of Cleaner Production**, [s.l.], v. 208, p.325-332, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.09.244>.

SPOELSTRA, S. F. Sustainability research: Organizational challenge for intermediary research institutes. **Njas - Wageningen Journal Of Life Sciences**, [s.l.], v. 66, p.75-81, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.njas.2013.06.002>.

SUN, H. et al. Lactation-related metabolic mechanism investigated based on mammary gland metabolomics and 4 biofluids' metabolomics relationships in dairy cows. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 18, n. 1, dez. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-017-4314-1>.

SUN, H.; GUAN, L. L. Feedomics: Promises for food security with sustainable food animal production. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 107, p.130-141, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2018.07.025>.

SWAIN, M. et al. Reducing the environmental impact of global diets. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 610-611, p.1207-1209, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.125>.

TRUCHET, S.; HONVO-HOUÉTO, E. Physiology of milk secretion. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 31, n. 4, p.367-384, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2017.10.008>.

VAN ASSELT, E.; CAPUANO, E.; FELS-KLERX, H. Sustainability of milk production in the Netherlands – A comparison between raw organic, pasteurised organic and conventional milk. **International Dairy Journal**, [s.l.], v. 47, p.19-26, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.02.007>.

VAN HAL, O. et al. Upcycling food leftovers and grass resources through livestock: Impact of livestock system and productivity. **Journal Of Cleaner Production**, [s.l.], v. 219, p.485-496, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.329>.

VILELA, D. et al. **Pecuária de leite no Brasil** – Cenários e avanços tecnológicos. 1a ed. Brasília: [s.n], 2016.

WANG, Y. et al. Development of a method for the analysis of multiclass antibiotic residues in milk using QuEChERS and liquid chromatography – Tandem mass spectrometry. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 8, p. 693 – 703, 2015.

WONDEGEBRIEL, D. et al. Environmental impact of milk production across an intensification gradient in Ethiopia. **Livestock Science**, v. 206, p. 28–36, 2017.

WU, X. et al. Serum metabolome profiling revealed potential biomarkers for milk protein yield in dairy cows. **Journal Of Proteomics**, [s.l.], v. 184, p.54-61, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2018.06.005>.

ZHANG, C. et al. Economic assessment of photovoltaic water pumping integration with dairy milk production. **Energy Conversion And Management**, [s.l.], v. 177, p.750-764, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2018.09.060>.

ZOCCA, R. O. et al. Introduction to Sustainable Food Production. **Sustainable Food Systems From Agriculture To Industry**, [s.l.], p.3-46, 2018. Elsevier.  
<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-811935-8.00001-9>.

ZUCALI, M. et al. Global warming and mitigation potential of milk and meat production in Lombardy (Italy). **Journal of Cleaner Production**, v. 153, p. 474-482, 2017.



### 3. ARTIGO

## **Estudo metabolômico exploratório em leite de lactação induzida em vacas da raça holandês**

Exploratory metabolomic study in lactation milk induced in Holstein cows

Mariana Luísa Chiezi de Oliveira, Isabele Picada Emanuelli, José Eduardo Gonçalves, Carla Porto, Eduardo Pilau, Fábio Luiz Bim Cavaleri, Cler Jansen, Márcia Aparecida Andreazzi

### **Resumo**

Na ocorrência de falhas reprodutivas não ocorrerá a subsequente produção de leite. Em se tratando de animais de alta produção, isso gera declínio na produção de leite, aumenta o intervalo entre partos e o descarte precoce de animais. Como alternativa, existem os protocolos de indução de lactação artificial compostos por combinações hormonais. Este trabalho teve como objetivo investigar resíduos hormonais exógenos em leite de vacas submetidas ao protocolo de lactação induzida e realizar uma análise exploratória dos metabólitos comparando-os com o leite de lactação fisiológica. Foi um estudo exploratório conduzido na fazenda do Centro Universitário de Maringá/UNICESUMAR. O protocolo aplicado foi composto pelos hormônios: bST, BE, P<sub>4</sub>, DEX e Cloprostenol. Amostras foram coletadas nos dias 0 (início da ordenha), 1, 7, 10 e 24. Foram coletadas amostras de leite de lactação fisiológica, de lactação induzida e do tanque de resfriamento. As amostras passaram por um processo de extração e foram analisadas por UHPLC-MS/MS para detecção hormonal e metabolômica. Não foram detectados resíduos de P<sub>4</sub> em nenhuma das amostras analisadas. O BE foi detectado apenas no leite induzido no D0. Já o DEX foi detectado em todos os dias de coleta nas amostras de leite induzido e do tanque de resfriamento. A metabolômica identificou 39 metabólitos nas amostras dos 3 grupos, sendo que 21 não estavam presentes no leite controle. O leite produzido por lactação induzida possui a presença de vários metabólitos distintos do leite fisiológico. A detecção hormonal e/ou a identificação de metabólitos associados devem ser levados em conta para aplicação em novos estudos.

*Palavras-chave:* Cadeia produtiva leiteira. Detecção hormonal. Lactação induzida. Metabolômica. Segurança alimentar.

### **Abstract**

In the event of reproductive failures, subsequent milk production will not occur. In the case of high production animals, this causes a decline in milk production, increases the interval between births and the early disposal of animals. Alternatively, there are protocols for inducing artificial lactation composed of hormonal combinations. This work aimed to investigate exogenous hormonal residues in milk of cows submitted to the induced lactation protocol and to carry out an exploratory analysis of the metabolites comparing them with physiological lactation milk. It was an exploratory study conducted on the farm of the Centro Universitário de Maringá / UNICESUMAR. The applied protocol was composed by the hormones: bST, BE, P<sub>4</sub>, DEX and Cloprostenol. Samples were collected on days 0 (start of milking), 1, 7, 10 and 24. Samples of physiological lactation, induced lactation and cooling tank were collected. The samples went through an extraction process and were analyzed by UHPLC-MS / MS for hormonal and meta-economical detection. P<sub>4</sub> residues were not detected in any of the analyzed samples. BE was detected only in milk induced in D0. DEX was detected on all collection days in the samples of induced milk and the cooling tank. The metabolomics identified 39 metabolites in the samples of the 3 groups, 21 of which were not present in the control milk. Milk produced by induced lactation has the presence of several metabolites distinct from physiological milk. Hormonal detection and / or identification of associated metabolites must be taken into account for application in new studies.

Keywords: Dairy production chain. Hormonal detection. Induced lactation. Metabolomics. Food security.

## 1 Introdução

A cadeia produtiva leiteira vem crescendo concomitantemente com o interesse pela qualidade dos alimentos e, com isso, este setor enfrenta o desafio de aumentar a produção e manter os padrões de segurança alimentar impactando minimamente o ambiente (FAO, 2019; GROSS; BRUCKMAIER, 2019). A preocupação com a qualidade do leite deve-se ao seu elevado teor de gordura, açúcares e proteína, o que dificulta o processo de análises químicas (SILVA; KANUGALA; WEERAKKODY, 2016). Além disso, a administração de fármacos no rebanho e o manejo do mesmo geram preocupações quanto a qualidade do leite (GARCIA; OSBURN; CULLOR, 2019).

Assim como nos humanos, a lactação em vacas é um processo endócrino e exócrino complexo, dependendo de diversos hormônios para a secreção em quantidade e qualidade adequadas (COHICK, 2016). A lactação fisiológica só se efetiva quando ocorre a gestação, portanto o processo de lactação é dependente do sistema reprodutivo (TRUCHET; HONVO-HOUÉTO, 2017). Por conseguinte, se ocorrem problemas reprodutivos no animal, não ocorrerá a subsequente produção de leite. Em se tratando de animais de produção, isso gera declínio nos índices produtivos, prejudicando a produtividade (KERSLAKE et al., 2018). Para solucionar este problema da ausência gestacional, desenvolveu-se ao longo dos anos um protocolo de indução de lactação composto por combinações hormonais, simulando os períodos finais da gestação (CHAKRIYARAT et al., 1978; DAVIS et al. 1983; AKERS, 2017; KERSLAKE et al., 2018). Mesmo que os protocolos de indução artificial de lactação tenham sido descritos inicialmente entre as décadas de 70 e 80 (SMITH; SCHANBACHER, 1973; CHAKRIYARAT et al., 1978; DAVIS et al. 1983), a literatura científica atual carece de investigações sobre esta temática, provavelmente em decorrência da restrição do uso do protocolo em diversos países como por exemplo: os da União Europeia, a Inglaterra e o Canadá (KENSINGER, 2016; JOHNSON, 2017). No Brasil, o uso comercial da indução de lactação é permitido, porém começou a ser aplicado com maior frequência na última década (PESTANO et al, 2015).

