

Determinación de dietilestilbestrol, zeranol y trembolona en carne de pollo de origen nacional e importado

Determination of diethylstilbestrol, zeranol and trenbolone in chicken meat of national and imported origin

Edgar Fernando Peña-Torres^{1*} ,
Asahel Benitez-Hernández² ,
Sergio Erick García-Barrón³ ,
Omar Aristeo Peña-Morán⁴ ,
Gabriel Ángel Montero-Lara⁴ 

¹Universidad Tecnológica de Chetumal, Carretera Chetumal-Bacalar KM 5.3, CP. 77040. Chetumal, Quintana Roo, México.

²Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Paseo Claussen S/N, Colonia Los Pinos, CP. 80000, Mazatlán, Sinaloa, México.

³Tecnología Alimentaria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Av. Normalistas 800, Colinas de La Normal, CP. 44270. Guadalajara, México.

⁴División de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Quintana Roo, Av. Erick Paolo Martínez S/N, 17 de Octubre, CP. 77039. Chetumal, Quintana Roo, México.

* Autor de correspondencia:
edgar.pena@utchetumal.edu.mx

Nota científica

Recibida: 25 de abril 2023

Aceptada: 27 de septiembre 2023

Como citar: Peña-Torres EF, Benitez-Hernández A, García-Barrón SE, Peña-Morán OA, Montero-Lara GA (2023) Determinación de dietilestilbestrol, zeranol y trembolona en carne de pollo de origen nacional e importado. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios Núm. Esp. III: e3709. DOI: 10.19136/era.a10nIII.3709

RESUMEN. El objetivo fue identificar la presencia y concentración de las hormonas Dietilestilbestrol (DES), zeranol y acetato de trembolona en muestras de pechuga de pollo de origen local e importado por ensayo inmunoenzimático. Se utilizaron 72 muestras de pechuga de origen nacional y 72 de origen importado, y se detectó la presencia de zeranol y trembolona en ambas muestras, el compuesto DES no fue detectado en ninguna de las pechugas evaluadas. Las concentraciones de zeranol entre la carne de origen nacional e importado se encontraron por debajo de las normas mexicanas y no mostraron diferencias estadísticas entre ellos. La presencia de acetato de trembolona estuvo por debajo de los límites permitidos por las normas mexicanas. Los resultados sugieren que es necesario regular de forma rutinaria las prácticas de las granjas avícolas, ya que un mal uso de dosis efectivas de estos compuestos pueden ser un riesgo para la salud del consumidor.

Palabras clave: Inmunoensayo, Norma Oficial Mexicana, pechuga de pollo, salud humana.

ABSTRACT. The objective was to identify the presence and concentration of the hormones Diethylstilbestrol (DES), zeranol and trenbolone acetate using an immunoenzymatically assay in local and imported chicken breast samples. 72 samples of breast of local and 72 samples of imported origin were used, zeranol and trenbolone were detected of local and imported meat; the hormone DES was not detected in any samples analyzed. Zeranol concentrations for local and imported were below to the Mexican regulations, furthermore, they did not show statistical differences between them. The presence of trenbolone acetate was found to be below the limits allowed by the Mexican regulations. The results suggest that it is necessary a regulation of poultry farms to avoid inadequate doses that can be a risk for the health of the consumer.

Key words: Chicken breast, human health, growth promoters, immunoassay, Official Mexican Regulation.

