



LEANDRA QUEIROZ DE MELO

**INCORPORAÇÃO NO LEITE E BALANÇO DE
SELÊNIO EM VACAS SUPLEMENTADAS COM
LEVEDURA SELENIZADA**

LAVRAS – MG

2011

LEANDRA QUEIROZ DE MELO

**INCORPORAÇÃO NO LEITE E BALANÇO DE SELÊNIO EM VACAS
SUPLEMENTADAS COM LEVEDURA SELENIZADA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de Doutora.

Dr. Marcos Neves Pereira

Orientador

LAVRAS – MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Melo, Leandra Queiroz de.

Incorporação no leite e balanço de selênio em vacas
suplementadas com levedura selenizada / Leandra Queiroz de Melo.
– Lavras : UFLA, 2011.

73 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Marcos Neves Pereira.

Bibliografia.

1. Contagem de células somáticas do leite. 2. Glutathione
peroxidase. 3. Selenito de sódio. 4. Desempenho. 5. Mineral
orgânico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.208557

LEANDRA QUEIROZ DE MELO

**INCORPORAÇÃO NO LEITE E BALANÇO DE SELÊNIO EM VACAS
SUPLEMENTADAS COM LEVEDURA SELENIZADA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2011.

Dr. José Camisão de Souza	UFLA
Dra. Renata Apocalypse Nogueira Pereira	EPAMIG
Dr. Sandro César Salvador	UFLA
Dra. Suely de Fátima Costa	UFLA

Dr. Marcos Neves Pereira
Orientador

LAVRAS – MG

2011

Dedico

Aos meus pais, Antonio e Maria Helena,
Aos meus irmãos, Leonardo e Letícia,
À minha sobrinha Amanda, e
Ao meu namorado Ricardo.

Sem vocês nada disso seria possível. Esta conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e pelas oportunidades.

Aos meus pais Antonio e Maria Helena, aos meus irmãos Leonardo e Leticia, e ao meu namorado Ricardo, pelo apoio, compreensão e incentivo. Obrigada por tudo sempre.

Ao Professor Marcos Neves Pereira pelo aprendizado e por dedicar parte do seu precioso tempo à minha orientação.

Aos amigos Luciene, Fernanda, João Luiz, Tiago Teófilo, Sancho, Gilson, Ozana, Ronaldo e José Ricardo pela imensa colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela confiança e pelo companheirismo.

À Professora Suely de Fátima Costa pela amizade, coorientação e contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca José Camisão, Renata, Sandro e Suely pela atenção e ensinamentos.

A todos do Grupo do Leite e aos funcionários das Fazendas São Francisco e da Milca pela grande ajuda na condução dos experimentos.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

O Selênio (Se) em selenoproteínas tem função metabólica importante em vacas leiteiras e leite com alto teor de Se pode ter efeito positivo sobre a saúde humana. Dois experimentos avaliaram os efeitos da fonte de Se sobre o desempenho animal, o balanço de Se e a incorporação de Se no leite. No Experimento 1, levedura selenizada (4,64 mg d⁻¹ de Se oriundo de Selemax[®]) foi comparada a selenito de sódio (4,88 mg d⁻¹ de Se), em suplementação por 106 dias iniciada após 60 dias do consumo de dieta isenta de Se suplementar. No Experimento 2, vacas suplementadas com selenito de sódio receberam Selemax[®] (3,85 mg d⁻¹ de Se) ou levedura isenta de Se por 56 dias. Os 28 animais do Experimento 1 e os 42 do Experimento 2 foram blocados em pares e a resposta ao longo do tempo foi analisada como medidas repetidas pelo Mixed do SAS. No Experimento 1, o teor de Se no leite foi 33,3 µg L⁻¹ no Selemax e 8,3 µg L⁻¹ no Selenito ($P<0,01$), e o teor de Se no plasma 91,4 e 77,3 µg L⁻¹ ($P=0,14$), respectivamente. A atividade da glutathiona peroxidase foi maior para Selenito no dia 43 e para Selemax no dia 106 ($P=0,05$ para a interação entre dia e tratamento). No Experimento 2, o teor de Se no leite foi 72,0 µg L⁻¹ no Selemax e 46,5 no controle ($P<0,01$), e a contagem de células somáticas do leite foi 358 e 598 x1000 células mL⁻¹ ($P=0,10$), respectivamente. Não foi detectado efeito da fonte de Se sobre as secreções de leite e sólidos e o balanço de Se. A levedura selenizada aumentou a incorporação de Se no leite, uma opção para a produção de leite enriquecido com Se orgânico.

Palavras-chave: Contagem de células somáticas do leite. Glutathiona peroxidase. Selenito de sódio. Desempenho. Mineral orgânico.

ABSTRACT

Selenium (Se) in selenoproteins has important metabolic function in dairy cows and milk with high Se content may have positive effects on human health. Two experiments evaluated Se source effects on animal performance, Se balance, and the incorporation of Se into milk. In Experiment 1, selenized yeast (4.64 mg d⁻¹ of Se from Selemax[®]) was compared to sodium selenite (4.88 mg d⁻¹ of Se), supplemented for 106 days after the consumption of a supplemental Se free diet for 60 days. In Experiment 2, cows supplemented with sodium selenite received Selemax[®] (3.85 mg d⁻¹ of Se) or Se free yeast for 56 days. The 28 animals in Experiment 1 and the 42 in Experiment 2 were paired blocked and the response over time was analyzed as repeated measures with Mixed of SAS. In Experiment 1, milk Se content was 33.3 mg L⁻¹ with Selemax and 8.3 mg L⁻¹ with Selenite ($P<0.01$), and plasma Se content was 91.4 and 77.3 mg L⁻¹ ($P=0.14$), respectively. Glutathione peroxidase activity was greater for Selenite at day 43 and for Selemax at day 106 ($P=0.05$ for the interaction of day and treatment). In Experiment 2, milk Se content was 72.0 mg L⁻¹ for Selemax and 46.5 for control ($P<0.01$), milk somatic cell count was 358 and 598 x1000 cells mL⁻¹ ($P=0.10$), respectively. There was no detectable Se source effect on milk and solids secretion and Se balance. Selenized yeast increased the incorporation of Se into milk, an option for the production organic Se enriched milk.

Keywords: Milk somatic cell count. Glutathione peroxidase. Sodium selenite. Performance. Organic mineral.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Fontes de selênio	12
2.2	Digestão, absorção e metabolismo de selênio	14
2.3	Glutationa peroxidase	22
2.4	Incorporação de selênio no leite	26
2.5	Desempenho animal	31
2.6	Selênio e saúde da glândula mamária	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Experimento 1	42
3.2	Experimento 2	45
3.3	Análise estatística	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

O Selênio (Se), em selenoproteínas, exerce função metabólica importante em vacas leiteiras, se relacionado a função imune, reprodução e viabilidade do neonato (SURAI, 2006b). O Se é um componente da enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px), capaz de converter peróxido de hidrogênio em água, sendo um importante componente do sistema antioxidante das células (ROTRUCK et al., 1973). Algumas variáveis de rebanhos leiteiros potencialmente afetadas pela suplementação com Se seriam a prevalência de mastite (JUKOLA et al., 1996), a contagem de células somáticas (CCS) do leite (PASCHOAL; ZANETTI; CUNHA, 2003), a taxa de concepção (CORTESE, 1988; JASKOWSKI; ROGOZIEWICZ, 1990), as incidências de retenção de placenta (JASKOWSKI, 1990; JULIEN et al., 1976), cisto ovariano (HARRISON; CONRAD, 1984; JASKOWSKI; ROGOZIEWICZ, 1990) e metrite (HARRISON; CONRAD, 1984; JASKOWSKI, 1990) e a mortalidade de bezerros (JASKOWSKI, 1990).

Em ruminantes, a absorção de Se inorgânico do trato digestório é menor que a de Se orgânico (WEISS, 2003). No rúmen, o Se na forma inorgânica, como em selenito de sódio, pode ser convertido pelos microorganismos ruminais em formas insolúveis e pouco absorvíveis de Se, como Se elementar ou selenidos (HUDMANN; GLENN, 1985; SPEARS, 2003). Como muito pouco do Se ingerido é retido nos tecidos (WOLFFRAM, 1999) e as principais rotas de excreção do mineral são a fecal e a urinária (IVANCIC JÚNIOR; WEISS, 2001), a possibilidade de poluição ambiental por excesso de Se (DAVIS; MAIER; KNIGHT, 1988) torna pertinente a compreensão do efeito da suplementação sobre a excreção e a retenção do Se ingerido. O balanço de Se em vacas leiteiras suplementadas com Se orgânico pode diferir do balanço em vacas suplementadas com Se inorgânico.

A selenometionina (SeMet) oriunda de fontes orgânicas de Se pode substituir a metionina (Met) durante a síntese protéica na glândula mamária, sendo o Se incorporado na proteína láctea. A substituição de Se inorgânico, na forma de selenato (KNOWLES et al., 1999) ou selenito (PEHRSON et al., 1999), por levedura selenizada resultou no aumento da incorporação de Se no leite, subsidiando a possibilidade de produção de proteína láctea selenizada. O aumento na concentração de Se em forma orgânica no leite pode ter efeito positivo sobre a saúde de consumidores de produtos lácteos. Salonen et al. (1982) detectaram a ocorrência de associação entre morte por doenças cardiovasculares e baixo teor de Se no soro sanguíneo de humanos. Neve (1995) observou que formas orgânicas de Se aumentaram mais rapidamente a concentração de Se no sangue de humanos que Se inorgânico. Na China, a suplementação diária por dois anos com 50 µg de Se incorporado em levedura reduziu a incidência de câncer de estômago (BLOT et al., 1993), mas quando o Se foi suplementado na forma de selenito não houve resposta em incidência de câncer esofágico (LI et al., 1993). A suplementação diária durante quatro anos e meio com 200 µg de Se oriundo de levedura selenizada reduziu a incidência de câncer de próstata, pulmão e colo retal (CLARK et al., 1996). Em portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) a suplementação diária durante um ano com 100 µg de Se na forma de SeMet aumentou a atividade da GSH-Px e reduziu o estresse oxidativo (DELMAS-BEAUVIEUX et al., 1996).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho animal, o balanço de Se e a incorporação de Se no leite de vacas suplementadas com Se orgânico oriundo de levedura selenizada. Dois experimentos foram conduzidos. No Experimento 1, a levedura selenizada foi comparada a selenito de sódio, sendo a suplementação iniciada após 60 dias do consumo de dieta basal isenta de Se suplementar. No Experimento 2, vacas suplementadas com teor dietético basal

de selenito de sódio foram suplementadas com levedura selenizada ou a mesma levedura isenta de Se.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fontes de selênio

O Se é um não-metal com características químicas semelhantes ao enxofre (S). Ele é encontrado principalmente em rochas do Cretáceo, material vulcânico e alguns depósitos no fundo do mar (AMMERMAN; GOODRICH, 1983). A presença de Se no sistema alimentar é determinada pela concentração deste elemento no solo, o que é resultado da decomposição de rochas vulcânicas, do uso de fertilizantes contendo Se, ou da água (COMBS JÚNIOR, 2001). Em algumas regiões do mundo, como Dinamarca, Finlândia, Nova Zelândia e China, as concentrações de Se no solo são baixas. Em outras regiões, como Estados Unidos, Canadá, Irlanda, Colômbia e Venezuela, ocorrem altas concentrações de Se no solo, sendo estas regiões denominadas seleníferas (REILLY, 1998). O solo é considerado deficiente quando a concentração de Se é $<600 \mu\text{g kg}^{-1}$ de matéria seca (MS) (LYONS; STANGOULIS; GRAHAM, 2003). Há poucas informações na literatura sobre o teor de Se nos solos brasileiros. Segundo Moraes et al. (2009) a grande maioria dos solos analisados no Brasil é deficiente em Se.