O método de indução de lactação é considerado viável apenas em vacas de alta produção, pois induz a secreção de leite entre 50 a 80% da produtividade anterior de animais com falha reprodutiva que permaneceriam improdutivos ou seriam descartados (KENSINGER, 2016; LAKHANI et al., 2017). Com isso, permite que o sistema de criação seja mais eficiente economicamente e incremente a sustentabilidade ambiental na produção ocasionadas pelas reduções tanto de gases de efeito estufa e como do uso de recursos naturais (PRADÈRE, 2014; SWAIN et al., 2018). Sendo assim, o protocolo de indução vem a contribuir significativamente para o objetivo de produzir mais alimentos com menos recursos, seguindo os princípios da FAO de sustentabilidade na segurança alimentar (FAO, 2019).

Por outro lado, mesmo que o protocolo de indução de lactação seja uma tecnologia favorável economicamente para a cadeia produtiva leiteira, é importante investigar uma possível interferência na segurança alimentar ou na sustentabilidade. Quanto a garantia da seguridade alimentar do leite, seria interessante a utilização de métodos analíticos precisos e que identificassem as possíveis alterações envolvidas nas etapas do fluxo de informações genéticas: DNA, RNA, proteínas e metabólitos, ou seja, as análises ômicas (SUN; GUAN, 2018). Contudo, os estudos sobre lactação induzida não abordam as análises ômicas, investigando apenas os protocolos hormonais (FREITAS et al, 2010; ECCO; BERBER, 2014; PESTANO et al, 2015; OLIVEIRA; FERREIRA, 2016), a viabilidade econômica (AKERS, 2017; MAFFI et al, 2019; ECCO; BERBER, 2014) e as análises básicas da qualidade do leite (KENSINGER, 2016; NAGARAJA et al, 2019). Dentre estes estudos, apenas um avaliou a seguridade para o consumo humano de leite induzido, classifico-o com composição nutricional similar ao de uma lactação fisiológica (KENSINGER, 2016).

Percebe-se que a literatura científica não apresenta estudos referentes a diferenças metabólicas no leite ocasionadas pela indução hormonal. Sendo assim, as tecnologias avançadas baseadas no conceito de “*foodomics*” podem ser importantes aliadas para detectar alterações que comprometam a segurança na produção dos alimentos. Este campo da biologia compreende em estudos com finalidade de elucidar os mecanismos envolvidos nos processos biológicos que possuem sufixo omics, tais como genômica, transcriptômica, proteômica ou metabolômica (SUN; GUAN, 2018).

Em especial a metabolômica, analisa um conjunto de metabólitos que representam os produtos finais do genoma, transcriptoma e proteoma que refletem no fenótipo, podendo servir para avaliar a qualidade dos alimentos e a segurança para saúde (BÖHME et al., 2019). Trata-se de uma técnica emergente da análise metabólica que identifica, quantifica e caracteriza idealmente todos os metabólitos de uma amostra biológica (por exemplo, leite, plasma e soro) em um único processo experimental (ADAMSKI; SUHRE, 2013). A abordagem desta ferramenta é multidisciplinar, ou seja, combina química analítica para obter dados químicos brutos com disciplinas de mineração e interpretação de dados que incluem bioestatística, bioquímica e bioinformática (FONTANESI, 2016).

Existe a preocupação de que medicamentos aprovados para uso em bovinos e ovinos ou seus metabólitos biologicamente ativos acumulados nos alimentos possam expor os consumidores a um potencial risco (OLIVER; MURINDA; JAYARAO, 2011). Sabe-se que os hormônios podem alterar a expressão de genes, a sinalização e as vias metabólicas nas células, o que posteriormente altera o status fisiológico e, finalmente, leva a diferentes fenótipos (FAUDEUR et al., 2018), no caso específico deste estudo, o leite.

Um estudo recente inferiu a existência de uma relação entre a exposição aos hormônios exógenos através de alimentos de origem animal com o aumento do risco do câncer de mama (NACHMAN; SMITH, 2015). Também existe a preocupação de que o bST usado em bovinos leiteiros aumente os níveis de outro hormônio, insulina 1 (IGF-1), no leite e produtos lácteos, aumentando também a exposição do consumidor (DERVILLY-PINEL et al., 2014). A falta de evidências sobre o real risco à saúde humana do uso destes medicamentos em animais de produção fomenta o debate sobre a liberação, levando vários países a aderirem ao princípio da precaução e restringirem o uso dos protocolos indutores (BAYNES et al., 2016; KENSINGER, 2016; JOHNSON, 2017).

Baseado no surgimento das análises multi-ômicas altamente precisas em alimentos e na problemática apresentada sobre o uso de protocolos de indução de lactação, percebe-se a existência de uma lacuna sobre estudos de caracterização metabólica do leite gerado por indução artificial. Tal pesquisa poderia diagnosticar um perfil quanto os aspectos de segurança para o consumo e de sustentabilidade socioambiental da aplicação deste protocolo na produção leiteira, contribuindo para tomadas de decisões mais cautelosas quanto a qualidade do alimento, ao bem-estar animal e ao desenvolvimento sustentável na indústria de laticínios. Para tanto, este estudo investigou os resíduos hormonais exógenos em leite de vacas submetidas ao protocolo de lactação induzida e realizou uma análise exploratória dos metabólitos comparando-os com o leite de lactação fisiológica.

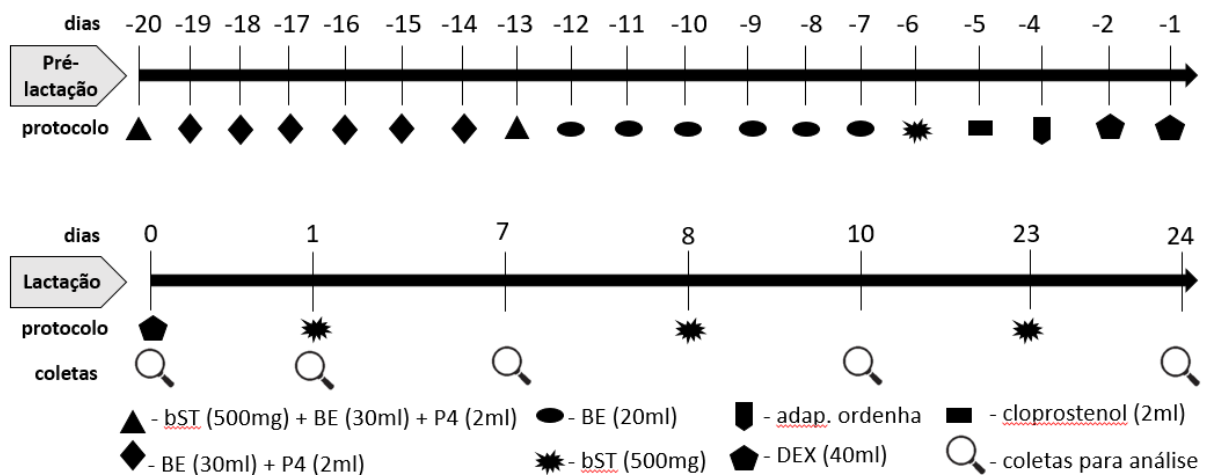
## **2 Metodologia**

### **Caracterização do estudo**

O estudo ocorreu na fazenda do Centro Universitário de Maringá/UNICESUMAR, na cidade de Maringá, estado do Paraná (23°25'S, 51°57'W e altitude de 550 metros). Trata-se de um estudo exploratório, o qual analisa, observa, descreve a presença de hormônios e diferenças metabólicas em leite de lactação induzida. Os animais

utilizados na pesquisa foram da raça holandês, de alta produção e criados em confinamento no sistema *free stall*. O grupo tratamento foi composto por duas vacas submetidas ao protocolo de indução de lactação (Figura 1), sendo o início da coleta das amostras o primeiro dia de lactação, chamado de dia 0 (D0). O grupo controle foi composto por dois animais com lactação fisiológica gestacional, sendo que o início da coleta ocorreu no dia do parto, chamado de dia 0 (D0). As demais amostras seguiram os dias de coleta conforme a Figura 1. Os animais dos dois grupos foram submetidos ao mesmo manejo sanitário e nutricional.