INTRODUCCIÓN

La producción de carne de pollo es una práctica pecuaria que utiliza diferentes estrategias para cubrir la creciente demanda del consumidor. Por lo que una estrategia es el uso de promotores de crecimiento ya sea de origen natural o sintético, con el fin de acelerar los procesos de crecimiento, aumentar la producción de carne y reducir los costos de alimentación (Peña-Torres *et al.* 2022). Sin embargo, las dosis y los periodos de retiro de estos compuestos son ineficientes y los residuos pueden encontrarse en carne y vísceras y pueden ser un riesgo para la salud humana (Rivera-Alegría *et al.* 2018). Entre los compuestos utilizados como promotores de crecimiento en pollos se encuentra el acetato de trembolona, zeranol y dietilestilbestrol (DES), entre otros (Hirpessa *et al.* 2020). Estas hormonas se definen como mensajeros químicos de origen natural o sintético que coordinan las actividades en células blanco (Qaid y Abdoun 2022). En este sentido DES, zeranol, y acetato de trembolona, son compuestos con actividad anabólica del grupo de los estilbénicos y no estilbénicos con propiedades fisiológicas análogas a los esteroides sexuales naturales. Sin embargo, se han detectado efectos fisiológicos negativos como hiperestrogenismo, reducción de fertilidad, trastornos en el desarrollo, inclusive se han catalogado como potenciadores de cáncer, específicamente cáncer de mama y útero (Tan *et al.* 2020). Otro reporte indica una relación directa del dietilestilbestrol con la prevalencia a la aparición de adenocarcinoma en vagina y cérvix, además de otras patologías relacionadas (White *et al.* 2022). Como antecedente, en 1989, la Unión Europea prohibió el uso de anabólicos en animales productivos de carne y huevo con el propósito de preservar la seguridad e inocuidad alimentaria; por su parte en América se utilizan de forma rutinaria los compuestos como testosterona, acetato de trembolona y zeranol, apoyados de normas oficiales que indique los límites máximos permitidos en carne y vísceras (Orihuela y Ungerfeld 2020). Por lo que es recomendable evaluar la presencia de hormonas, conocer los límites de seguridad y establecer los riesgos que ocurren por la ingesta de carne y/o

vísceras de animales tratados con hormonas de tipo esteroideo y otras sustancias para proteger al consumidor (Suleman *et al.* 2022). Con base a lo anterior, el objetivo de este trabajo de investigación fue identificar la presencia y concentración de las hormonas Dietilestilbestrol (DES), zeranol y acetato de trembolona en muestras de pechuga de pollo de origen local e importado por ensayo inmunoenzimático.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron 144 muestras al azar de pechuga de pollo congeladas con una fecha de empaque de máximo 3 días; donde 72 fueron de origen nacional y 72 de Estados Unidos. Los supermercados fueron seleccionados a través de un muestreo por conveniencia, considerando aquellos establecimientos que tuvieran en existencia pechuga de pollo de origen nacional y estadounidense. Además, se seleccionaron los supermercados más cercanos al laboratorio de estudio para un rápido traslado y almacenamiento. Una vez trasladadas las muestras al laboratorio se congelaron a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. El cálculo de tamaño de muestra se obtuvo a partir de la fórmula descrita por Villavicencio (2017) a un nivel del 95% de confianza; obteniéndose un número de muestra de 68.

Extracción

Las pechugas se colocaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 horas antes del análisis. La metodología de extracción se realizó de acuerdo con el protocolo de Ridascreen[®]. Para zeranol se homogeneizaron aproximadamente 10 g de muestra y se tomó 1 g para transferirla a un tubo de ensayo con 4 mL de acetonitrilo y se agitó en vortex hasta que la solución fuera una emulsión homogénea, posteriormente se centrifugó a 2 500 g por 10 min. El sobrenadante se colocó en un tubo de 50 mL y se evaporó la fase líquida con nitrógeno, consecuentemente se agregó 100 μL de metanol al 100% y se agitó por 1 min para finalmente obtener una alícuota de 50 μL .

Para la extracción de acetato de trembolona se homogenizaron 10 g de muestra con 10 mL de buffer PBS 67 mM, posteriormente se agitó 5 min en vortex

y se tomaron 2 g de la muestra para homogenizar con 5 mL de terbutilmetiléter, se centrifugó por 10 min a 3 000 g a 10 °C; después se realizó el mismo proceso de extracción con 5 mL de terbutilmetiléter y finalmente se evaporó con nitrógeno y se disolvió la muestra en 1 mL de metanol al 80% y 2 mL de tampón PBS 20 mM.