A remoção do Se presente no solo é feita pelos vegetais e por microorganismos, os quais podem depositá-lo nos tecidos e ou convertê-lo a algum metabólito, como o dimetilselenito. Essa mobilização pode ser influenciada pelo pH e pela umidade do solo (COMBS JÚNIOR, 2001). Em função destes fatores, a concentração de Se nos vegetais, no corpo animal e em seus produtos pode variar. A variação na concentração de Se nos produtos de origem animal está diretamente ligada ao tipo e ao teor de Se dietético.

As formas inorgânicas de Se incluem selenato ou selenito de sódio e selenato de bário. As formas orgânicas incluem levedura selenizada, forragem e

grãos enriquecidos com Se através de fertilização e SeMet sintética (SCHRAUZER, 2001). O selenito de sódio é a principal fonte de Se suplementar, entretanto a principal forma de ocorrência natural de Se nos alimentos, como milho, trigo e soja, é a SeMet, incorporada em proteínas no lugar da Met. O tRNA-Met não diferencia Met de SeMet (SCHRAUZER, 2000). Os vegetais, as algas marinhas, as bactérias e as leveduras podem sintetizar tanto Met quanto SeMet, capacidade não presente nos mamíferos.

As leveduras correspondem a um grupo heterogêneo de fungos, com predominância da forma unicelular, de estrutura celular eucariótica e de reprodução por brotamento ou fissão. A espécie *Saccharomyces cerevisiae*, e espécies filogeneticamente próximas a ela, são as mais empregadas pelo homem na indústria de fermentação de substratos açucarados ou amiláceos previamente hidrolizados (VITOLLO; MINAMI; CURY, 1987). A fração protéica da levedura apresenta na sua constituição aminoácidos que contém S, como a cisteína (Cis) e a Met. Durante o crescimento da levedura em meio de cultura rico em Se, o S pode ser substituído por Se, formando selenocisteína (SeCis) e SeMet. Levedura selenizada normalmente contém de 1.000 a 2.000 mg de Se kg⁻¹, a maioria na forma de SeMet (SCHRAUZER, 2001) e o restante na forma de selenoaminoácidos ou análogos, como selenocistina, selenocistationa, metilselenocisteína e SeCis, e baixo ou nenhum Se inorgânico (ECKER et al., 1986; MAHAN; CLINE; RICHERT, 1999).

A indústria da nutrição animal preconiza que minerais orgânicos teriam maior solubilidade, estrutura química estável e natureza eletricamente neutra no trato digestório que formas inorgânicas. Logo, estes não participariam de reações no rúmen que poderiam transformar o íon metálico livre em complexos insolúveis indesejáveis. Também é preconizado que a molécula manteria a estrutura íntegra no trato digestório, chegando ao local de absorção na forma original, podendo ser absorvida e metabolizada como tal. A forma absorvida do

mineral pode ser mais importante que a quantidade absorvida. Alguns microminerais quelatados ou complexados podem estimular certos processos biológicos ou a forma orgânica pode estar presente em compartimentos no corpo diferentes da distribuição de formas inorgânicas.

2.2 Digestão, absorção e metabolismo de selênio

Diferenças no metabolismo entre minerais orgânicos e inorgânicos podem ter origem ruminal. Van Ryssen et al. (1989) suplementaram cinco ovinos com 1 µg de Se oriundo de selenito g⁻¹ de dieta e outros cinco animais com o mesmo teor de Se oriundo de trigo enriquecido com Se, rico em SeMet. O fluido ruminal foi obtido após abate dos animais para incubação *in vitro* com [⁷⁵Se]selenito nos animais consumindo selenito e com ⁷⁵SeMet nos animais suplementados com trigo enriquecido. Os aminoácidos microbianos contendo Se marcado foram identificados por cromatografia. A SeCis foi o aminoácido predominante no fluido ruminal incubado com selenito e a SeMet foi o predominante nas incubações realizadas com o conteúdo ruminal dos animais suplementados com trigo enriquecido. A deposição de Se em tecidos corporais foi maior quando Se foi suplementado na forma orgânica e outros indicadores de metabolismo também diferiram entre as fontes.

Koenig et al. (1997) também observaram que em ovinos suplementados com [⁸²Se]selenito ou [⁷⁷Se]levedura a incorporação do marcador na fase sólida da digesta duodenal variou de 51 a 61%, estando o mineral predominantemente associado às bactérias ruminais. O [⁸²Se]selenito foi mais disponível para absorção e retenção que [⁷⁷Se]levedura, mostrando que formas inorgânicas deste mineral podem ser tão ou mais disponíveis que formas orgânicas. Tanto formas orgânicas quanto inorgânicas de Se são aparentemente incorporadas à proteína microbiana no rúmen, e ambas estão presentes no intestino como mineral

orgânico. Diferenças no aminoácido complexado ao Se podem explicar diferenças de biodisponibilidade entre fontes orgânicas e inorgânicas de Se.

As bactérias ruminais são capazes de sintetizar tanto SeMet quanto SeCis a partir de fontes inorgânicas de Se. No rúmen pode ocorrer redução de selenito a compostos metálicos de Se ou Se elementar, os tornando indisponíveis para os microorganismos e para o animal. Segundo Peter et al. (1982), significativamente mais Se a partir de selenito foi convertido a compostos insolúveis que SeMet.

A absorção de Se em ruminantes é menos eficiente que em monogástricos (GERLOFF, 1992). Esta menor absorção pode ser atribuída ao fato de parte do Se no rúmen ser convertida em formas insolúveis. A absorção de Se ocorre no intestino delgado e está diretamente ligada a sua forma química, quantidade ingerida e outros fatores da dieta, como a presença de outros minerais, como cálcio e S, que podem reduzir a absorção de Se em até 50% (SURAI, 2006b).

A absorção do Se oriundo de selenito ou selenato de sódio é similar em ruminantes (ORTMAN; PEHRSON, 1999; PODOLL et al., 1992). O Se orgânico na dieta de ruminantes tem maior absorção que as fontes inorgânicas (KNOWLES et al., 1999; ORTMAN; PERHSON, 1999). A absorção de Se em vacas de leite não lactantes, consumindo uma variedade de dietas com ou sem suplementação de Se, variou de 17 a 50% (HARRISON; CONRAD, 1984). Koenig, Buckley e Shelford (1991b) observaram absorção de 11% em vacas de leite não lactantes suplementadas com Se inorgânico. Em outro estudo, o coeficiente de absorção do Se variou de 10 a 16% da ingestão diária de Se inorgânico (KOENIG; BUCKLEY; SHELFORD, 1991a).

O selenito é absorvido por difusão passiva, enquanto o selenato apresenta rota de absorção associada a molibdato e sulfato, podendo ser vulnerável a antagonismo por esses ânions (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999;

WOLFFRAM, 1999). A SeMet é absorvida por transporte ativo pelo sistema Na^+ dependente, similar à absorção da Met, e a SeCis é absorvida através de aminoácidos carreadores (SCHRAUZER, 2003; WOLFFRAM, 1999) (Figura 1).

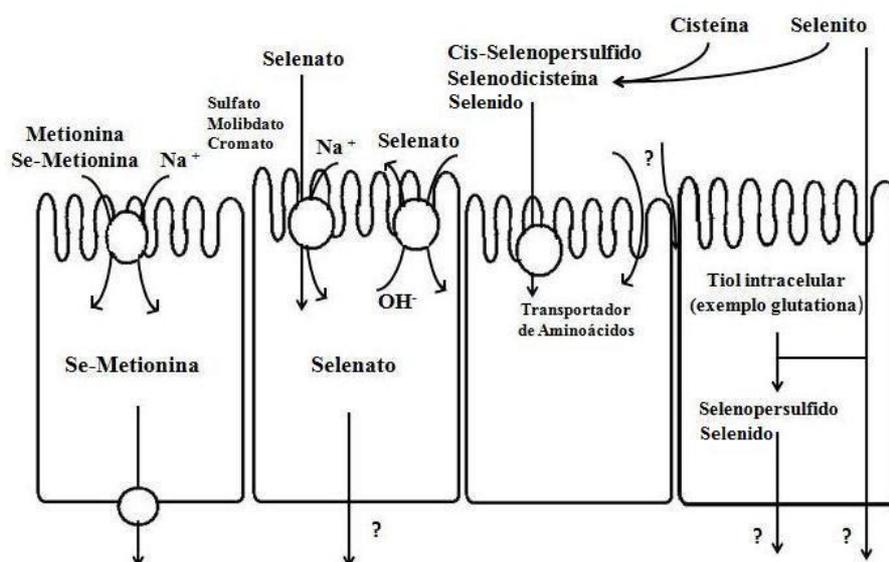


Figura 1 Absorção intestinal de diferentes formas de selênio

Após a absorção, o metabolismo de Se em ruminantes é semelhante ao de monogástricos e pode ser afetado pela fonte de Se, pela concentração de Se no sangue e nos tecidos antes da suplementação, pela presença de minerais e aminoácidos na dieta e pela concentração de Se na dieta (SURAI, 2006b). O Se é transportado para o fígado na forma livre ou ligado a proteínas transportadoras, como alfa e gama-globulinas. No fígado o mineral sofre alterações metabólicas formando selenoproteínas, como a GSH-Px. Há diferenças no metabolismo pós-absorção de fontes orgânicas e inorgânicas de Se. Quando administrado na forma parenteral, como selenato de bário, o Se é rapidamente incorporado em proteínas ricas em SeCis no plasma e fica disponível para a síntese de outras selenoproteínas através da ação de enzimas como a SeCis β -liase (WOLFFRAM,

1999). O selenito é capturado pelos eritrócitos, reduzido a selenido (HSe^-) pela glutathiona, e então transferido para o fígado (Figura 2).



Figura 2 Metabolismo de selênio nas formas orgânica e inorgânica

Burk, Hill e Motley (2001) demonstraram que Se de SeMet, mas não de selenato ou SeCis, pode ser incorporado em albumina, presumivelmente como SeMet. A maioria dos animais não tem mecanismo eficaz para a síntese de Met e também são incapazes de sintetizar SeMet (SCHRAUZER, 2003). O Se inorgânico suplementado é usado quase exclusivamente para a produção de selenoenzimas, enquanto Se orgânico pode ser usado para produzir tanto selenoenzima quanto as proteínas contendo Met (Figura 2), porque SeMet absorvida pode ser usada no lugar da Met na síntese de proteínas (WEISS; HOGAN, 2005).