A pesquisa foi submetida à Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário de Maringá/UNICESUMAR e aprovada conforme o protocolo n° 012/2019.



**Figura 1.** Delineamento experimental: protocolo hormonal e coleta das amostras. Em dias de aplicação do protocolo, todas as coletas de leite foram realizadas antes da aplicação dos fármacos. O dia 0 é marcado como o início da ordenha, ou seja, produção de leite.

### Protocolo hormonal

Para a indução da lactação no grupo tratamento foram utilizados os seguintes fármacos: somatotropina bovina - bST (500mg - Boostin®) a cada 7 dias, benzoato de estradiol - BE (30ml – Estrogin®) por 8 dias e (20ml – Estrogin®) por mais 6 dias, progesterona - P<sub>4</sub> (2ml - Sincrogest®) por 8 dias, dexametasona - DEX (40ml - Déxium®) nos 3 dias que antecedem a ordenha e Cloprostenol (2ml - Ciosin®) no dia anterior ao início da adaptação na ordenha (Figura 1). Devido ao curto período farmacocinético estabelecido na literatura do Cloprostenol (4 horas; MARTINS et al., 2011) e a ausência de período de carência do bST (Boostin®, bula) estes não participaram das análises. Portanto a detecção hormonal foi realizada para BE, P<sub>4</sub> e DEX.

### Coleta das amostras

As amostras foram coletadas nos dias 0 (início da ordenha), 1, 7, 10 e 24 (Figura 1), sendo 25 ml coletados no período matutino e o restante na ordenha vespertina. Os dias de coletas ocorreram da seguinte forma: foram retiradas por ordenha manual, desprezando os 3 primeiros jatos, 4 amostras das vacas induzidas, 4 amostras de leite das vacas controle (lactação fisiológica) e 2 amostras do tanque de resfriamento, totalizando 50 amostras (10 amostras/dia). As amostras coletadas nos dias especificados acima foram armazenadas em frascos do tipo Falcon®

higienizados e esterilizados, mantidas em refrigeradores e levadas para o laboratório, onde foram armazenadas a -20°C até serem analisadas.

### **Testes de detecção hormonal**

Para os testes foram utilizadas 3 amostras de leite de vaca livre de drogas veterinárias, ou seja, animais que não estão em tratamento farmacológico, nem em período de carência. As amostras de 50 ml foram armazenadas a -20°C em frascos do tipo Falcon® higienizados e esterilizados.

Para validação da análise de detecção hormonal, as amostras foram preparadas com as seguintes concentrações: (1) uma amostra controle (livre de contaminação); (2) 15 µL de cada hormônio (P<sub>4</sub>, DEX e BE) com 10 ml de leite; e (3) 30 µL de cada hormônio (P<sub>4</sub>, DEX e BE) com 10 ml de leite. Posteriormente, as 3 amostras passaram pelo seguinte processo de extração: a preparação anterior foi colocada em um tubo Falcon®, contendo 4g de sulfato de magnésio, 1g de cloreto de sódio, 1g de citrato trissódico, 0,5g de citrato dissódico e 15ml de acetonitrila. As amostras foram agitadas vigorosamente por 1 min em vórtex, seguido de decantação por centrifugação (6000 rpm) durante 5 min. Após a separação de fases, a camada superior obtida da mistura foi então transferida para cartucho QuEChERS (contendo 25mg de PSA e 50mg de C18) para separar os analitos desejados da matriz, agitando vigorosamente por 1 minuto em vórtex, seguido de decantação por centrifugação (8000 rpm) por 2 min. A camada superior separada foi filtrada em filtro de 0,45 µm para posterior análise por UHPLC-MS/MS.

O coeficiente de correlação calculado foi de 0,99. Para tanto, as amostras de leite genuíno, foram fraudadas com a adição de quantidades previamente conhecidas de hormônios do protocolo (colocar a marca dos hormônios, de acordo com o parâmetro analisado. A metodologia de extração da amostra seguiu a descrita por Brasil (1991).

Os parâmetros analíticos investigados no processo de validação, a fim de demonstrar o desempenho do método, foram: exatidão; precisão; linearidade; seletividade/especificidade; limite de detecção/sensibilidade; limite de quantificação. O padrão utilizado para a realização da validação da técnica analítica foi adaptado por Oliveira et al. (1998).

### **Métodos de Análise**

#### Detecção de hormônios em amostras de leite

As amostras foram preparadas adicionando 10g de cada amostra de leite em um tubo Falcon®, contendo 4g de sulfato de magnésio, 1g de cloreto de sódio, 1g de citrato trissódico, 0,5g de citrato dissódico e 15ml de acetonitrila. As amostras foram agitadas vigorosamente por 1 min em vórtex, seguido de decantação por centrifugação (6000 rpm) durante 5 min. Após a separação de fases, a camada superior obtida da mistura foi então transferida para cartucho QuEChERS (contendo 25mg de PSA e 50mg de C18) para separar os analitos desejados da matriz, agitando vigorosamente por 1 minuto em vórtex, seguido de decantação por centrifugação (8000 rpm) por 2 min. A camada superior separada foi filtrada em filtro de 0,45 µm diretamente para um vial. Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

Alíquotas de 3 µL das amostras foram analisadas por UHPLC-MS/MS utilizando um cromatógrafo Nexera X2 (Shimadzu, Japan), acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Impact II (geometria Q-tof, Bruker Daltonics Corporation, Alemanha). Para a cromatografia foi utilizada uma coluna C18 Acquity® (1,7 µm; 2,1 mm

x 50 mm) com uma eluição por gradiente, utilizando água (0,1% ácido fórmico) (A) e acetonitrila (0,1% ácido fórmico) (B) como fase móvel.

A separação cromatográfica foi realizada em 25 min utilizando como gradiente: 10% B 0-0,01 min, 10% B 0,01-2 min, 50% B 2-5 min, 85% B 5-10 min, 95% B 10-14 min, 5% B 14-18 min, 5% B 18-21 min. O fluxo foi mantido em 0,25 mL min<sup>-1</sup> a 40 °C durante separação cromatográfica. O espectrômetro de massas com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) foi operado em modo positivo de ionização, com voltagem do capilar ajustada para 4,00 kV, temperatura da fonte de 200 °C, fluxo de gás de dessolvatação de 8 L min<sup>-1</sup> e pressão do gás de nebulização a 4 bar. Os dados foram coletados entre as faixas m/z 50 a 800 com uma taxa de aquisição de 5 Hz, sendo os 3 íons mais intensos selecionados para fragmentação automática (AutoMS/MS). Para modo negativo de ionização, os parâmetros foram os mesmos do modo positivo, com exceção da voltagem do capilar, que foi ajustada para 3,00 kV.

#### Metabolômica não-direcionada

As amostras foram extraídas seguindo a metodologia descrita por Xi et al. (2017) com modificações.

Inicialmente, uma alíquota de 2 mL de amostra de leite foi centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos para remoção de gordura. Uma alíquota de 400 µL de amostra de leite desnatado foi adicionada a 1400 µL acetonitrila (1:3,5) em tubo tipo Eppendorf, homogeneizada em vórtex por 2 minutos e submetida a ultrassom com banho de gelo por 5 minutos.

Logo após, a amostra foi centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos para remoção de moléculas grandes, sendo o sobrenadante coletado diretamente para tubo tipo Eppendorf e submetido a secagem do solvente sob fluxo de nitrogênio. A amostra foi seca até 500 µL, passada para um vial e injetada no equipamento.

Alíquotas de 2 µL das amostras foram analisadas por UHPLC-MS/MS utilizando um cromatógrafo Nexera X2 (Shimadzu, Japan), acoplado à um espectrômetro de massas de alta resolução Impact II (geometria Q-tof, Bruker Daltonics Corporation, Alemanha). Para a cromatografia foi utilizada uma coluna C18 Phenomenex® (1,7 µm; 2,1 mm x 50 mm) com uma eluição por gradiente, utilizando água (0,1% ácido fórmico) (A) e acetonitrila (0,1% ácido fórmico) (B) como fase móvel.