Para extracción de DES se pesó 1 g de carne y homogenizó con 5 mL de acetato de etilo y centrifugó por 5 min a 4 000 g, se tomaron 2.5 mL de la capa superior y se trasladaron a un tubo nuevo para evaporar con nitrógeno, seguido se disolvió la muestra con 400 μ L de metanol y se agitó con el vórtex por 10 seg, después se añadieron 600 μ L de buffer tampón y se agitó en vórtex por 1 min, se centrifugó por 5 min a 4 000 g y 50 μ L del extracto se diluyeron con 150 mL de solución buffer. Las muestras hidrolizadas de las tres hormonas se purificaron mediante la columna C18 de acuerdo con el protocolo de Ridascreen®.

La determinación cuantitativa de DES, zeranól y acetato de trembolona se realizó mediante el inmunoensayo en microplaca con el kit comercial de ELISA (Ridascreen®, R-Biopharm, Darmstadt, Germany) en los cuales los contenedores de la microplaca se encontraban recubiertos con la proteína conjugada para cada hormona en específico. Se tomaron 25 μ L de muestra por duplicado y en la microplaca se adicionó en orden lo siguiente, la muestra, el anticuerpo de zeranól, acetato de trembolona o DES, un conjugado de anticuerpo marcado con enzima, el sustrato y el cromógeno, posteriormente se evaluó en el espectrofotómetro (ELISA Ophys MR - Dynex) a 450 nm de absorbancia. Para la estandarización se realizó una curva de calibración con concentraciones de 0.001, 0.003, 0.006, 0.009, 0.012, 0.015, 0.018 y 0.021 de la hormona a analizar la cual se midió a una absorbancia a 450 nm y se calculó la pendiente, y los resultados se expresaron en partes por billón (ppb).

Análisis de datos

Se realizó un análisis descriptivo de los datos, donde se evaluó la frecuencia de muestras con la hormona. Además, se analizó la normalidad de los datos bajo la prueba de Kolmogórov-Smirnov y

una vez comprobada la normalidad de los datos, se realizó una prueba de hipótesis para dos muestras independientes donde se comparó la concentración de hormonas en pechugas de origen nacional e importado a un nivel de significancia del 95%. Todos los datos fueron analizados en el programa estadístico NCSS versión 2006.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Zeranól se encontró presente en el 100% (n = 72) de las pechugas de pollo de origen nacional, y en la carne de origen importado se detectó en un 83.3% (n = 60) de las pechugas. Mientras que acetato de trembolona, se detectó una presencia en la carne de origen nacional e importado del 87.5% (n = 63) y 94.4% (n = 68), respectivamente (Tabla 1). Para la DES, no se detectó en ninguna de las muestras analizadas. Existe información sobre la evaluación de estos compuestos en pechuga de pollo. La presente investigación coincide con un estudio realizado por Ibrahim *et al.* (2018), quienes reportan la presencia de zeranól en el 100% de la carne de pollo en concentración inferior a las 2 ppb. Otro estudio realizado en carne de res y productos cárnicos en Turquía reporta la presencia de zeranól en el 100% de las muestras, trembolona en el 80% de las muestras, y DES en el 35% de las muestras (Nazli *et al.* 2005), lo que demuestra que, a pesar de las regulaciones internacionales y la prohibición en países de la Unión Europea, dichos compuestos se siguen utilizando de forma deliberada o clandestina en la producción animal. Mientras que Parmar *et al.* (2021), reportan que 2 o 3 meses después del implante de trembolona, los residuos aún estaban presentes en la carne. Otro estudio en un mercado de Egipto, en muestras de carne de hamburguesa de res y sus embutidos detectó zeranól con valores promedio de 0.37 ppb y acetato de trembolona en promedio de 0.14 ppb (Mehawed *et al.* 2021). Por ello, tomando en cuenta el presente estudio y las evidencias a través de diferentes países, la técnica de ELISA es efectiva para detectar de forma rápida y en ese sentido regular el uso y estudiar más a fondo la farmacocinética y farmacodinamia en la salud humana y animal.