No fígado, quando a SeMet é metabolizada, parte do Se pode ser removido e reduzido a selenido para a síntese de SeCis bioativa, que pode ser

incorporada em selenoproteínas funcionais, enquanto a outra parte é transformada em SeCis e utilizada na síntese protéica no lugar da Cis. Alternativamente, a SeMet pode permanecer intacta e ser usada na síntese de proteínas no lugar da Met (WEISS, 2003). A via metabólica para o Se foi explicada pela regulação metabólica que tem selenido como intermediário comum quando a fonte de Se é orgânica ou inorgânica, e como metabólito intermediário entre a utilização para síntese de selenoproteína ou a metilação para excreção de Se (SUZUKI; OGRA, 2002) (Figura 2).

Existem duas rotas de metabolismo de SeMet sanguínea não incorporada em outros tecidos (Figura 2). A primeira é a transulfuração da selenocistationa para produzir SeCis, que em troca é degradada a selenido de hidrogênio pela enzima SeCis β -liase. A outra rota é a da transaminação-decarboxilação. Calcula-se que 90% da Met é metabolizada pela primeira rota, a principal rota de catabolismo de SeMet (DONG et al., 2001). Em contraste, as formas inorgânicas, como selenato, são reduzidas a selenito e este é metabolizado a selenido de hidrogênio por ação da selenodiglutationa e da glutaciona selenopersulfido. O selenido de hidrogênio é o precursor de Se para a síntese do selenofosfato das selenoproteínas. Quando não utilizado na síntese destas selenoproteínas, o selenido de hidrogênio sofre metilação sequencial produzindo dimetilselenido e trimetilselênio que são excretados (WOLLFRAM, 1999). Beilstein e Whanger (1986) demonstraram que a utilização de selenito favorece a formação de selenoproteína nos tecidos, mas não contribui para a formação de SeMet, indicando que animais são dependentes de plantas ou fontes microbianas para este selenoaminoácido. Mamíferos não têm a capacidade de sintetizar Met e SeMet (SCHRAUZER, 2000), entretanto, podem converter SeMet em SeCis.

Quando a SeMet não é imediatamente metabolizada ela é incorporada em órgãos com altas taxas de síntese protéica, como os músculos esqueléticos, o pâncreas, o fígado, os rins e o estômago, na mucosa gastrintestinal e nos

eritrócitos. Já a incorporação do Se inorgânico absorvido só é possível nas selenoproteínas. Quando a Met é limitada, uma maior porcentagem de SeMet é incorporada nas proteínas corporais no lugar de Met, visto que Met-tRNA não distingue Met de SeMet (SCHRAUZER, 2000).

A SeCis é a principal forma de Se no plasma. No plasma, o Se é transportado principalmente pela selenoproteína P, uma glicoproteína contendo até 10 resíduos de SeCis (ALLAN; LACOURCIERE; STADTMAN, 1999) e que representa de 33 a 80% do total de Se no plasma em humanos e roedores (AWADEH et al., 1998; SURAI, 2006a). A selenoproteína P está envolvida no transporte de Se do fígado para os tecidos periféricos (SURAI, 2006a). Daniels (1996) postulou que existem dois compartimentos metabólicos de Se no corpo. O principal compartimento inclui todas as formas de Se inorgânico derivadas de selenito e selenido, incluindo selenoproteínas de síntese endógena (por exemplo, GSH-Px e selenoproteína P), metabólitos de Se (trimetilselênio) e outros produtos intermediários do metabolismo de selenito. Este compartimento ativo fornece Se para a síntese dos principais selenocompostos funcionalmente importantes. O segundo compartimento de Se consiste de proteínas contendo SeMet e SeCis e pode contribuir com o primeiro compartimento na síntese de selenoproteína.

A absorção de proteína selenizada da dieta é dependente da degradabilidade da fonte protéica e da exposição do Se à ação microbiana. A incorporação de Se à caseína a partir da suplementação com levedura selenizada foi maior que com selenato, sugerindo que a SeMet oriunda de levedura selenizada pode resistir à degradação ruminal e estar disponível para a síntese de proteína láctea (KNOWLES et al., 1999). Bois de corte suplementados com levedura selenizada, quando comparada a selenito de sódio, tiveram maior acúmulo de Se nos tecidos como SeMet que como SeCis (JUNIPER et al., 2008). A SeMet incorporada em proteínas corporais pode ser removida durante a

degradação e transformada em selenido para utilização na síntese de selenoproteínas funcionais ou excreção (SCHRAUZER, 2003).

Em ovinos, a biodisponibilidade relativa foi 100 e 133 para selenito e selenato de sódio, respectivamente (HENRY et al., 1988). Porém, o Se incorporado em leveduras tem demonstrado ter biodisponibilidade relativa a selenito de sódio de 147% quando avaliado por incorporação de Se no fígado e de 138% quando avaliado pelo teor de Se no sangue (EDENS; GOWDY, 2004). As diferenças entre fontes se justificam por diferenças na absorção e na deposição, uma vez que foi demonstrado que Se orgânico tem maior taxa de deposição nos tecidos que a forma inorgânica (PAYNE; LAVERGNE; SOUTHERN, 2005) e como não pode ser incorporado dentro das proteínas corporais, o excesso de selênio inorgânico é excretado.

A excreção do Se pode ocorrer por exalação (dimetilselenido), ou por excreção urinária (trimetilselênio), endógena fecal ou no leite. A excreção biliar de Se, ou excreção endógena fecal, pode representar aproximadamente 28% do Se absorvido diariamente. Embora boa parte do Se endógeno que chega às fezes seja reabsorvido, essa rota de excreção contribui substancialmente para as perdas endógenas fecais, que são as principais responsáveis pelos balanços negativos de Se (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). Koenig, Buckley e Shelford (1991a), utilizando um método de diluição de isótopos em vacas de leite não lactantes, observaram que a excreção endógena fecal de Se variou de 11 a 19 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de MS ingerida dia^{-1} . Pelo fato do Se inorgânico ser absorvido por difusão passiva e pouca quantidade ser retida nos tecidos, uma grande proporção do Se inorgânico é excretada nas fezes e na urina (WOLFFRAM, 1999). A principal rota de excreção de Se em ruminantes é através das fezes. Quando o Se é administrado por injeção subcutânea ou endovenosa, a maior parte é excretada via urina (PODOLL et al., 1992).

Buckley (2000) observou que do Se consumido via oral na forma de selenito, 84% foi absorvido, e deste, 90% foi conduzido ao fígado e 58% retornou ao intestino delgado via bile, sendo uma parte reabsorvida. Do fígado foi ao plasma e aos tecidos periféricos, perdendo, nesse percurso, 18% nas fezes e 17% na urina. O modelo cinético do metabolismo do Se como SeMet difere do metabolismo do Se como selenito. A SeMet pode apresentar absorção de 98%, com maior taxa de absorção e muito pouco retorno ao intestino delgado. Cerca de 43% da SeMet absorvida chega lentamente aos tecidos periféricos, o que não ocorre com Se na forma de selenito. As perdas da SeMet absorvida foram de 4% e 11% nas fezes e na urina, respectivamente.

Harrison e Conrad (1984) relataram que a absorção e a retenção de Se em vacas leiteiras não lactantes tiveram alta correlação linear com a ingestão diária de Se, que variou de 400 a 3.200 μg por animal ($r^2=0,98$ e $0,95$, respectivamente). Lopez, Preston e Pfander (1969) relataram que a absorção total de Se do trato gastrointestinal de cordeiros foi proporcional à ingestão de Se, mas a excreção endógena para o intestino foi constante e não relacionada com a ingestão diária de Se da dieta.

Ivancic Júnior e Weiss (2001) observaram que o Se na urina foi cerca de 30% do total excretado por vacas suplementadas com 0,3 mg de Se kg^{-1} de MS, comparado com 18% para as suplementadas com 0,1 mg de Se kg^{-1} de MS oriundo de selenato de sódio. Quando a ingestão diária de Se das vacas foi 2,5 mg, a digestibilidade aparente do Se foi 38,6% e a digestibilidade verdadeira 54,7%. A excreção diária de Se nas fezes, na urina e no leite foi 1,46, 0,52, e 0,48 mg. Quando a ingestão diária de Se foi aumentada para 4,82 mg, a digestibilidade aparente do Se foi 46,9% e a verdadeira se manteve em 54,7%. A excreção diária nas fezes, na urina e no leite foi 2,58, 1,4 e 0,39 mg, respectivamente. Aumento na dose suplementada de Se foi associada a menor

transferência de Se para o leite. Houve correlação positiva entre a concentração de Se no plasma e a concentração de Se no leite e na urina.

2.3 Glutathiona peroxidase

O Se exerce sua função biológica nos mamíferos majoritariamente como selenoproteínas, que são todas as enzimas que incorporam Se como SeCis (21^o aminoácido). A sua importância metabólica é baseada no fato de que em contraste com o thiol encontrado nas enzimas contendo Cis, o selenol se encontra completamente ionizado no pH fisiológico, sendo mais reativo que o grupo thiol (BEHNE; KYRIAKOPOULOS, 2001).

Existem aproximadamente 25 selenoproteínas identificadas (SURAI, 2006a), porém a mais associada à função antioxidante em vacas é a glutathiona peroxidase citosólica (SMITH; HOGAN; WEISS, 1997). Quando há desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e a produção de metabólitos reativos de oxigênio, ocorre o estresse oxidativo. Espécies reativas de oxigênio, ou metabólitos reativos de oxigênio, ou radicais livres, são produtos finais formados normalmente a partir do metabolismo celular através da cadeia transportadora de elétrons. Os principais metabólitos são peróxido de hidrogênio e hidroperóxido de lipídeo (VALKO et al., 2007), que podem danificar severamente lipídios de membrana, DNA, proteínas celulares e enzimas (MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA; MADSEN, 1993).

Várias selenoproteínas são encontradas no organismo. A GSH-Px pode ser citosólica (celular ou clássica), plasmática (ou extracelular), hidroperóxido fosfolipídica ou gastrointestinal, e tem função antioxidante combatendo as espécies reativas de oxigênio. A tioredoxina redutase (TrxR) atua reduzindo o estresse oxidativo no organismo. A iodotironina deiodinase (tipos I, II, e III) está envolvida na conversão de tiroxina (T4) em triiodotironina (T3), é antioxidante

cerebral e controla o excesso de T3 no cérebro. A selenoproteína P é carreadora de Se e antioxidante. A selenoproteína W tem atividade antioxidante no músculo e em outros tecidos. A selenofosfato sintetase é requerida para a incorporação da SeCis pelas selenoproteínas (EDENS; GOWDY, 2004; SURAI, 2006a).