A separação cromatográfica foi realizada em 25 min utilizando como gradiente: 5% B 0-1 min, 10% B 1-2 min, 50% B 2-5 min, 85% B 5-10 min, 95% B 10-18 min, 5% B 18-25 min, O fluxo foi mantido em 0,25 mL min<sup>-1</sup> a 40 °C durante separação cromatográfica. O espectrômetro de massas com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) foi operado em modo positivo de ionização, com voltagem do capilar ajustada para 4,00 kV, temperatura da fonte de 200 °C, fluxo de gás de dessolvatação de 8 L min<sup>-1</sup> e pressão do gás de nebulização a 4 bar. Os dados foram coletados entre as faixas m/z 50 a 1200 com uma taxa de aquisição de 5 Hz, sendo os 3 íons mais intensos selecionados para fragmentação automática (AutoMS/MS). Para modo negativo de ionização, os parâmetros foram os mesmos do modo positivo, com exceção da voltagem do capilar, que foi ajustada para 3,00 kV.

#### **Análise de dados**

Este estudo utilizou o software Data Analysis 4,3 (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) para visualização dos cromatogramas de íons totais e os espectros de MS e MS/MS das amostras.

Para a análise de hormônios em amostras de leite, os dados obtidos por UHPLC-MS/MS foram analisados com a busca direta dos valores de  $m/z$  dos adutos referentes aos princípios ativos declarados no rótulo dos hormônios utilizados durante o experimento, conforme mostra a Tabela 1. Essa avaliação foi realizada traçando a corrente iônica da  $m/z$  em questão com análise manual do espectro de fragmentação da molécula e cálculo do erro de massa.

**Tabela 1.** Hormônios utilizados no experimento, com seus respectivos princípios ativos, fórmulas moleculares, massas monoisotópicas e massas dos adutos.

Nome Comercial	Princípio Ativo do Hormônio	Fórmula Molecular	Massa Monoisotópica	Massa do Aduto $[M+H]^+$
Déxium®	Dexametasona	$C_{22}H_{29}FO_5$	392,1999	393,2077
Sincrogest®	Progesterona	$C_{21}H_{30}O_2$	314,2245	315,2323
Estrogin®	Benzoato de Estradiol	$C_{25}H_{28}O_3$	376,2038	377,2116

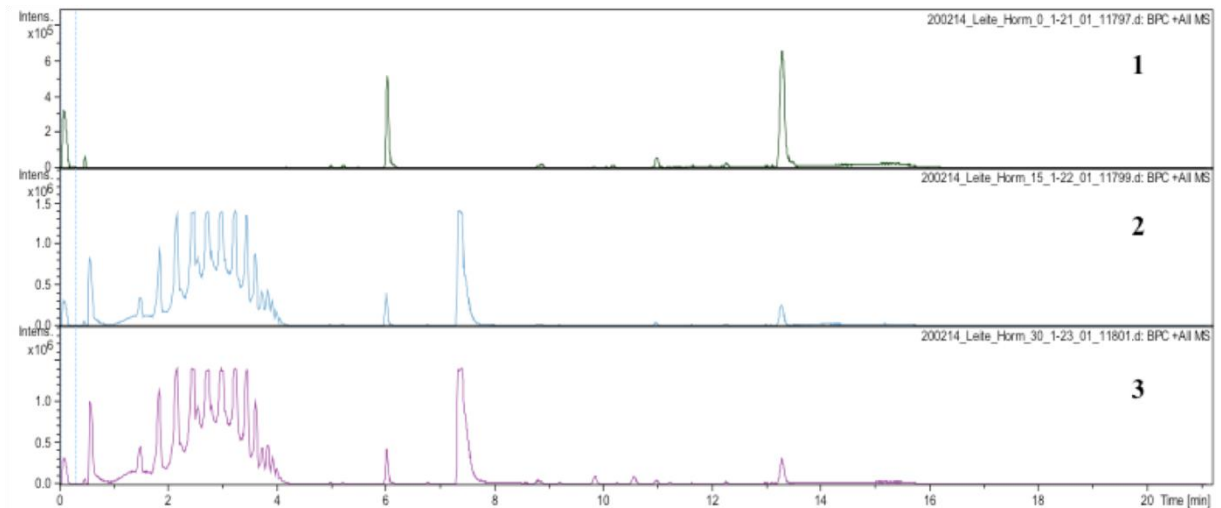
Para a análise de dados de Metabolômica não-direcionada, os dados de MS/MS foram comparados com os espectros das bibliotecas espectrais Milk Composition Database (MCDB), *Human Metabolome Database* (HMDB), ReSpec, Massbank, NIST14 e (FOROUTAN et al., 2019; FORSYTHE; WISHART, 2009; HORAI et al., 2010; SAWADA et al., 2012; STEIN, 2014). Os espectros de fragmentação dos íons que apresentaram similaridade com os espectros das bibliotecas foram confrontados manualmente com os espectros de fragmentação dos compostos propostos, sendo seus erros de massas calculados e somente aceitos se inferiores a 5 ppm (SCHEUBERT et al., 2017).

### 3 Resultados

O protocolo de indução artificial de lactação do presente estudo foi responsivo em todas as vacas do grupo tratamento. As vacas chegaram a produção máxima entre 20 e 30 litros ( $X=25,3$  L) de leite por dia nos dias observados (entre D0 e D30).

#### Análise de hormônios

A validação do método de detecção hormonal foi realizada com sucesso pela análise multirresíduos hormonais por cromatografia líquida acoplada do UHPLC-MS/MS nas amostras de leite contaminadas intencionalmente. O protocolo foi eficiente para separar os íons dos compostos hormonais DEX, P<sub>4</sub> e BE conforme apresentado nos gráficos dos cromatogramas (Figura 2).



**Figura 2.** Cromatogramas de detecção hormonal de DEX, P<sub>4</sub> e BE com modo de aquisição positivo. (1) amostra controle, (2) amostra contaminada com 15 µL de cada hormônio e (3) amostra contaminada com 30 µL de cada hormônio.

Nas análises de detecção hormonal por UHPLC-MS/MS utilizou-se o modo de aquisição positivo para identificar a presença hormonal de BE, P<sub>4</sub> e DEX nas amostras de leite dos grupos: tratamento, controle e tanque de resfriamento. A P<sub>4</sub> esteve ausente em todas as amostras dos três grupos, independente do dia da coleta (D0, D1, D7, D10 e D24), como demonstra a Tabela 1. Por outro lado, as análises hormonais para DEX foram positivas em todas as amostras de leite induzido e do tanque, até o 24º dia de coleta (Figura 3).

O hormônio BE esteve presente no leite induzido no primeiro dia de coleta, ou seja, no primeiro dia de lactação (Figura 3). Além disso, nenhum resíduo dos hormônios estudados foi identificado em leite do grupo controle. P<sub>4</sub> e DEX estavam ausentes no leite do tanque.

P <sub>4</sub>				DEX				BE			
Dias	GT	C	TQ	Dias	GT	C	TQ	Dias	GT	C	TQ
D0	A	A	A	D0	P	A	P	D0	P	A	A
D1	A	A	A	D1	P	A	P	D1	A	A	A
D7	A	A	A	D7	P	A	P	D7	A	A	A
D10	A	A	A	D10	P	A	P	D10	A	A	A
D24	A	A	A	D24	P	A	P	D24	A	A	A

**Figura 3.** Detecção hormonal nas amostras dos grupos: tratamento (GT), controle (C) e tanque (TQ).

P - Presença; A – Ausência;