Tabla 1. Porcentaje y frecuencias de muestras de residuos en carne de pechuga de pollo.

Hormona	% Nacional	% Importado
Zeranol	100% (72)	83.3% (60)
Acetato de Trembolona	87.5% (63)	94.4% (68)
Dietilstilbestrol	0% (0)	0%, (0)

n = 72.

Para las concentraciones de zeranol y acetato de trembolona en muestras de origen nacional e importado, no se encontraron diferencias estadísticas en las concentraciones de zeranol entre los grupos evaluados ($p > 0.05$) donde las medias fueron de 0.0124 y 0.0162 ppb para la carne de origen nacional e importado, respectivamente. Por otro lado, tomando en cuenta la presencia de acetato de trembolona en las muestras, la comparación de medias encontró una concentración significativamente mayor en las muestras de pechuga de pollo nacional respecto a la de Estados Unidos con medias de 0.006 ppb y 0.002 ppb, respectivamente ($p < 0.05$) (Figura 1).

Con base a los resultados de concentración de hormonas, en los Estados Unidos se encuentra prohibido el uso de estilbenos, mientras que el zeranol se permite, siempre y cuando los residuos de tejido muscular no sobrepasen el valor máximo de 2 ppb (Widiastuti y Anastasia, 2020). Para las Normas Oficiales Mexicanas, se indica un límite máximo permitido de 0.05 ppm para zeranol y acetato de trembolona, lo cual es mayor a lo encontrado en el presente estudio y se podría establecer que las pechugas de pollos evaluadas de ambos orígenes cumplen con los límites permitidos por la norma en México, y son aptas para consumo humano (SG 1994). En el caso de DES, la norma mexicana no permite su uso a ninguna dosis y en los resultados del presente estudio cumplen lo regulado por la norma oficial (SG 1994). Como se muestra en los resultados para zeranol y acetato de trembolona, se obtuvieron valores inferiores a los niveles permitidos por las normas de la Comisión Europea y las Normas Oficiales Mexicanas. Sin embargo, la presencia de dichos compuestos sugiere que se debe continuar monitoreando y regulando el uso de zeranol y acetato de trembolona en la cría de animales, su control en la carne y derivados tanto en México como en el mate-

rial de importación que llega desde Estados Unidos.

La carne y sus productos derivados forman un papel importante en la nutrición humana, por lo que se sugiere que deben ser inocuos y no contener sustancias perjudiciales para la salud humana o al menos cumplir con los límites establecidos por las entidades gubernamentales. Sin embargo, los agentes anabólicos que se usan con diferentes fines en la crianza de animales con fines zootécnicos, tienden a dejar residuos en carne y vísceras, por lo tanto, un consumo continuo de estos productos puede conllevar a la aparición de problemas en la salud del consumidor (Al-Amri *et al.* 2021). En este sentido, la Comunidad Económica Europea (CEE) desde 1985 prohibió el uso de compuestos anabólicos como aceleradores del crecimiento en animales destinados al consumo humano, mientras que la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) permite el uso regulado de algunas hormonas de origen natural como testosterona y estradiol y otras sintéticas como zeranol y trembolona (Qaid y Abdoun 2022). La Organización Mundial de la Salud estableció que los residuos de zeranol y acetato de trembolona no deben exceder de las 2 ppb en carne y 10 ppb en vísceras (Codex Alimentarius 2004).