A GSH-Px, cuja síntese é induzida por Se, foi a primeira selenoproteína a ser descrita e é a enzima mais conhecida no que se refere à estrutura e função (DANIELS, 1996). No organismo a GSH-Px atua como antioxidante primário, sendo importante componente na proteção celular contra radicais livres em espécies que utilizam metabolismo oxidativo, sendo vital para a sobrevivência da célula, por catalisar a redução de peróxidos de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos. O peróxido de hidrogênio é convertido em água e o hidroperóxido lipídico ao álcool correspondente. Quando a concentração de peróxido de hidrogênio é baixa, ocorre redução na chance de formação do radical hidroxila. A hidroxila é uma espécie de oxigênio reativo prejudicial às células (AMMERMAN; GOODRICH, 1983; GANTHER, 1979).

A GSH-Px atua no citosol da célula protegendo os ácidos graxos polinsaturados da membrana plasmática (RICE; KENNEDY, 1989), suscetíveis ao ataque de espécies reativas de oxigênio. Quanto maior a concentração de ácidos graxos polinsaturados da membrana, mais suscetível é a célula e o tecido ao dano oxidativo. Um ácido graxo polinsaturado importante na membrana celular é o ácido araquidônico, que pode ser metabolizado em prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina pelo complexo enzima ciclooxigenase, e em leucotrienos pelo complexo enzima lipoxigenase (ATROSHI et al., 1986). Os metabólitos do ácido araquidônico são importantes para a função dos neutrófilos polimorfonucleares e a ampliação da resposta inflamatória após a invasão de patógenos nos tecidos, incluindo a glândula mamária (CRAVEN; WILLIAMS, 1985). O Se tem papel importante na regulação do metabolismo do ácido araquidônico pela via lipoxigenase. Em um estudo *in vitro*, o metabolismo deste

ácido foi reduzido em linfócitos obtidos de vacas de leite com deficiência de Se, o que pode explicar a inibição da proliferação de linfócitos e a menor resistência a doenças infecciosas em casos de deficiência de Se (CAO et al., 1992).

Portadores do vírus HIV apresentaram baixa concentração plasmática de Se, que tem sido associada com redução na atividade da GSH-Px (BAUM et al., 1997; DWORKIN et al., 1988). A suplementação de Se tem sido utilizada para aumentar a atividade da GSH-Px (DELMAS-BEAUVIEUX et al., 1996) e diminuir a necessidade de hospitalização (MULLER et al., 2000) destes indivíduos.

A atividade das selenoenzimas no fígado e no plasma é indicativa do suprimento de Se para o organismo. A suplementação de vacas com levedura selenizada ou selenito de sódio resultou em distribuição similar do Se nas proteínas do soro sanguíneo (AWADEH et al., 1998). A maior concentração de Se foi encontrada na selenoproteína P, seguida da albumina e da GSH-Px.

Segundo Stower; Herdt (1992), a concentração de Se no soro e no plasma tem alta relação com a taxa de administração oral ou parenteral, respondendo rapidamente às mudanças na ingestão de Se. O Se e a atividade da GSH-Px no sangue também se correlacionam bem com a ingestão de Se, no entanto, o Se e a glutathione no sangue respondem mais lentamente que no soro ou no plasma às alterações na ingestão de Se. Isso ocorre porque a maioria da GSH-Px no sangue é incorporada aos glóbulos vermelhos no momento da eritropoiese. Logo, a resposta completa do Se e da glutathione no sangue após suplementação requer um período de tempo igual ao tempo médio de vida dos glóbulos vermelhos, ao redor de 90 a 120 dias em bovinos. Entretanto, Knowles et al. (1999) observaram que a concentração de Se no sangue só passou a ser constante (platô) após 133 dias de suplementação. Rowntree et al. (2004) observaram que após quatro meses de suplementação vacas que receberam Se de selenito de sódio apresentaram maior atividade da GSH-Px nos eritrócitos que as

não suplementadas. A atividade da GSH-Px no sangue não é paralela à concentração de Se no fígado ou no soro até que seja atingida a homeostase (IVANCIC JÚNIOR; WEISS, 2001).

Os teores de Se no plasma ou no soro sanguíneo refletem o *status* de Se a curto prazo, enquanto o Se nos eritrócitos, nos pelos, nos cascos e nas unhas reflete o *status* de Se a longo prazo (THOMSON, 2004). Alterações no conteúdo de Se dos eritrócitos estão relacionadas à taxa de reposição das células vermelhas do sangue. Para uma resposta completa em atividade da GSH-Px e teor de Se no sangue total à suplementação com Se é necessário um período de suplementação pelo menos igual ao tempo médio de vida dos eritrócitos (STOWE; HERDT, 1992). Estudos *in vitro* (ILIAN; WHANGER, 1989) demonstraram que o selenito ^{75}Se foi incorporado à GSH-Px, enquanto ^{75}Se de SeMet foi na maior parte incorporado à hemoglobina. Estudos *in vivo* confirmaram a maior incorporação de Se em GSH-Px quando este foi fornecido como selenito (BEILSTEIN; WHANGER, 1986) e selenato (BUTLER et al., 1991). Aproximadamente 84% do Se em eritrócitos de ovinos suplementados com selenito foi associado à GSH-Px comparado com 64% quando os animais foram suplementados com quantidade equivalente de Se a partir de trigo enriquecido com Se (VAN RYSSSEN et al., 1989). Vacas suplementadas com selenito de sódio apresentaram maior atividade da GSH-Px no sangue que as não suplementadas (HOGAN et al., 1990).

Knowles et al. (1999) observaram correlação positiva entre a concentração de Se no sangue e a atividade da GSH-Px no sangue e no fígado ($r^2=0,85$ e $0,69$, respectivamente, $P<0,01$). A relação entre a concentração de Se e a GSH-Px no sangue variou ao longo do experimento, houve um atraso no aumento da atividade da GSH-Px quando comparado ao aumento rápido da concentração de Se no sangue de vacas suplementadas com Se. A relação após 21 dias com suplementação de Se, comparado ao dia 0, refletiu acréscimo

acentuado na concentração de Se no sangue sem respectivo aumento na atividade da GSH-Px. Esta diferença foi sendo reduzida ao longo do período experimental e no dia 91 a relação foi semelhante à do início do experimento. Este atraso é explicado pela incorporação de Se à GSH-Px durante a eritropoiese. Devido à atividade da GSH-Px ser sensível à forma e à duração da suplementação de Se, mensurações da GSH-Px no sangue como um critério de diagnóstico do *status* de Se pode ser indicado apenas quando as vacas não são suplementadas com Se ou em casos que a concentração de Se no sangue atingiu a homeostase.

Maior atividade da GSH-Px nos eritrócitos foi observada por Ortman e Pehrson (1999) em vacas suplementadas com Se oriundo de selenito, selenato ou levedura selenizada, relativamente ao grupo controle não suplementado. Em bovinos, menos de 10% da atividade da GSH-Px do sangue está fora dos eritrócitos. Weiss (2003) observou que em nove de onze experimentos não houve diferença na atividade da GSH-Px quando levedura selenizada foi comparada a fontes inorgânicas de Se.

2.4 Incorporação de selênio no leite

A suplementação de microminerais na dieta de vacas pode aumentar o valor nutricional do leite e de seus derivados. Maiores concentrações de diversos nutrientes no leite, principalmente minerais como cálcio, ferro, iodo e Se, podem ser benéficas à saúde de recém-nascidos, crianças, imunosuprimidos e outros consumidores. A incorporação de Se orgânico à caseína foi diferente da incorporação de Se inorgânico (CONRAD; MOXON, 1979; KNOWLES et al., 1999), subsidiando a possibilidade de utilização de Se orgânico para produção de proteína láctea selenizada, uma maneira de agregar valor a produtos lácteos.

A quantidade de Se orgânico necessária para produzir leite e derivados enriquecidos com Se pode ser 20 a 40 vezes maior que o necessário para prevenir deficiência de Se em rebanhos (WALKER et al., 2010). A exigência nutricional diária de Se em um humano adulto é 55 μg (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000). Considerando os dados relatados de concentração de Se no leite em vários países (TINGGI; PATTERSON; REILLY, 2001), seria necessário consumir 0,8 L de leite em Israel, 1,7 nos Estados Unidos (Dakota do Sul), 2,0 no Canadá, 2,4 na Alemanha, 3,5 na Austrália e 3,7 na Inglaterra para suprir a ingestão diária recomendada. Assumindo o consumo anual per capita de 276 L de leite nos Estados Unidos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO, 2011), a quantidade estimada de Se obtível via leite seria 44% da exigência nutricional diária de Se.

Ceballos et al. (2009) avaliaram 42 trabalhos publicados entre 1970 e 2008 e observaram que a suplementação dietética de Se resultou em aumento médio de 12,6 μg de Se L^{-1} de leite. A localização geográfica, a fonte, a dose e a interação entre a fonte e a dose de Se explicaram 71% da variação entre os estudos. Vacas suplementadas com levedura selenizada tiveram concentração de Se no leite 75 dias após o início da suplementação maior que animais suplementados com fontes inorgânicas de Se, sendo o valor ao redor de 29 μg L^{-1} .

Vacas a pasto suplementadas por seis semanas com triticales com baixo ou alto teor de Se (165 e 580 μg kg^{-1} de MS, respectivamente), associado à suplementação com levedura selenizada (0, 4, 8, 12 ou 16 mg de Se por dia), atingiram o platô na concentração de Se no leite após 15 e 7 dias de suplementação, quando estavam em início ou final da lactação, respectivamente (HEARD et al., 2007). A concentração de Se no leite no período de platô aumentou com a dose de levedura suplementada. Houve diferença entre baixo e alto Se nos grãos para todas as doses de levedura, mas à medida que a levedura

foi mais suplementada a diferença tendeu a cair. A relação entre a ingestão de Se e a concentração de Se no leite e no músculo foi significativa e positiva, mas não foi afetada pela fonte de Se. A excreção de Se no leite foi maior nas vacas em início de lactação, provavelmente devido à maior produção. As vacas em início de lactação excretaram no leite maior proporção do Se ingerido que as vacas em final de lactação, 20 a 28% e 10 a 14% respectivamente. Esta diferença, de cerca de duas vezes, indica que a ingestão de Se por si só é inadequada como medida indireta de excreção de Se no leite.