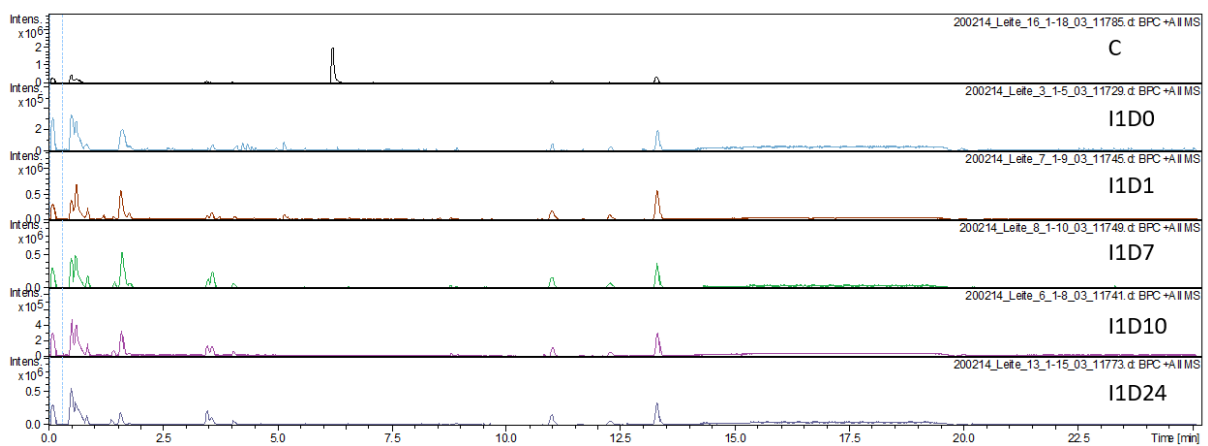
## Análise metabolômica

A análise metabolômica, realizada com amostras de duas vacas do grupo tratamento, uma vaca do grupo controle e do tanque de resfriamento, identificou 39 metabólitos. Os metabólitos identificados foram comparados entre os grupos (Tabela 2). Percebeu-se que apenas 18 deles estavam presentes no leite controle e 10 foram exclusivos das amostras de leite induzido. Dados cromatográficos podem ser visualizados nos gráficos da Figura 5.

**Tabela 2.** Substâncias putativamente identificadas através da extração das amostras de leite. (I1) vaca 1 do grupo tratamento, (I2) vaca 2 do grupo tratamento, (TQ) tanque de resfriamento e (C) controle. (D0) dia 0, (D1) dia 1, (D7) dia 7, (D10) dia 10, (D24) dia 24. Análise por UHPLC-MS/MS em modo positivo.

TR (min)	Composto	Fórmula Molecular	[M+H] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup> Exp	Erro (ppm)	Aduto	Dias de ocorrência				
							D0	D1	D7	D10	D24
13.98	Sphingomyelin (18:1/14:0)	C <sub>37</sub> H <sub>75</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> P	675,5440	675,541	-4,48	M+H	I2	I1, I2, TQ	I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ
3.57	Valerylcarnitine	C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>	246,1705	246,1694	-4,57	M+H	I1, I2, C	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I2, TQ
4.43	Undecaethylene glycol	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O <sub>12</sub>	503,3068	503,3048	-3,88	M+H	I1, I2	-	-	-	-
3.71	Tyr-Leu	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	295,1658	295,1644	-4,68	M+H	I2	I2, TQ	-	-	-
0.85	Propionylcarnitine	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	218,1392	218,1386	-2,87	M+H	I1, I2, C	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ
10.57	Hexadecanamide / Palmitamide	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> NO	256,2640	256,2633	-2,89	M+H	TQ	-	I1	I1, I2	-
4.25	Nonaethylene glycol	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O <sub>10</sub>	415,2543	415,2520	-5,59	M+H	I2	-	-	-	-
9.77	Monopalmitolein (9c)	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	329,2691	329,2682	-2,81	M+H	-	I2, TQ	-	-	TQ
8.13	Monolaurin	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	257,2117	257,2111	-2,18	M+H-H <sub>2</sub> O	-	I1, I2, TQ	I2, TQ	I1, TQ	I2, TQ
11.02	Monoelaidin	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>	339,2899	339,2888	-3,12	M+H-H <sub>2</sub> O	I2	I1, I2, TQ	I2, TQ	I1, TQ	I2, TQ
8.56	Lyso-PC(16:0)	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	496,3402	496,3381	-4,28	M+H	I1, I2, C	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ
4.48	Leu-Trp	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	318,1818	318,1808	-3,04	M+H	-	I2, TQ	I2	-	-
0.66	L-Tyrosine	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	182,0817	182,081	-3,94	M+H	I1, I2	-	-	-	-
2.18	L-Tryptophan	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	205,0976	205,0968	-4,02	M+H	I2	I1, I2	-	-	-
12.26	Glycerol 1-stearate	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	359,3161	359,3145	-4,55	M+H	I1, I2, C	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ
9.49	Glycerol 1-myristate	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	303,2535	303,2526	-3,05	M+H	C	I1, I2, TQ	I2, TQ	I1, TQ	I1, I2, TQ
4.34	Decaethylene glycol	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O <sub>11</sub>	459,2805	459,2785	-4,44	M+H	I1, I2	-	-	-	-
2.13	DL-Indole-3-lactic acid	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	188,0712	188,0703	-4,54	M+H-H <sub>2</sub> O	I1	I1, I2	-	-	-
0.60	Acetyl-DL-carnitine	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>	204,1235	204,123	-2,57	M+H	I1, I2, TQ, C	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ
10.80	Oleamide / 9- Octadecenamide, (Z)-	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	282,2797	282,2788	-3,15	M+H	I1, I2, TQ, C	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ
0.56	4-O-.beta.- Galactopyranosyl-D- mannopyranose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	685,2402	685,2395	-1,06	2M+H	I1, I2, TQ, C	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ
13.32	Erucamide / 13- Docosenamide, (Z)-	C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> NO	675,6766	675,674	-3,89	2M+H	I1, I2, TQ, C	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ
9.75	18:0 LYSO-PE / 1- Stearoyl-2-hydroxy- sn-glycero-3- phosphoethanolamine	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	482,3247	482,3237	-2,00	M+H	-	I1, I2, TQ	I2	-	TQ
9.82	1-Stearoyl-2-hydroxy- sn-glycero-3- phosphocholine	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	524,3715	524,3701	-2,72	M+H	-	I1, I2, TQ	I2	I1, TQ	I2, TQ
8.53	Lyso-PE(16:0) / 1- Palmitoyl-2-hydroxy- sn-glycero-3- phosphoethanolamine	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>7</sub> P	454,2933	454,2924	-2,04	M+H	I2	I1, I2, TQ	I2, TQ	I1, I2, TQ	I2, TQ

7.46	1-Myristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> NO <sub>7</sub> P	468,3089	468,3081	-1,76	M+H	C	I1, I2, TQ	I2, TQ	I1, TQ	TQ
8.77	1-(9Z-Octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> NO <sub>7</sub> P	480,3089	480,3072	-3,59	M+H	I1, I2, C	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ
8.85	1-(9Z-Octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	522,3559	522,3553	-1,20	M+H	I2, C	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ
15.10	1,2-Ditetradecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	C <sub>36</sub> H <sub>72</sub> NO <sub>8</sub> P	678,5073	678,5044	-4,31	M+H	I2	I1	-	I1	-
17.08	1,2-Dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	C <sub>38</sub> H <sub>76</sub> NO <sub>8</sub> P	706,5387	706,538	-0,96	M+H	-	-	-	I1	-
4.08	(-)-Riboflavin	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	377,1460	377,1444	-4,31	M+H	I1, I2, TQ, C	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ
1.42	D-Pantothenic acid	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub>	220,1184	220,1176	-3,75	[M+H]	I2, C	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ
0.55	sn-Glycero-3-phosphocholine	C <sub>8</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>6</sub> P	258,1106	258,1098	-3,20	[M+H]	I1, I2	-	-	-	-
7.88	4-[5-[4-[5-[acetyl(hydroxy)amino]pentylamino]-4-oxobutanoyl]-hydroxyamino]pentylamino]-4-oxobutanoic acid	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	478,2877	478,2902	5,25	M+NH <sub>4</sub>	I2	I1, I2, TQ	I2, TQ	I1, TQ	TQ
10.99	Glyceryl palmitate / 2,3-dihydroxypropyl hexadecanoate	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	331,2848	331,2835	-4,03	M+H	I1, I2, C	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ
11.01	2,4-dihydroxyheptadecyl acetate	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	313,2743	313,2731	-3,70	M-H <sub>2</sub> O+H	I1, I2, C	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ
7.33	Lauryl diethanolamide N,N-bis(2-hydroxyethyl)dodecanamide	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>3</sub>	288,2538	288,2524	-4,94	[M+H] <sup>+</sup>	I1, I2, C	I1, I2	I1, I2	I1	I2
0.58	Lactose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	343,1240	343,1233	-2,11	M+H	I1, I2, TQ, C	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ	I1, I2, TQ
0.73	Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> P	330,0603	330,0591	-3,77	M+H	-	-	I2	I1, I2	I1, I2



**Figura 4.** Cromatogramas de íons totais das extrações de metabólitos de leite utilizando acetoneitrila como solvente após análise por UHPLC-ESI(+)-MS/MS. (C) Amostra de leite do grupo controle; (I1D0) Amostra de leite induzido no dia 0; (I1D1) Amostra de leite induzido no dia 1; (I1D7) Amostra de leite induzido no dia 7; (I1D10) Amostra de leite induzido no dia 10; (I1D24) Amostra de leite induzido no dia 24.