Cabe reiterar que el uso de compuestos de tipo hormonal o cualquier derivado de estos está prohibido en la Unión Europea (Valenzuela-Grijalva *et al.* 2017). Esta prohibición está sustentada con evidencia científica sobre efectos negativos o nocivos a la salud por el consumo de productos hormonales como, el incremento de incidencia de cáncer de mama, cervicouterino y enfermedades reproductivas como el ovario poliquístico, hiperestrogenismo e infertilidad (Qaid y Abdoun 2022). En el caso de zeranol y sus metabolitos como zearalenona tiene un efecto carcinogénico y mayor incidencia a la proliferación de tumores en el lóbulo anterior de la glándula pituitaria, debido a las propiedades estrogénicas del zeranol (Ben-Jonathan 2019). También se reporta que el acetato de trembolona a dosis de 80 μg al día en ratones, tiene efecto negativo en el desarrollo gonadal y neurológico, además de la inhibición en la secreción de hormonas endógenas y la disminución de la formación de la vaina de mielina a nivel

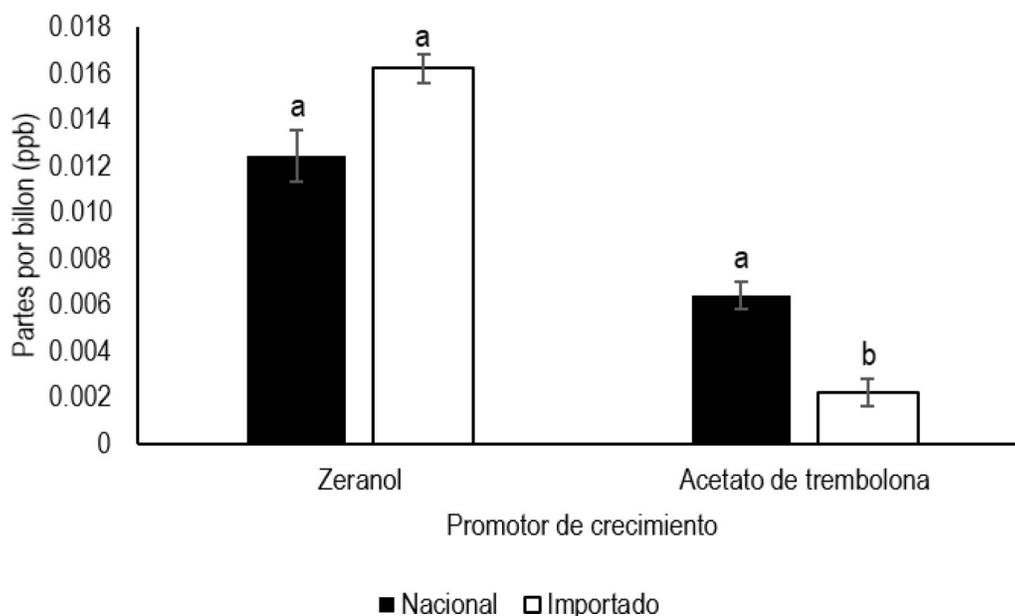


Figura 1. Concentración de zeranol y acetato de trembolona en pechuga de pollo. a, b = Literales diferentes indican significancia estadística ($P < 0.05$). $n = 72$.

neurológico (Zhang *et al.* 2020). También, se reporta que existen efectos hormonales negativos del acetato de trembolona en deportistas como la reducción de los niveles de testosterona, se redujo el peso de los testículos, ovarios y úteros; atrofia de las células intersticiales testiculares; supresión de la actividad ovárica; ausencia de desarrollo glandular del endometrio uterino; y falta de desarrollo alveolar y secreción en las glándulas mamarias (Bhasin *et al.* 2021). Por otra parte, debido que dietilestilbestrol es potencialmente cancerígeno y no es metabolizado por el organismo, por ello se prohíbe su uso en animales de engorda y no se permite su presencia en los alimentos, debido que la exposición a esta sustancia en el organismo aumenta el riesgo de displasia de cuello uterino y de adenocarcinoma de células en la vagina y el cuello uterino (Saltos *et al.* 2019).