Setenta vacas em meio da lactação, aproximadamente 78 dias em lactação no início do período experimental de 42 dias, foram alimentadas com diferentes quantidades de pasto ou concentrado ou dieta completa. Sessenta animais receberam os tratamentos 20 ou 40 kg de MS vaca⁻¹ dia⁻¹ de pastagem perene irrigada (trevo branco e azevém) e 1, 3 ou 6 kg de MS vaca⁻¹ dia⁻¹ de peletes de concentrado. Para cada quantidade de concentrado fornecido os peletes foram formulados para prover 16 ou 32 mg de Se vaca⁻¹ dia⁻¹ oriundo de levedura selenizada. As outras 10 vacas foram alimentadas com dieta completa suplementada com 1 kg de MS dia⁻¹ de peletes contendo 16 ou 32 mg de Se de levedura selenizada. A ingestão total de Se variou de 14,5 a 37,5 mg de Se vaca⁻¹ dia⁻¹. Não houve efeito da quantidade de Se ingerido na produção de leite e na CCS para vacas alimentadas a pasto ou com dieta completa. A concentração de Se no leite respondeu rapidamente ao início da suplementação, atingindo 89% do valor no platô no quinto dia do período experimental. Quando o platô foi estabelecido (dia 12 a 40 do período experimental), cada 1 mg de Se ingerido aumentou a concentração de Se no leite em 5 µg kg⁻¹ ($r^2=0,97$), e esta resposta não foi determinada pela dieta ou pela produção de leite das vacas (STOCKDALE et al., 2011). A relação 1:5 de Se ingerido e Se excretado no leite é importante na produção de leite enriquecido com Se, pois pode prever a concentração de Se no leite a partir da ingestão de Se na dieta. Walker et al.

(2010) sugeriram que a quantidade total de Se excretada no leite de vacas suplementadas com levedura selenizada pode ser influenciada pelo tamanho do *pool* de SeMet em relação a Met no sangue, pela quantidade de proteína láctea sintetizada e pelo grau de competição de outros tecidos com a glândula mamária por metabólitos para a síntese protéica.

Segundo Knowles et al. (1999) a relação molar entre a concentração de Se no leite e no sangue é considerada como um índice de eficiência de transferência de Se do sangue (provavelmente do *pool* plasmático) para o leite. A levedura selenizada foi mais eficiente em transferir Se do sangue para o leite que o selenato de sódio, apesar de ter ocorrido decréscimo desta relação neste tratamento ao longo do experimento, sugerindo ocorrer redução na capacidade de transporte de aminoácidos no final da lactação. Antes da suplementação, no 21º dia de suplementação e após 133 dias de suplementação as relações molares entre os teores de Se do leite e no sangue foram 0,24, 0,47 e 0,20, respectivamente. A relação molar entre Se do leite e no sangue nos animais recebendo selenato foi mais ou menos constante ao longo do experimento e se manteve próxima de 0,20.

Estudos têm demonstrado a maior eficiência de formas orgânicas do Se em aumentar a concentração de Se no leite de vacas que formas inorgânicas (KNOWLES et al., 1999; ORTMAN; PEHRSON, 1999). Contudo, maior concentração de Se na dieta de vacas em lactação também aumentam a perda de Se por excreção pela glândula mamária, através da caseína e de outras proteínas do leite, que incorporam aleatoriamente SeMet da dieta (KNOWLES et al., 1999). Nesta situação, a proporção do Se absorvido capaz de suprir a exigência nutricional de Se do animal, ou seja, para manterem ativas e em normal funcionamento as selenoproteínas funcionais, não é conhecida. O organismo de vacas de alta produção regula o metabolismo para maximizar o aporte de nutrientes para a secreção de leite (BAUMAN; GRIINARI, 2000) e, em

consequência, formas orgânicas de Se podem ser excretadas no leite em maior quantidade. Desse modo, a probabilidade de animais de alta produção apresentarem sintomas de deficiência de Se é mais alta.

A incorporação de Se orgânico à caseína foi diferente da incorporação de Se inorgânico (KNOWLES et al., 1999; CONRAD; MOXON, 1979). A concentração de Se na caseína corresponde a 71% do Se no leite total (KNOWLES et al., 1999). A melhor caracterizada e, provavelmente, a única forma biologicamente ativa do Se é a SeCis, mas boa parte do Se no leite e na caseína está presente por incorporação inespecífica do aminoácido análogo SeMet. A SeCis necessária para selenoenzimas, como a GSH-Px, é codificada no mRNA como UGA, usando [Se]Cis-tRNA. Vacas não podem utilizar o Se inorgânico para sintetizar SeMet, mas SeMet pré-formada da dieta pode ser incorporada intacta durante a tradução da proteína como [Se]Met-tRNA sem discriminação entre Met e o análogo SeMet. O grau de substituição varia com a proporção da SeMet na Met da dieta. A relação molar entre o Se na caseína (provavelmente como SeMet) e a Met foi de 17, 26 e 88 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ no controle, no selenato e na levedura selenizada, respectivamente. Claramente, a taxa máxima de incorporação de Se na caseína não é limitada pelo tamanho do *pool* de Met nesta proteína.

Juniper et al. (2006) avaliaram o efeito de diferentes fontes e concentrações de Se na dieta de vacas da raça Holandês. Os tratamentos foram: 0,15 mg de Se kg^{-1} de MS da dieta, controle sem adição de Se; 0,27, 0,33 ou 0,40 mg de Se kg^{-1} de MS oriundo de levedura selenizada; ou 0,25 mg de Se kg^{-1} de MS oriundo de selenito de sódio. Os tratamentos não determinaram o desempenho animal, a atividade da GSH-Px e os parâmetros químicos e hematológicos do sangue. A fonte de Se não alterou a excreção de Se nas fezes e na urina. As correlações entre o Se na dieta derivado da levedura e a concentração de Se no leite, no sangue, na urina e nas fezes foram significativas,

positivas e lineares. A levedura aumentou não só a concentração de Se no sangue e no leite, mas também a concentração de SeMet e a SeMet como porcentagem do Se total. Aumento na concentração de Se no leite indica maior biodisponibilidade do Se derivado da levedura quando comparado ao selenito de sódio. A glândula mamária parece ter preferência pela SeMet, que é rapidamente incorporada à proteína láctea. Entretanto, o acréscimo de Se no leite não foi completamente atribuído ao aumento da SeMet, pois apenas 25 a 33% deste acréscimo no Se total pode ser devido ao aumento da SeMet. Isto indica que a incorporação de Se no leite não é exclusiva pela via da Met, e como o leite contém enzimas antioxidantes endógenas, como a glutathione peroxidase e a tioredoxina redutase, que apresentam resíduos de SeCis, esta pode ser uma outra via.

2.5 Desempenho animal

O Se é um micromineral essencial para o organismo. O interesse inicial em Se na produção animal foi relacionado às suas propriedades tóxicas. Entretanto, nos últimos anos tem sido reconhecido que a deficiência de Se é um problema muito mais grave entre os animais que a toxicidade do elemento. A distrofia muscular nutricional, também conhecida como doença do músculo branco, é o principal sinal de uma grave deficiência em ruminantes. Isso ocorre principalmente em bezerros e cordeiros jovens nascidos de fêmeas com deficiência de Se (AMMERMAN; GOODRICH, 1983).

A concentração de Se no soro sanguíneo de vacas, obtida a partir de dados de laboratório de vários rebanhos dos Estados Unidos, variou de 70 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (STOWER; HERDT, 1992). Com base na literatura, a recomendação diária de ingestão de Se para vacas em lactação e gestação varia de 5 a 7 mg para que se tenha adequada concentração de Se no plasma. Ingestão diária de Se

maior que 6 mg não é acompanhada de aumento de Se no plasma e no leite, a partir dessa dose diária as concentrações no plasma e no leite se mantêm praticamente constantes (MAUS et al., 1980). O Se plasmático ou sérico é considerado um bom indicador do suprimento desse elemento no organismo, sendo consideradas deficiência de Se, suplementação marginal e suplementação adequada para bovinos quando as concentrações são <40 , $40-70$ e $>70 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (GERLOFF, 1992; SURAI, 2006a). No sangue total a concentração de Se deve ser $>100 \mu\text{g L}^{-1}$ (GERLOFF, 1992). No Brasil, Lucci, Moxon e Zanetti (1983) encontraram concentrações inferiores a $40 \mu\text{g L}^{-1}$ no soro sanguíneo em 75% das vacas leiteiras analisadas no Estado de São Paulo. Stowe et al. (1988) estudando as respostas de vacas de leite a suplementação oral com vitamina E e Se, verificaram que a suplementação diária com 2 mg de Se aumentou o teor de Se no soro sanguíneo um mês após o início da suplementação.

Knowles et al. (1999) avaliaram o efeito da suplementação com levedura selenizada ou selenato de sódio sobre o desempenho de vacas da raça Holandês nas condições de pastejo da Nova Zelândia. A levedura morta e desidratada utilizada no trabalho foi oriunda de duas partidas industriais contendo 1.000 ou 1.700 mg de Se kg^{-1} , cerca de 50% na forma de SeMet. Trinta e cinco vacas com baixo Se sanguíneo (média de $25 \mu\text{g de Se L}^{-1}$) foram selecionadas em um rebanho de 80 vacas. Estes 35 animais receberam um de cinco tratamentos por 19 semanas: controle sem suplementação e 2 ou 4 mg de Se dia^{-1} como selenato de sódio ou levedura selenizada. A dieta era constituída de pastagem com $0,035 \text{ mg de Se kg}^{-1}$ de MS. Os suplementos de Se foram fornecidos via oral a cada animal três vezes por semana. Tanto a produção de leite, $15 \pm 0,6 \text{ L dia}^{-1}$, quanto a CCS (GRACE; KNOWLES; LEE, 1997) não foram afetadas pelos tratamentos. A atividade da GSH-Px no fígado foi maior nos animais suplementados que no controle, mas não foi afetada pela fonte de Se. A correlação entre a concentração

de Se no sangue e a concentração no leite foi significativa, porém baixa ($r^2=0,24$ e $0,28$, para levedura selenizada e selenato de sódio, respectivamente, $P<0,01$). A levedura selenizada foi duas a três vezes mais efetiva que o selenato na capacidade de aumentar a concentração de Se no leite. Conrad e Moxon (1979) também observaram que maior proporção do Se ingerido foi incorporado ao leite quando este foi oriundo de resíduo de cervejaria que quando oriundo de selenito de sódio.

Acréscimo na ingestão de Se foi associado com aumento linear na concentração de Se no plasma e no leite (MAUS et al., 1980). Grace, Knowles e Lee (1997) observaram maior concentração de Se no leite e no sangue em vacas mantidas a pasto recebendo 30 g de Se intra-ruminal quando comparadas com o grupo não suplementado. A concentração de Se no soro sanguíneo das vacas e dos bezerros, no colostro e no leite foi maior em vacas suplementadas ($0,3 \text{ mg de Se kg}^{-1}$ de MS) dos 60 dias antes do parto até 30 dias após o parto. As vacas suplementadas com levedura selenizada tiveram maior teor de Se no soro sanguíneo que aquelas suplementadas com selenato de sódio, porém, a CCS não foi afetada pela suplementação com Se. Neutrófilos foram coletados do sangue destas vacas aos 28 dias pós-parto e utilizados em um ensaio *in vitro*. À suspensão de neutrófilos foi adicionada *Escherichia coli* para avaliar a fagocitose e a morte intracelular das bactérias pelos neutrófilos. A porcentagem de neutrófilos que fagocitaram bactérias e a morte destas bactérias fagocitadas não foram afetadas pela fonte de Se (WEISS; HOGAN, 2005). Vacas da raça Holandês suplementadas com 5 mg de Se por dia na forma de selenito de sódio durante os últimos 30 dias antes do parto tiveram maior concentração de Se no soro sanguíneo no dia do parto que vacas não suplementadas, no entanto, aos 30 e 60 dias após o parto não houve diferença entre os tratamentos (PASCHOAL; ZANETTI; CUNHA, 2003).