## 4 Discussão

A ausência do hormônio P<sub>4</sub> em todas as amostras analisadas vai de encontro com a inexistência de período de carência preconizado pelos laboratórios farmacológicos. Um estudo mexicano realizado com 32 cabras utilizou um dispositivo interno de liberação hormonal (CIDR) empregado para sincronizar ou induzir estro e ovulação, tendo como dos objetivos analisar os níveis de P<sub>4</sub> residuais no leite de cabras tratadas com CIDR em comparação com o leite de cabras do grupo controle (sem tratamento hormonal), ao final das análises não foram visualizadas diferenças significativas entre os grupos tratamento e controle, concluindo que o leite dos animais tratados seria seguro para o consumo humano (REYES et al., 2012).

Em relação aos hormônios presentes na análise, a detecção de BE apenas no primeiro dia de coleta no leite de vacas tratadas difere da carência estabelecida pelos laboratórios farmacológicos, aproximadamente 10 dias após a última aplicação. A diferença se dá, pois o hormônio foi aplicado pela última vez 7 dias antes do início da ordenha, e depois do oitavo dia já não foi mais detectado. A literatura científica carece de resultados sobre a detecção deste hormônio no leite.

Os laboratórios farmacológicos não especificam período de carência do DEX para o leite, apenas estabelecem um período de 4 dias após a última aplicação para o abate. Ressalta-se que no presente estudo, identificou-se a presença até o 24º dia de lactação, embora a última aplicação de DEX tenha sido no dia 0 (primeiro dia de lactação) demonstrando claramente que o período de carência preconizado para produtos cárneos (4 dias) não se aplica para os lácteos. Pesquisas realizadas com ratos identificaram várias interferências da DEX na fisiologia reprodutiva da prole de machos (JEJE et al., 2016; JEJE; OLA-MUDATHIR; RAJI, 2017).

O estudo de Jeje et al. (2016) investigou a relação da utilização de DEX durante a lactação com o tempo puberal, perfil hormonal sérico e índices de espermatozoides na prole masculina, e constatou indução da puberdade tardia e interrupção das funções reprodutivas, isto devido a alteração das atividades no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal causada pelo hormônio. Posteriormente, o estudo complementar realizado por Jeje, Ola- Mudathir e Raji (2017) concluiu que o tratamento com DEX durante a lactação aumenta a corticosterona sérica dos filhotes machos, induzindo ao estresse oxidativo, o que pode ocasionar infertilidade.

O L-triptofano foi identificado como metabólito apenas no leite induzido. Segundo Foroutan et al. (2019) em bovinos, o L-triptofano está envolvido na via metabólica denominada via do metabolismo do triptofano. Este caracteriza-se como um aminoácido essencial, fornecido pelo leite, precursor da serotonina, hormônio neurotransmissor importante na regulação do sono, apetite, humor e ritmo cardíaco (BERTAZZO; RAGAZZI; VISIOLI, 2016). Porém, existem investigações sobre possíveis efeitos patológicos da elevação dos metabólitos do triptofano (KIM et al., 2019).

Além do L-triptofano, a L-tirosina também é um metabólico exclusivo do leite induzido, no presente estudo. Tratando-se de metabolismo bovino, este composto está envolvido nas vias de síntese do hormônio tireoidiano e do metabolismo da tirosina (FOROUTAN et al., 2019). É um aminoácido essencial, precursor dos neurotransmissores dopamina, noradrenalina e epinefrina, importante em situações de estresse e depressão (KIM et al., 2019). Por outro lado, um estudo com 70 voluntários no Reino Unido realizou um teste com suplementação de tirosina em duas situações, alta carga cognitiva e baixa carga cognitiva, a segunda situação resultou em diminuição do desempenho dos pacientes suplementados. Os autores concluíram que estresse e aumento da demanda cognitiva alteram os efeitos da tirosina (ROBSON; LIM; AQUILI, 2020).

O composto Undecaetileno glicol, identificado apenas em leite induzido, possui como um de seus sinônimos polietileno glicol (KIM et al., 2019). Tratando-se deste metabólito, um estudo recente investigou sua combinação com o composto clorpirifós em carpas, o que resultou em alteração dos padrões sanguíneos quanto a proteína total, nível de glicose, lactato desidrogenase, gama-glutamil transferase e creatina fosfoquinase, causando estresse oxidativo e diminuição das atividade da acetilcolinesterase no plasma (HATAMI; BANAEI; HAGHI, 2019).

Todos estes achados metabólitos (Tabela 3), relatados pela primeira vez neste estudo exploratório, revelam a necessidade de investigar individualmente esses metabólitos produzidos no leite induzido e verificar claramente possíveis associações clínicas e interferência na saúde humana.

**Tabela 3.** Metabólitos identificadas apenas em amostras de leite induzido e do tanque de resfriamento, através de UHPLC-MS/MS.

COMPOSTO	FÓRMULA MOLECULAR	VIAS METABÓLICAS PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS	ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS	OCORRÊNCIA
sn-Glycero-3-phosphocholine	C <sub>8</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>6</sub> P	Metabolismo dos glicerofosfolípeidos Metabolismo lipídico do éter Metabolismo da colina no câncer	Agente neuroprotetor	Induzido Tanque
Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> P	Metabolismo do retinol Via de sinalização de ácido lisofosfatídico LPA6	-	Induzido
1,2-Dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	C <sub>38</sub> H <sub>76</sub> NO <sub>8</sub> P	Metabolismo dos glicerofosfolípeidos	Associado à obesidade	Induzido
1,2-Ditetradecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	C <sub>36</sub> H <sub>72</sub> NO <sub>8</sub> P	Via da biossíntese de fosfolípeidos	-	Induzido
DL-Indole-3-lactic acid	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Metabolismo do triptofano	Irritação cutânea Lesões oculares	Induzido
Decaethylene glycol	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O <sub>11</sub>	-	-	Induzido
L-Tryptophan	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Metabolismo do triptofano	Auxílio para insônia; Auxílio para ansiedade; Auxílio imunológico; Diminuição de espasmos cardíacos;	Induzido
L-Tyrosine	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Metabolismo da tirosina	Regulação do apetite, sono, humor e dor; Antidepressivo; Auxílio para memória; Redução de estresse; Combate à fadiga crônica;	Induzido
Undecaethylene glycol	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O <sub>12</sub>	-	-	Induzido
Sphingomyelin (18:1/14:0)	C <sub>37</sub> H <sub>75</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	Via do metabolismo dos esfingolípeidos	-	Induzido Tanque
Tyr-Leu	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-	-	Induzido Tanque

Hexadecanamide / Palmitamide	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> NO	Metabolismo lipídico	-	Induzido
				Tanque
			Lesões oculares	
			Sonolência	
Nonaethylene glycol	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O <sub>10</sub>	-	Alteração nos sistemas gastrointestinal e urinário	Induzido
Monopalmitolein (9c)	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	-	-	Induzido
				Tanque
Monolaurin	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	-	Lesões oculares	Induzido
				Tanque
Monoelaidin	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>	-	-	Induzido
				Tanque
Leu-Trp	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-	-	Induzido
				Tanque
		Ferroptose		
18:0 LYSO-PE / 1-Stearoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	Via da incorporação de lisolípídeos no ER	-	Induzido
		Via da incorporação lisolípídica no Mitocôndria		Tanque
		Via da incorporação de lisolípídeos no ER		Induzido
1-Stearoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	Via da incorporação lisolípídica no Mitocôndria	-	Tanque
				Induzido
Lyso-PE(16:0) / 1-Palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>7</sub> P	Biossíntese de fosfolípídeos	-	Tanque
				Induzido
4-[5-[[4-[5-[acetyl(hydroxy)amino]pentylamino]-4-oxobutanoyl]-hydroxyamino]pentylamino]-4-oxobutanoic acid	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	-	-	Tanque

Fonte: Kanehisa et al. (2019); Foroutan et al. (2019); Kim et al. (2019).