El método de ELISA, es una técnica rápida y práctica para la detección de residuos en alimentos y sus derivados, además que se encuentra recomendada por la Unión Europea. Al respecto, Yin *et al.* (2020) evaluaron la eficacia de la técnica de ELISA en residuos de zeranol, β -zearalanol, α -zearalenol, β -zearalenol y zearalenone en carne de bovino; y de-

tectaron la presencia de estos compuestos por debajo de los límites permitidos, y una adecuada eficacia ya que se reportaron correlaciones por encima de 0.98. En este sentido, los resultados son de importancia, ya que se brinda información sobre la presencia y concentración de hormonas a través de una técnica válida. El riesgo a la salud del consumidor al usar estos fármacos en animales con fines zootécnicos está dirigido hacia la posibilidad que los residuos se encuentren presentes en el alimento y un riesgo mayor se podría considerar a que su actividad biológica pueda preservarse, inclusive si dicho alimento se somete a condiciones extremas de temperatura como la cocción o el freído (Darbre 2019).

El presente estudio se centró en probar técnica la detección y cuantificación rápida de hormonas en carne fresca bajo la técnica de ELISA, lo cual se cumplió, ya que existe poca información sobre métodos efectivos que evalúen la residualidad de hormonas específicamente en carne y productos cárnicos, además de ser costosas y de un procesamiento tardado para las empresas que lo solicitan. Con base a los hallazgos donde en el 100% de las muestras se detectó zeranol y un 87% de trembolona,

muestra un probable riesgo de efectos secundario para el consumidor, por ello se recomienda seguir un monitoreo constante para la inspección sanitaria de la carne desde la granja hasta el sitio de venta, incluso de la carne proveniente de Estados Unidos. Adicionalmente, es de importancia fomentar una cultura de la concientización a las empresas, medianos

y pequeños productores sobre los posibles efectos adversos de los promotores de crecimiento de origen sintético y con base a ello buscar alternativas naturales en producción animal como los fitoquímicos esto con la finalidad de resguardar la salud del consumidor y ofrecer productos inocuos al público.

LITERATURA CITADA

- Al-Amri I, Kadim IT, AlKindi A, Hamaed A, Al-Magbali R, Khalaf S, Al-Hosni K, Mabood F (2021) Determination of residues of pesticides, anabolic steroids, antibiotics, and antibacterial compounds in meat products in Oman by liquid chromatography/mass spectrometry and enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary World* 14: 709-720.
- Ben-Jonathan N (2019) Endocrine disrupting chemicals and breast cancer: The saga of bisphenol A BT - estrogen receptor and breast Cancer. In: Zhang X (ed) *Cancer drug discovery and development*. Humana Press. Unites States. pp: 343-377.
- Bhasin S, Hatfield D, Hoffman JR, Kraemer W, Labotz M, Phillips S, Ratamess N (2021) Anabolic-androgenic steroid use in sports, health, and society. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 53: 1778-1794.
- Codex Alimentarius (2004) Food and nutrition division. *FAO/WHO Food Standards*. Roma, Italy. 81p.
- Darbre PD (2019) The history of endocrine-disrupting chemicals. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research* 7: 26-33.
- García-López JC, Álvarez-Fuentes G, Rangel H (2022) Hormonas y antibióticos en la carne de pollo: ¿mito o realidad?. *Revista Universitarios Potosinos* 269: 1-4. <https://leka.uaslp.mx/index.php/universitarios-potosinos/article/view/294/185>. Fecha de consulta: 30 de mayo de 2023
- Hirpessa BB, Ulusoy BH, Hecer C (2020) Hormones and hormonal anabolics: Residues in animal source food, potential public health impacts, and methods of analysis. *Journal of Food Products* 2: 20-21.
- Ibrahim HM, Amin RA, Diab OM, Hassan AE (2018) Survey on some hormonal residues in chicken meat, liver and kidneys. *Benha Veterinary Medical Journal* 34: 23-30.
- Mehawed E, Hasan MA, Ibrahim HM (2021) Chemical residues in burger and sausage meat products. *Benha. Veterinary Medical Journal* 40: 161-164.
- Nazli B, Çolak H, Aydin A, Hampikyan H (2005) The presence of some anabolic residues in meat and meat products sold in Istanbul. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 29: 691-699.
- Orihuela A, Ungerfeld R (2020) *Prácticas zootécnicas dolorosas*. 1ra edición. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 207p.
- Parmar JK, Chaubey KK, Gupta V, Bharath M N (2021) Assessment of various veterinary drug residues in animal originated food products. *Veterinary World* 14: 1650-1664.
- Peña-Torres E, Castillo C, Jiménez-Estrada I, Muhlia-Almazán A, Peña-Ramos E, Pinelli-Saavedra A, Avendaño-Reyes L, Hinojosa-Rodríguez C, Valenzuela-Melendres M, Macias-Cruz U, González-Ríos H (2022) Growth performance, carcass traits, muscle fiber characteristics and skeletal muscle mRNA abundance in hair lambs supplemented with ferulic acid. *Journal of Animal Science and Technology* 64: 52-69.