Ivancic Júnior e Weiss (2001) avaliaram o efeito da concentração de Se e S da dieta sobre o balanço de Se de vacas da raça Holandês em lactação por um período experimental de 112 dias. Foram utilizadas trinta vacas em meio de lactação, mantidas em *tie stall* e recebendo dieta completa. Estas foram suplementadas com 0,1 ou 0,3 mg de Se kg⁻¹ de MS, a partir de selenato de sódio, e adição de 0, 0,2 ou 0,4% de S a partir de uma mistura de sulfato de magnésio e de cálcio, em arranjo fatorial totalizando seis tratamentos. A ingestão de MS foi linearmente reduzida com o aumento de S, mas o efeito foi maior quando 0,3 mg de Se kg⁻¹ de MS foi fornecido. Os autores argumentam que o mecanismo desta queda no consumo não está claro, mas que possivelmente o sulfato alteraria o metabolismo microbiano ruminal e os sulfetos gerados a partir do sulfato no rúmen induziriam efeitos neurológicos. O efeito dos tratamentos sobre a produção de leite, gordura e proteína foi similar ao observado para a ingestão de MS. Aumento de S na dieta provocou queda linear na concentração plasmática e nas digestibilidades aparente (42,7, 33,1 e 30,1%) e verdadeira (50,5, 46,0 e 42,3%) do Se. O efeito negativo do S dietético sobre a digestibilidade verdadeira do Se pode ter decorrido de alterações no metabolismo ruminal. Aumento da concentração de S na dieta está associado à redução do pH ruminal favorecendo a conversão do Se em formas insolúveis e, conseqüentemente, reduzindo a incorporação de Se pelas bactérias ruminais. A excreção diária de Se nas fezes (1,6 vs 2,8 mg) e na urina (0,5 vs 1,3 mg) foi maior e no leite (0,4 vs 0,3 mg) foi menor para vacas suplementadas com 0,3 mg de Se kg⁻¹ de MS comparado com 0,1 mg de Se kg⁻¹ de MS. Não houve efeito do teor de Se sobre a digestibilidade verdadeira do Se. As vacas que receberam 0,3 mg de Se kg⁻¹ de MS apresentaram maior concentração de Se no plasma que aquelas alimentadas com 0,1 mg de Se kg⁻¹ de MS. Houve interação entre o Se e o S para a concentração plasmática de Se ($P < 0,08$), que foi menor para as vacas que receberam 0,4% de S e 0,1 mg de Se kg⁻¹ de MS. Sulfato como fonte de S

reduziu o balanço de Se especialmente quando as vacas receberam dieta com menos de 0,3 mg de Se kg⁻¹ de MS.

Vacas holandesas em final de lactação foram suplementadas por 31 dias com doses diárias de Se oriundo de levedura selenizada variando de 0 a 42 mg. A quantidade de Se excretado no leite e na urina, a quantidade aparentemente retida nos tecidos e a concentração de Se no sangue aumentaram linearmente com a ingestão de Se. A quantidade de Se excretado nas fezes, a excreção conjunta de Se na urina e nas fezes e a concentração de Se no plasma aumentaram curvilinearmente com a ingestão de Se, mas proporcionalmente menos Se foi excretado com o aumento da quantidade ingerida. A excreção total diária de Se foi 66% do Se consumido, a excreção na urina 26%, nas fezes 41% e no leite 17% do total de Se ingerido e o Se aparentemente retido foi 17% do total de Se ingerido (WALKER et al., 2010).

Ovinos, bovinos e equinos, previamente submetidos a duas semanas sem suplementação com Se, foram alimentados com dieta contendo 0,3 mg de Se kg⁻¹ de MS, oriundo de selenato ou selenito de sódio. O período de suplementação foi de 49 dias para as vacas em lactação, ou 56 dias para os ovinos e equinos. Apenas as vacas suplementadas com selenato tiveram maior concentração de Se no soro sanguíneo que as suplementadas com selenito. A atividade da GSH-Px não diferiu entre as três espécies. O Se no soro, mas não a atividade da GSH-Px, aumentou com o decorrer do tempo de suplementação. A concentração de Se no músculo esquelético e no fígado dos cordeiros, mensurada ao final do período experimental, não diferiu entre as fontes de Se (PODOLL et al., 1992).

Heard et al. (2007) avaliaram o efeito da concentração e da fonte de Se na dieta em vacas de leite a pasto. Foram realizados dois experimentos, um no início (Experimento 1) e outro no final da lactação (Experimento 2), com duração de seis semanas e 60 vacas multíparas em cada. Os animais foram alocados em um dos 10 tratamentos: 4 kg de MS dia⁻¹ de grão triticales na dieta

basal com baixo Se ($165 \mu\text{g}$ de Se kg^{-1} de MS) ou alto Se ($580 \mu\text{g}$ de Se kg^{-1} de MS) e 1 kg de MS dia^{-1} de peletes contendo 0, 4, 8, 12 ou 16 mg de Se oriundo de levedura selenizada. O pelete da levedura foi feito a partir de grão triticales com baixo teor de Se. A ingestão diária de Se na dieta total variou de 1,5 a 18,9 mg vaca^{-1} nos dois experimentos. Não foi observado efeito de tratamento sobre a CCS, a produção e a composição do leite, exceto o teor de lactose que foi maior no Experimento 2 à medida que aumentou a suplementação com levedura. A concentração de Se no leite atingiu o platô após 15 e 7 dias do início da suplementação nos experimentos 1 e 2, respectivamente, e permaneceu alta até o fim do período experimental. A concentração média de Se no leite aumentou proporcionalmente à ingestão de levedura selenizada, e os tratamentos com alto e baixo Se nos grãos foram diferentes para todas as quantidades de levedura, mas a diferença tendeu a diminuir à medida que aumentou a suplementação com levedura. Nos dois experimentos houve correlação linear e positiva entre a ingestão de Se e a concentração de Se no leite, mas ela não foi afetada pela fonte de Se. A excreção de Se no leite foi maior no experimento 1 que no 2, porque a produção de leite das vacas no início da lactação foi maior. A proporção estimada de Se não presente no leite e nas fezes foi proporcional à quantidade de Se na dieta e foi maior nas vacas em final de lactação que naquelas em início da lactação. O aumento na ingestão de Se induziu resposta positiva nos teores de Se no sangue, no plasma e no músculo semitendinoso. A concentração de Se no plasma aumentou com a suplementação de até 12 mg de Se, mas não foi afetada pela fonte de Se. Uma semana após o término da suplementação com a levedura a concentração de Se no leite voltou a valores próximos aos encontrados antes da suplementação. A concentração de Se no sangue e no plasma declinaram mais lentamente, indicando influxo contínuo de Se dos tecidos corporais para o sistema circulatório, que permaneceu por cerca de três semanas.

2.6 Selênio e saúde da glândula mamária

A deficiência dietética de vitamina E e Se aumenta a susceptibilidade da glândula mamária a infecções e pode ser avaliada pelo efeito desses nutrientes sobre os mecanismos de resistência e proteção das membranas celulares contra a degradação oxidativa (SMITH et al., 1984). A concentração de Se no sangue tem sido utilizada como medida do *status* de Se, pois aumento na concentração de Se no sangue tem sido correlacionada com redução na CCS e na incidência de mastite e aumento na função dos neutrófilos (CEBRA et al., 2003).

A invasão de patógenos na glândula mamária desencadeia o influxo de neutrófilos polimorfonucleares e outros glóbulos brancos. A produção de leucotrieno B4 por macrófagos e neutrófilos é importante para a iniciação e a amplificação desta resposta. A fagocitose de patógenos invasores resulta em uma explosão respiratória nos neutrófilos (CRAVEN; WILLIAMS, 1985). Durante a explosão respiratória há aumento do metabolismo de oxigênio dentro da célula e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que são produzidas para destruir o patógeno fagocitado. O processo fagocitário é acompanhado pelo aumento intracelular de peróxidos, que é necessário para destruição da bactéria, mas potencialmente perigoso para o tecido celular e arredores.

Acúmulo de peróxido de hidrogênio no neutrófilo geralmente compromete a morte intracelular de patógenos (SMITH; HOGAN; WEISS, 1997). Claramente, a velocidade com que os neutrófilos são mobilizados após a invasão do patógeno e a eficiência em destruí-los dentro da célula são eventos importantes para a proteção da glândula mamária a infecções (CRAVEN; WILLIAMS, 1985). O Se desempenha papel essencial nestes eventos, e sua deficiência alimentar induz distúrbio na função dos neutrófilos e aumento da

incidência de infecção intramamária em vacas leiteiras (HOGAN; WEISS; SMITH, 1993).

Smith et al. (1984) avaliaram o efeito da suplementação de vitamina E e Se sobre a incidência de mastite clínica em vacas leiteiras multíparas. Nas vacas que receberam dietas suplementadas diariamente com 740 UI de vitamina E via oral durante o período seco foi observada incidência de mastite clínica durante a lactação subsequente 37% menor que nas vacas não suplementadas. A injeção intramuscular de 0,1 mg Se kg⁻¹ de peso vivo 21 dias antes do parto não teve efeito sobre a incidência de mastite clínica. No entanto, as vacas suplementadas com ambos, vitamina E e Se, tiveram menor duração dos sinais clínicos de mastite que as vacas suplementadas somente com Se ou vitamina E. Em outro estudo conduzido com primíparas (SMITH et al., 1985), as dietas foram não suplementadas ou suplementadas com 0,3 ppm de Se na MS e 1.000 UI dia⁻¹ de vitamina E por 60 dias anteriores ao parto e durante a lactação. A vitamina E e o Se plasmáticos foram mais elevados no parto e durante a lactação no grupo suplementado. Novilhas suplementadas apresentaram um número significativamente menor de quartos infectados ao parto, redução na prevalência da infecção durante toda a lactação, menos casos de mastite clínica, infecções de menor duração e menor CCS no leite em comparação às novilhas não suplementadas.

Alta concentração de Se no plasma sanguíneo foi associada a redução na incidência de mastite clínica e baixa CCS no tanque (WEISS et al., 1990). Erskine et al. (1987) relataram correlação negativa entre a porcentagem de quartos infectados com patógenos e a atividade da GSH-Px no sangue do rebanho. Já Ropstad, Overnes e Refsdal (1987) observaram que rebanhos noruegueses com alto *status* de Se tiveram maior frequência de tratamentos para mastite clínica e alta CCS no leite que vacas com menor teor de Se no leite. Ceballos-Marquez et al. (2010) avaliaram a relação entre a concentração de Se

no leite e a CCS e o risco de novas infecções intramamárias no periparto. Foram utilizadas 15 vacas de cada um dos 18 rebanhos canadenses avaliados. A probabilidade de ocorrência de novas infecções intramamárias no período seco por *Streptococcus spp.* e outros patógenos gram-positivos aumentou com acréscimo na concentração de Se no leite. Os autores sugeriram que o aumento de CCS no leite pode aumentar a concentração de Se no leite devido ao influxo de neutrófilos, que têm alta atividade da GSH-Px, para os quartos do úbere infectados. Alta concentração de Se no sangue é desejável, mas alta CCS no leite não. Aumento da concentração de Se no leite é interessante, pois indica maior teor de proteína láctea selenizada, mas desde que a CCS seja baixa, pois se for alta pode estar associada a mastite.