## 5 Conclusão

A análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução mostrou-se eficiente para detectar os compostos hormonais dexametasona, progesterona e benzoato de estradiol. A utilização do protocolo de indução de lactação resultou em presença de dexametasona no leite do animal e em resíduos no tanque de resfriamento por mais de 20 dias. A progesterona esteve ausente em todo período de lactação estudado, tanto no leite induzido, fisiológico e do tanque de resfriamento. Os resíduos de benzoato de estradiol foram detectados apenas no primeiro dia de lactação das vacas induzidas.

No estudo exploratório dos metabólitos do leite induzido, a metodologia UHPLC-MS/MS proposta foi bem-sucedida. A indução artificial de lactação alterou a dinâmica e o tipo de metabólitos encontrados no leite de vacas submetidas ao protocolo hormonal e no leite presente no tanque de resfriamento ao longo do período de lactação, configurando a presença de metabólitos distintos do leite fisiológico.

A detecção hormonal e/ou a identificação de metabólitos associados devem ser levados em conta para aplicação em novos estudos, pois as alterações fisiológicas/patológicas são importantes informações para tomadas de

decisões quanto ao período de carência, a segurança do bem-estar do animal, para a qualidade e segurança do leite, bem como para a sustentabilidade da cadeia produtiva do leite. Após este estudo exploratório seria de suma importância a realização de estudos de quantificação dos metabólitos distintos detectados.

## Referências

- ADAMSKI, J.; SUHRE, K. Metabolomics platforms for genome wide association studies—linking the genome to the metabolome. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.39-47, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2012.10.003>.
- AKERS, R. M. A 100-Year Review: Mammary development and lactation. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 100, n. 12, p.10332-10352, dez. 2017. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-12983>.
- BAYNES, R. E. et al. Health concerns and management of select veterinary drug residues. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 88, p.112-122, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.12.020>.
- BERTAZZO, A.; RAGAZZI, E.; VISIOLI, F. Evolution of tryptophan and its foremost metabolites' concentrations in milk and fermented dairy products. **Pharmanutrition**, [s.l.], v. 4, n. 2, p.62-67, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phanu.2016.02.002>.
- BÖHME, K. et al. Recent applications of omics-based technologies to main topics in food authentication. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 110, p.221-232, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.005>.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Portaria nº. 124 de 23 set. 1991, **Aprova métodos analíticos qualitativo e quantitativo de detecção de soro em leite**. In: Diário Oficial da União, 20 nov. 1991, p.26245-6.
- CHAKRIYARAT, S. et al. Induction of lactation: Lactational, physiological, and hormonal responses in the bovine. **Journal Of Dairy Science**, v.61, p.1715-1724, 1978.
- COHICK, W. S. Physiology and endocrinology symposium: Effects of insulin on mammary gland differentiation during pregnancy and lactation1. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 94, n. 5, p.1812-1820, 1 maio 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2015-0085>.
- DAVIS, S. R. et al. Induction of lactation in nonpregnant cows by estradiol-17 $\beta$  and progesterone from an intravaginal sponge **Journal Of Dairy Science**, v.66, p.450-457, 1983.
- DERVILLY-PINEL, G. et al. Analytical strategies to detect use of recombinant bovine somatotropin in food-producing animals. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 53, p.1-10, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2013.08.006>.
- ECCO, D. L. M.; BERBER, R. C. A. Indução Artificial da Lactação em Bovinos Leiteiros: Revisão. **Scientific Electronic Archives**, v. 6, p. 67-80, 2014.
- FAO. 2019 **Food Outlook** - Biannual Report on Global Food Markets – November 2019. Rome.
- FAUDEUR, G. et al. Transgenic Artifacts Caused by Passenger Human Growth Hormone. **Trends In Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 29, n. 10, p.670-674, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2018.05.005>.
- FONTANESI, L. Metabolomics and livestock genomics: Insights into a phenotyping frontier and its applications in animal breeding. **Animal Frontiers**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.73-79, 1 jan. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.2527/af.2016-0011>.

- FOROUTAN, A. et al. The Chemical Composition of Cow's Milk. **J Agric Food Chem**, 2019 May 1;67(17):4897-4914 30994344.
- FORSYTHE, I. J.; WISHART, D. S. Exploring human metabolites using the human metabolome database. **Current protocols in bioinformatics**, v.25, n.1, 2009.
- FREITAS, P. R. C. et al. Artificial induction of lactation in cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s.l.], v. 39, n. 10, p.2268-2272, out. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-35982010001000024>.
- GROSS, J.; BRUCKMAIER, R. Invited review: Metabolic challenges and adaptation during different functional stages of the mammary gland in dairy cows. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 102, n. 4, p.2828-2843, abr. 2019. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2018-15713>.
- HATAMI, M.; BANAEI, M.; HAGHI, B. N. Sub-lethal toxicity of chlorpyrifos alone and in combination with polyethylene glycol to common carp (*Cyprinus carpio*). **Chemosphere**, [s.l.], v. 219, p.981-988, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.077>.
- HORAI, H. et al. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal of mass spectrometry**, v.45, n.7, p.703-714, 2010.
- JEJE, S. O. et al. Maternal treatment with dexamethasone during lactation delays male puberty and disrupts reproductive functions via hypothalamic-pituitary-gonadal axis alterations. **Pathophysiology**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.43-49, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pathophys.2015.12.002>.
- JEJE, S. O.; OLA-MUDATHIR, F. K.; RAJI, Y. Experimental maternal treatment with dexamethasone during lactation induces neonatal testicular and epididymal oxidative stress; Implications for early postnatal exposure. **Pathophysiology**, [s.l.], v. 24, n. 4, p.261-265, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pathophys.2017.06.002>.
- JOHNSON, R. The U.S.-EU Beef Hormone Dispute. **Congressional Research Service**, jan. 2017.
- KANEHISA, M. et al. New approach for understanding genome variations in KEGG. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 47, n. 1, p.590-595, 13 out. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky962>.
- KENSINGER, R. S. Induced Lactation. **Reference Module In Food Science**, [s.l.], 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00845-3>.
- KERSLAKE, J. et al. Economic costs of recorded reasons for cow mortality and culling in a pasture-based dairy industry. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 101, n. 2, p.1795-1803, fev. 2018. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13124>.
- KIM, S. et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. **Nucleic Acids Res**. 2019 Jan 8; 47(D1):D1102-1109. doi:10.1093/nar/gky1033.
- LAKHANI, P. et al. Artificial Induction of Lactation in Bovines: Scope and Limitations. **International Journal Of Livestock Research**, [s.l.], p.102-112, 2017. ScopeMed International Medical Journal Management and Indexing System. <http://dx.doi.org/10.5455/ijlr.20170324031735>.
- MAFFI, A. S. et al. Induction of lactation: an economic study of tool for dairy heifers with successive reproductive failures. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 49, n. 12, 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20180661>.
- MARTINS, J. P. N. et al. Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F<sub>2α</sub> of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 94, n. 6, p.2815-2824, jun. 2011. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3652>.
- NAGARAJA, K. et al. Comparative assessment of different parameters in lactation induced repeat breeding heifers vs. natural lactation nulliparous heifers. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v.8, n. 6, p. 1434-1447, 2019.