- Qaid MM, Abdoun KA (2022) Safety and concerns of hormonal application in farm animal production: a review. *Journal of Applied Animal Research* 50: 426-439.
- Rivera-Alegría FM, Jiménez Martínez C, Dávila G, Téllez-Medina D, Piña-Gutiérrez JM, Chay-Canul A (2018) Remanentes de antibióticos y promotores de crecimiento en carnes de bovino comercializadas en México y su efecto sobre el grosor de las fibras musculares. *Avances de la Investigación Sobre Producción Animal y Seguridad Alimentaria en México* 1: 789-794.
- Saltos JR, Sornoza IA, Saltos K, Robles C, Rosado J, Intriago OL (2019) Factores de riesgo que inciden para la presencia del cáncer cervicouterino. *Dominio de las Ciencias* 5: 363-375.
- SG (1994) Proyecto de Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, Grasa, hígado, músculo y riñón en aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos. Residuos tóxicos. Límites máximos permisibles y procedimientos de muestreo. México. Secretaría de Gobernación. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5189138&fecha=12/05/2011gsc.tab=0. Fecha de consulta: 22 de enero de 2023
- Suleman S, Qureshi JA, Rasheed M, Farooq W, Yasmin F (2022) Poultry feed contamination and its potential hazards on human health. *Biomedical Letters* 8: 70-81.
- Tan YQ, Li Q, Wang L, Chiu-Leung L, Leung L (2020) The livestock growth-promoter zeranol facilitates GLUT4 translocation in 3T3 L1 adipocytes. *Chemosphere* 253: 1-9. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126772.
- Valenzuela-Grijalva NV, Pinelli-Saavedra A, Muhlia-Almazan A, Domínguez-Díaz D, González-Ríos H (2017) Dietary inclusion effects of phytochemicals as growth promoters in animal production. *Journal of Animal Science and Technology* 59: 1-17. DOI: 10.1186/s40781-017-0133-9.
- Villavicencio E (2017) El tamaño muestral para la tesis ¿cuántas personas debo encuestar?. *Odontología Activa* 2: 59-62.
- White MC, Weir H, Soman AV, Peipins LA, Thompson TD (2022) Risk of clear-cell adenocarcinoma of the vagina and cervix among US women with potential exposure to diethylstilbestrol in utero. *Cancer Causes & Control* 33: 1121-1124.
- Widiastuti R, Anastasia Y (2020) Zeranol residue detected by HPLC in bovine meat from three different cities in Java Island. *Tropical Animal Science Journal* 43: 270-275.
- Yin M, Hu X, Sun Y, Xing Y, Chai S, Xing G, Yang Y, Teng M, Li Q, Wang Y (2020) The broad-spectrum and ultra-sensitive detection of zeranol and its analogues by an enzyme-linked immunosorbent assay in cattle origin samples. *RSC Advances* 10: 20809-20816.
- Zhang S, Zhang S, Zhu D, Jiao Z, Zhao X, Sun M, Che Y, Feng X (2020) Effects of 17 β -trenbolone exposure on sex hormone synthesis and social behaviours in adolescent mice. *Chemosphere* 245: 1-51. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125679.