Erskine et al. (1989) avaliaram o efeito da suplementação de Se na saúde da glândula mamária após infusão com *E. coli* na décima quarta semana de lactação. As novilhas foram alimentadas durante os últimos três meses antes do parto e toda a lactação com dieta deficiente em Se contendo 0,04 ppm ou com dieta suplementada com 0,14 ppm de Se oriundo de selenito. O influxo de neutrófilos nos quartos desafiados foi mais rápido nas vacas suplementadas com Se, que também tiveram menos UFC de *E. coli* mL⁻¹ de leite, resultando em infecções menos graves, menor incidência de atrofia mamária e agalaxia, eliminação mais rápida dos patógenos e menor perda de secreção de leite. Paschoal, Zanetti e Cunha (2003) também encontraram resultados semelhantes suplementando vacas holandesas no pré-parto com 5 mg de Se dia⁻¹ na forma de selenito de sódio, o que resultou em consumo diário de 10,6 mg de Se ou 0,98 ppm da dieta. A suplementação com Se reduziu a CCS nas primeiras oito semanas da lactação. Quando suplementaram 1.000 UI de vitamina E dia⁻¹, junto com Se, houve redução da incidência de mastite clínica em 72%, comparado ao grupo controle.

Vacas de leite alimentadas com dieta deficiente em Se foram suplementadas através de uma única injeção subcutânea de 1 µg de selenato de bário kg⁻¹ de peso vivo aos 45 dias antes do parto. A atividade da GSH-Px no sangue e a CCS no leite foram avaliadas ao longo de 21 semanas pós-parto. Na vigésima semana pós-parto dois quartos da glândula mamária de cada vaca foram infundidos com *Staphylococcus aureus*. A suplementação de Se resultou em maior atividade da GSH-Px e menor CCS ao longo das 21 semanas pós-parto em comparação com as vacas não suplementadas (KRUZE et al., 2007). Schukken et al. (1993) concluíram que o *status* de Se foi um fator de risco no estabelecimento de infecção por *S. aureus* após inoculação intramamária. Em um estudo *in vitro*, a morte intracelular de *S. aureus* foi maior em neutrófilos isolados a partir de vacas suplementadas com Se oriundo de selenito de sódio que nas não suplementadas. Entretanto, a suplementação com Se não teve efeito sobre a morte intracelular de *E. coli* e a capacidade fagocitária dos neutrófilos (HOGAN et al., 1990). O consumo de dietas contendo 0,3 ppm de Se oriundo de levedura selenizada ou selenato de sódio não afetou a CCS e a função de neutrófilos no leite de vacas após infusão intramamária com lipopolissacarídeos de *E. coli* (WEISS; HOGAN, 2005). Suplementação com Se parece ser efetiva no combate à infecção intramamária com *S. aureus*, mas não com *E. coli*.

Jukola et al. (1996) avaliaram a saúde do úbere de trinta rebanhos da Finlândia durante um ano, em estudo envolvendo cerca de 2.000 vacas, e observaram que a concentração média de Se no sangue foi 191 µg L⁻¹, variando de 93 a 305 µg L⁻¹. Maior concentração de Se no sangue foi associada à redução de infecções da glândula mamária, incluindo os agentes *S. aureus*, *Actinomyces pyogenes* e *Corynebacterium spp.*. Os autores sugerem que a concentração de Se no sangue adequada para otimizar a saúde do úbere seria acima de 200 µg L⁻¹. O relacionamento linear entre a concentração de Se no sangue e a atividade da GSH-Px no sangue foi: atividade da GSH-Px no sangue = -63,6 + 6,3

concentração de Se no sangue ($r^2=0,61$, $P<0,01$). Não houve relação entre a atividade da glutathiona e a incidência de infecção por patógenos e a CCS.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento 1

Vinte e oito vacas da raça Holandês em lactação receberam uma dieta isenta de Se suplementar por 60 dias anteriores ao período de aplicação dos tratamentos. Ao final deste período de padronização, os animais foram blocados em pares com base na ordem de parto e na produção diária de leite. As variáveis mensuradas no final da padronização foram utilizadas como covariável no modelo de análise estatística. Dentro de cada bloco, o tratamento a ser fornecido ao longo dos 106 dias do período de comparação foi definido aleatoriamente. O dias em lactação foi 191 ± 127 (média \pm desvio padrão) no dia 1 do período de comparação. Duas dietas basais isentas de Se suplementar foram utilizadas: Dieta 1 para os oito blocos de maior produção e Dieta 2 para os seis blocos de menor produção (Tabela 1).

Os tratamentos foram fornecidos diariamente a cada animal uma vez ao dia por ingestão forçada, objetivando obter teor de Se total na MS ingerida ao redor de 0,3 ppm (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 2001). Os tratamentos foram: Selenito (45,1% de Se na forma de selenito de sódio) ou Selemax (2245 ppm de Se na forma de levedura selenizada. Selemax[®], Biorigin, Lençóis Paulista, SP). Os animais receberam diariamente 2,1 g de Selemax ou 0,011 g de selenito de sódio, capaz de resultar em dose diária de Se suplementar por animal de 4,64 mg para Selemax e 4,88 mg para Selenito, acondicionados em cápsulas de gelatina. Uma mistura mineral isenta de Se foi formulada, de modo que todo o Se dietético suplementar se originou das cápsulas com os tratamentos.

Os animais foram alimentados individualmente em confinamento total do tipo *tie stall* com camas de areia. Os alimentos foram oferecidos na forma de

dieta completa misturada duas vezes por dia e fornecida em quantidade suficiente para obter no mínimo 10% do oferecido como sobra diária. A dieta oferecida e as sobras alimentares de cada vaca foram mensuradas diariamente.

Tabela 1 Composição das dietas em ingredientes e nutrientes. Experimento 1

	Dieta 1	Dieta 2
	% da matéria seca	
Silagem de milho	42,3	38,4
Cana-de-açúcar		17,5
Farelo de soja	21,0	21,8
Uréia		0,2
Polpa de citros	17,3	9,7
Milho maduro moído fino	17,2	9,5
Óxido de magnésio	0,2	0,2
Bicarbonato de sódio	0,7	0,9
Calcário calcítico	0,7	0,9
Sal	0,3	0,4
Minerais e vitaminas ¹	0,3	0,4
Proteína bruta	16,4	16,2
Fibra em detergente neutro	29,8	33,0
Fibra em detergente neutro de silagem de milho	17,8	16,1
Fibra em detergente neutro de cana-de-açúcar		8,7
Extrato etéreo	6,1	5,0
Cinzas	7,3	7,3
Carboidratos não-fibrosos ²	40,4	38,5
	% da matéria natural	
Matéria seca	48,8	39,1
	mg kg de matéria seca ⁻¹	
Selênio	0,08	0,09

¹ Minerais e Vitaminas: 18,5% de Ca; 15,0% de P; 3,0% de Mg; 3,0% de S; 240 ppm de Co; 3000 ppm de Cu; 8000 ppm de Mn; 12000 ppm de Zn; 180 ppm de I; 1.000.000 UI kg⁻¹ Vit. A; 250.000 UI kg⁻¹ Vit. D; 6.250 UI kg⁻¹ Vit E

² Carboidratos não-fibrosos = 100 – (Proteína bruta + Fibra em detergente neutro + Extrato etéreo + Cinzas)

Amostras compostas de alimentos e sobras foram formadas com base em quantidades idênticas de matéria natural e analisadas para cálculo da dieta

consumida. Os compostos foram pré-secos em estufa ventilada por 72 horas a 55°C, triturados em peneira de 1 mm em moinho do tipo Thomas-Willey, e uma subamostra foi desidratada a 100°C por 24 horas para determinação do teor de MS. A proteína bruta foi analisada por um destilador a vapor do tipo Microkjeldhal (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - A. O. A. C., 1975). As análises de extrato etéreo foram realizadas segundo A. O. A. C. (1990). As cinzas foram determinadas por incineração da amostra a 550°C por 8 horas. O teor de fibra em detergente neutro foi analisado por um determinador de fibra TE-149 (TECNAL, Piracicaba, SP), utilizando amilase e sulfito de sódio.

As vacas foram ordenhadas três vezes por dia e a produção de leite foi mensurada diariamente. As três ordenhas dos dias -1 e 0 (final da padronização); 15, 16 e 17 (semana 3); 36, 37, e 38 (semana 6); 57, 58 e 59 (semana 9); e 99, 100 e 101 (semana 15) foram amostradas. As amostras foram conservadas com bronopol para determinação de CCS, proteína, gordura, lactose e nitrogênio uréico no Laboratório Centralizado da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH, Curitiba, PR). A secreção diária de energia no leite foi calculada pela equação (NRC, 2001): Energia no leite (Mcal kg⁻¹) = [(0,0929 x % gordura) + (0,0547 x % de proteína) + (0,0395 x % de lactose)] x kg de leite. Amostras de leite *in natura* foram obtidas e congeladas nos dias 0, 4, 8, 16, 37 e 57 para análise da concentração de Se. As análises de Se foram realizadas pelo método da digestão ácida (EPA 3050B) por absorção atômica segundo Olson, Palmer e Cary (1975) (Lachem, Laboratório de Análises Químicas da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS).

O balanço de Se foi determinado entre os dias 39 e 41 do período de comparação. Nestes dias, amostras compostas de alimentos, sobras, fezes e urina foram congeladas para análise do teor de Se, como anteriormente descrito. A excreção diária de fezes e urina foi mensurada por coleta total de fezes e urina

realizada por 8 horas ininterruptas. A coleta em cada dia foi iniciada com 8 horas de atraso em relação ao dia anterior, visando obter uma amostragem representativa das 24 horas do dia, sem causar distúrbio no consumo de alimentos e na produção de leite dos animais. Amostras de fezes e urina proporcionais ao excretado foram imediatamente congeladas ao longo da coleta e formaram uma amostra composta por vaca. A excreção diária de Se pelas fezes, pela urina e pelo leite foi calculada. A digestibilidade aparente do Se no trato digestório total foi calculada como a proporção do Se ingerido não excretado nas fezes. O balanço de Se foi calculado subtraindo da absorção diária a excreção de Se na urina e no leite.