- NACHMAN, K. E.; SMITH, T. J. S. Hormone Use in Food Animal Production: Assessing Potential Dietary Exposures and Breast Cancer Risk. **Current Environmental Health Reports**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.1-14, 8 fev. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40572-014-0042-8>.
- OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E.; JAYARAO, B. M. Impact of Antibiotic Use in Adult Dairy Cows on Antimicrobial Resistance of Veterinary and Human Pathogens: A Comprehensive Review. **Foodborne Pathogens And Disease**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.337-355, mar. 2011. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2010.0730>.
- OLIVEIRA, G. R. et al. Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da UFG. **Determinação de fraude de leite com soro (ácido siálico) - Método colorimétrico adaptado**, 1998.
- OLIVEIRA, M. L.; FERREIRA, C. Indução da lactação em vacas. **Alm. Med. Vet. Zoo**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.1-7, 2 jun. 2016.
- PESTANO, H. S. et al. Indução artificial de lactação em bovinos: histórico e evolução. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.39, n.3, p.315-321, jul./set. 2015.
- PRADÈRE, J. P. Links between livestock production, the environment and sustainable development. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz**, [s.l.], v. 3, n. 33, p.765-781, 2014.
- REYES, J. M. et al. Progesterone concentrations in milk of CIDR-treated goats. **Small Ruminant Research**, [s.l.], v. 106, n. 2-3, p.178-180, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.03.017>.
- ROBSON, A.; LIM, L. W.; AQUILI, L. Tyrosine negatively affects flexible-like behaviour under cognitively demanding conditions. **Journal Of Affective Disorders**, [s.l.], v. 260, p.329-333, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2019.09.031>.
- SAWADA, Y. et al. Tandem mass spectral database (ReSpect) for phytochemicals: a plant-specific MS/MS-based data resource and database. **Phytochemistry**, v.82, p.38-45, 2012.
- SCHEUBERT, K. et al. Significance estimation for large scale metabolomics annotations by spectral matching. **Nature communications**, v.8, n. 1, p. 1-10, 2017.
- SILVA, S.; KANUGALA, K.; WEERAKKODY, N. Microbiological Quality of Raw Milk and Effect on Quality by Implementing Good Management Practices. **Procedia Food Science**, [s.l.], v. 6, p.92-96, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.profoo.2016.02.019>.
- SMITH, K. L.; SCHANBACHER, F. L. Hormone induced lactation in the bovine. I. Lactational performance following injections of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone1. **Journal Of Dairy Science**, v.56, p.738-743, 1973.
- STEIN, S. The NIST 14 mass spectral library. **Gaithersburg, MD: National Institute of Standards and Technology**, 2014.
- SUN, H.; GUAN, L. L. Feedomics: Promises for food security with sustainable food animal production. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 107, p.130-141, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2018.07.025>.
- SWAIN, M. et al. Reducing the environmental impact of global diets. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 610-611, p.1207-1209, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.125>.
- TRUCHET, S.; HONVO-HOUÉTO, E. Physiology of milk secretion. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 31, n. 4, p.367-384, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2017.10.008>.
- XI, X. et al. Ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry MSE-based untargeted milk metabolomics in dairy cows with subclinical or clinical mastitis. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 6, p. 4884-4896, 2017.



XU, Q. B. et al. Decrease of lipid profiles in cow milk by ultra-high-temperature treatment but not by pasteurization. **Journal of Dairy Science**, v, 103, n, 2, p, 1900-1907, 2020.

## 4. NORMAS DO ARTIGO

### Formato dos artigos

Relatórios Científicos publica pesquisa original em um formato, Artigo. Na maioria dos casos, não impomos limites estritos à contagem de palavras ou ao número da página. No entanto, incentivamos os autores a escrever de forma concisa e a seguir as diretrizes abaixo.

Os artigos devem idealmente ter no máximo 11 páginas compostas. Como guia, o texto principal (não incluindo Resumo, Métodos, Referências e legendas das figuras) deve ter no máximo 4.500 palavras. O comprimento máximo do título do artigo é de 20 palavras. O Resumo - que deve ter no máximo 200 palavras e não conter referências - deve servir como uma introdução geral ao tópico e como um breve resumo não técnico dos principais resultados e suas implicações.

Para o corpo principal do texto, não há requisitos explícitos para a organização da seção. De acordo com a preferência dos autores, o texto pode ser organizado da forma mais adequada à pesquisa. Como orientação e, na maioria dos casos, recomendamos que você estruture seu manuscrito da seguinte forma:

- Introdução
- Resultados (com subposições)
- Discussão (sem subtítulos)
- Métodos

Uma ordem específica para o corpo principal do texto não é obrigatória e, em alguns casos, pode ser apropriado combinar seções. As legendas das figuras são limitadas a 350 palavras. Como diretriz, as referências devem ser limitadas a 60 (isso não é rigorosamente imposto). Notas de rodapé não devem ser usadas.

Sugerimos que os artigos contenham mais de 8 itens de exibição ( figuras e / ou tabelas ). Além disso, um número limitado de gráficos de estrutura molecular não legendada e equações matemáticas numeradas pode ser incluído, se necessário. Para permitir a tipografia dos papéis, o número de itens de exibição deve ser proporcional ao tamanho da palavra - sugerimos que, para artigos com menos de 2.000 palavras, não sejam incluídos mais de 4 figuras / tabelas. Observe que os esquemas não são utilizados e devem ser apresentados como figuras.

Os autores devem fornecer uma declaração de interesses concorrentes no arquivo do manuscrito.

As inscrições devem incluir uma carta de apresentação, um arquivo de texto manuscrito, arquivos de figuras individuais e arquivos de informações suplementares opcionais. Para as primeiras submissões (ou seja, manuscritos não revisados), os autores podem incorporar o texto e as figuras do manuscrito em um único arquivo com tamanho de até 3 MB; as figuras podem ser inseridas no texto nas posições apropriadas ou agrupadas no final. Informações complementares devem ser combinadas e fornecidas como um único arquivo separado, de preferência em formato PDF.

Os seguintes tipos de arquivo podem ser carregados para o texto do artigo:

txt, doc, docx, tex, (pdf [somente os primeiros envios]) \*

\* Não podemos aceitar arquivos PDF para o texto do artigo para manuscritos revisados.

Um modelo de envio está disponível na galeria de modelos Overleaf para ajudá-lo a preparar um manuscrito LaTeX dentro dos critérios de formatação de Relatórios Científicos .

Relatórios científicos é lido por cientistas de diversas origens. Além disso, muitos não são falantes nativos de inglês. Os autores devem, portanto, refletir cuidadosamente sobre como suas descobertas podem ser comunicadas claramente. Embora um conhecimento básico compartilhado da ciência possa ser assumido, lembre-se de que a linguagem e os conceitos que são padrão em um campo podem não ser familiares para não especialistas. Assim, o jargão técnico deve ser evitado e explicado claramente onde seu uso é inevitável.

Abreviaturas, particularmente aquelas que não são padrão, também devem ser reduzidas ao mínimo. Onde inevitável, abreviações devem ser definidas no texto ou legendas na primeira ocorrência e abreviações devem ser usadas posteriormente. Os antecedentes, justificativa e principais conclusões do estudo devem ser claramente explicados. Títulos e resumos em particular devem ser escritos em linguagem que seja prontamente inteligível para qualquer cientista. É altamente recomendável que os autores solicitem a um colega com experiência diferente que reveja o manuscrito antes da submissão, a fim de identificar conceitos e terminologia que possam apresentar dificuldades para leitores não especialistas.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução mostrou-se eficiente para detectar os compostos hormonais dexametasona, progesterona e benzoato de estradiol. A utilização do protocolo de indução de lactação resultou em presença de dexametasona no leite do animal e em resíduos no tanque de resfriamento por mais de 20 dias. A progesterona esteve ausente em todo período de lactação estudado, tanto no leite induzido, fisiológico e do tanque de resfriamento. Os resíduos de benzoato de estradiol foram detectados apenas no primeiro dia de lactação das vacas induzidas.

No estudo exploratório dos metabólitos do leite induzido, a metodologia UHPLC-MS/MS proposta foi bem-sucedida. A indução artificial de lactação alterou a dinâmica e o tipo de metabólitos encontrados no leite de vacas submetidas ao protocolo hormonal e no leite presente no tanque de resfriamento ao longo do período de lactação, configurando a presença de metabólitos distintos do leite fisiológico.

A detecção hormonal e/ou a identificação de metabólitos associados devem ser levados em conta para aplicação em novos estudos, pois as alterações fisiológicas/patológicas são importantes informações para tomadas de decisões quanto ao período de carência, a segurança do bem-estar do animal, para a qualidade e segurança do leite, bem como para a sustentabilidade da cadeia produtiva do leite. Após este estudo exploratório seria de suma importância a realização de estudos de quantificação dos metabólitos distintos detectados.