Nos dias 0, 43 e 106 amostras de sangue foram obtidas dos vasos coccígeos, $10,6 \pm 0,5$ horas após a alimentação da manhã. O sangue foi coletado em tubos contendo heparina lítica. Após centrifugação, o plasma foi congelado para análise da concentração de Se no dia 43 e da atividade da glutathione peroxidase nos dias 0, 43 e 106. A atividade da enzima glutathione peroxidase foi mensurada a cada 30 segundos por 8 minutos em leitor de microplaca com absorbância a 340 nm (Glutathione Peroxidase Activity Kit, Assay Designs, Ann Arbor, EUA).

3.2 Experimento 2

Quarenta e duas vacas da raça Holandês em lactação foram blocadas em pares com base na ordem de parto e na produção diária de leite. As variáveis mensuradas nos dias -2, -1 e 0 em relação ao período de comparação foram utilizadas como covariável no modelo de análise estatística. Dentro de cada bloco, o tratamento a ser fornecido ao longo dos 56 dias do período de comparação foi definido aleatoriamente. O dias em lactação foi 189 ± 103 no dia 1. Duas dietas basais contendo Se suplementar na forma de selenito de sódio

foram adotadas: Dieta 1 para os 18 blocos de maior produção e Dieta 2 para os três blocos de menor produção (Tabela 2).

Tabela 2 Composição das dietas em ingredientes e nutrientes. Experimento 2

	Dieta 1	Dieta 2
	% da matéria seca	
Silagem de milho	44,7	55,5
Farelo de soja	20,2	19,1
Uréia	0,4	0,5
Polpa de citros	15,3	8,9
Milho maduro moído fino	16,8	13,1
Óxido de magnésio	0,3	0,3
Bicarbonato de sódio	0,9	1,0
Calcário calcítico	0,9	1,0
NaCl	0,4	0,5
Minerais e vitaminas ¹	0,3	0,4
Proteína bruta	17,2	16,4
Fibra em detergene neutro	37,1	38,6
Extrato etéreo	3,3	3,0
Cinzas	7,0	6,8
Carboidratos não-fibrosos ²	36,2	34,4
	% da matéria natural	
Matéria seca	46,7	43,5
	Mg kg de matéria seca ⁻¹	
Selênio	0,16	0,15

¹ Minerais e Vitaminas: 21,0% de Ca; 15,6% de P; 3,0% de Mg; 3,3% de S; 150 ppm de Co; 2000 ppm de Cu; 5000 ppm de Mn; 82 ppm de Se; 11850 ppm de Zn; 200 ppm de I; 1.000.000 UI kg⁻¹ Vit. A; 220.000 UI kg⁻¹ Vit. D; 6.200 UI kg⁻¹ Vit E

² Carboidratos não-fibrosos = 100 – (Proteína bruta + Fibra em detergente neutro + Extrato etéreo + Cinzas)

Os tratamentos foram fornecidos diariamente a cada animal sobre a dieta oferecida pela manhã. Os tratamentos foram: Selemax (1923 ppm de Se na forma de levedura selenizada. Selemax[®], Biorigin, Lençóis Paulista, SP) ou Controle (Levedura contendo 0,145 ppm de Se. Nutricell[®], Biorigin, Lençóis

Paulista, SP). Os animais receberam diariamente cerca de 2 g de Selemax ou Nutricell, capaz de resultar em uma dose diária de Se suplementar de 3,85 mg para Selemax e 0,0003 mg no Controle.

Nos dias 12, 27, 40 e 55 amostras da dieta oferecida para cada vaca foram obtidas. Uma amostra composta para a dieta 1 e outra para a 2 foram formadas com base em quantidades idênticas de matéria natural. Uma subamostra dos compostos foi utilizada para análises bromatológicas e outra foi congelada para análise do teor de Se, como anteriormente descrito.

O local de abrigo dos animais e o manejo alimentar foram idênticos ao Experimento 1. As vacas foram ordenhadas duas vezes por dia e a produção de leite foi mensurada a cada duas semanas por dois dias consecutivos. As duas ordenhas dos dias 0 (final da padronização), 14 (semana 2), 28 (semana 4), 42 (semana 6) e 56 (semana 8) foram amostradas. As amostras foram conservadas com bronopol e analisadas como anteriormente descrito. Amostras de leite *in natura* foram obtidas e congeladas no dia 42 para análise da concentração de Se.

3.3 Análise estatística

Experimento 1

As variáveis medidas ao longo do tempo (produções e teores no leite de gordura, proteína, lactose, nitrogênio uréico, CCS e Se, e atividade da glutatona peroxidase) foram analisadas como medidas repetidas pelo procedimento Mixed do pacote estatístico SAS (LITTELL et al., 1996). A estrutura de covariância utilizada foi definida pelo critério de informação de Akaike. As estruturas de covariância consideradas foram autorregressiva de primeira ordem, não-estruturada e simetria composta. O quadrado médio para o efeito de vaca dentro de tratamento foi utilizado como medida de erro para testar o efeito de tratamento. O seguinte modelo foi utilizado: $Y_{ijk} = \mu + CV + B_i + T_j + D_k + TD_{jk}$

+ e_{ijk} . Em que: μ = média geral, CV = covariável (medida da mesma variável obtida no final da padronização), B_i = efeito de bloco ($i = 1$ a 14), T_j = efeito de tratamento ($j =$ Selenito, Selemax), D_k = efeito de dia, TD_{jk} = interação entre tratamento e dia, e_{ijk} = erro residual. Para as variáveis mensuradas apenas uma vez durante o período experimental (balanço de Se, digestibilidade e absorção de Se, consumo, concentração de Se no plasma e excreção de Se) o mesmo modelo foi utilizado, mas sem o efeito de dia e sua interação com tratamento e sem a covariável.

Experimento 2

As variáveis medidas ao longo do tempo (produções e teores no leite de gordura, proteína e lactose e CCS) foram analisadas como medidas repetidas pelo procedimento Mixed do pacote estatístico SAS (LITTELL et al., 1996) como anteriormente descrito. O modelo estatístico foi idêntico ao utilizado no Experimento 1. Para a variável concentração de Se no leite, mensurada apenas uma vez durante o período experimental, o mesmo modelo foi utilizado, mas sem o efeito de dia e sua interação com tratamento e sem a covariável.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de Se no leite normalmente varia de 10 a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CONRAD; MOXON, 1979; LEAN et al., 1990; VAN DAEL et al., 1991) e é sabidamente dependente do consumo diário do mineral (GRACE; KNOWLES; LEE, 1997). No Experimento 1, a não suplementação com fonte de Se durante os 60 dias do período de padronização resultou em teores de Se no leite imediatamente antes do início da administração dos tratamentos de 0,89 $\mu\text{g L}^{-1}$ no Selamax e 2,28 $\mu\text{g L}^{-1}$ no Selenito (Figura 3). Surai (2006b) recomenda que teor de Se no leite abaixo de 5,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ é indicativo de deficiência nutricional deste micromineral, e valor maior que 10,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ é indicador de suprimento nutricional adequado. A dieta isenta de Se suplementar foi capaz de induzir deficiência de Se nos animais.

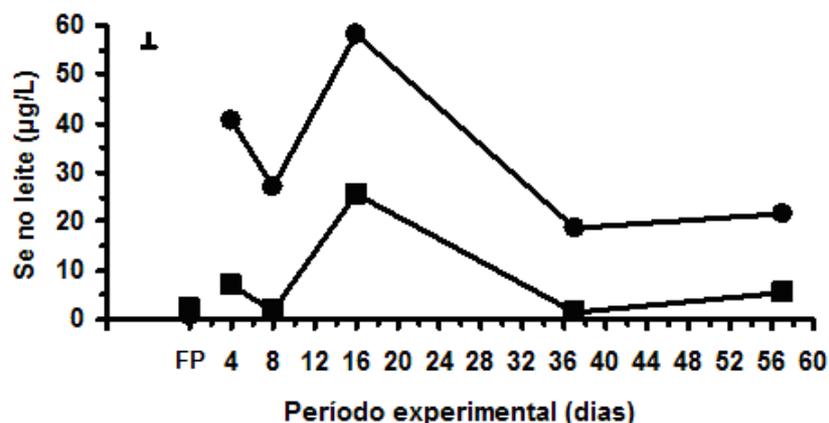


Figura 3 Concentração de Se no leite de vacas suplementadas com levedura selenizada (•, Selamax) ou selenito de sódio (■, Selenito). Valores ajustados para a medida da mesma variável no final da padronização (FP). Experimento 1

Quando cerca de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ de Se orgânico ou inorgânico na MS total ingerida foi suplementado após a indução experimental de deficiência do mineral, a resposta em teor de Se no leite ao tratamento Selemax foi ao redor de $33 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 3), praticamente o triplo do valor mínimo sugestivo de adequação nutricional por Surai (2006b). Entretanto, o tratamento Selenito induziu teor de Se no leite próximo ao mínimo recomendado por Surai (2006b), valor quatro vezes inferior ao obtido no Selemax (Tabela 3). A maior incorporação de Se no leite quando este foi suplementado em forma orgânica comparativamente a Se inorgânico tem sido relatada por pesquisadores (CONRAD; MOXON, 1979; KNOWLES et al., 1999; ORTMAN; PEHRSON, 1999), provavelmente como resultado da incorporação de complexos Se-aminoácidos na proteína e em enzimas antioxidantes do leite (JUNIPER et al., 2006). Os valores de teor de Se no leite sugerem que no tratamento Selenito a suplementação foi próxima ao mínimo nutricionalmente adequado.

Apesar de a resposta em teor de Se no leite à variação nas fontes minerais ter sido maior que a resposta em teor plasmático de Se, houve tendência fraca ($P=0,14$) de ocorrência de menor teor de Se no plasma no Selenito, semelhante ao observado para o teor no leite (Tabela 3). Os valores de Se no plasma foram fisiologicamente normais nos dois tratamentos, já que teores entre 70 e $100 \mu\text{g L}^{-1}$ são esperados em vacas leiteiras (WEISS et al., 1990; STOWER; HERDT, 1992). Quando o intuito é obter o efeito benéfico da suplementação com Se sobre a incidência de mastite, Jukola et al. (1996) sugerem que a concentração plasmática de Se deve ser ao redor de $80 \mu\text{g L}^{-1}$. Maus et al. (1980) observaram que a concentração de Se no plasma de vacas leiteiras consumindo doses crescentes do mineral atingiu o platô quando o consumo diário de Se foi 6 mg , semelhante ao observado no Experimento 1 (Tabela 4). A meta de consumo de 6 mg por dia, justifica a recomendação clássica, estabelecida pelo NRC (1989) de vacas leiteiras, para a exigência

nutricional de $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ para a concentração de Se na MS dietética, mantida na versão mais recente desta norma nutricional (NRC, 2001). Os teores plasmáticos de Se do Experimento 1 (Tabela 3) sugerem que a suplementação com selenito de sódio foi adequada nutricionalmente, e valores de Se no plasma de $90 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e no leite de $30 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, observados no Selemax, seriam uma resposta adicional à suplementação com levedura selenizada comparativamente a selenito de sódio, em que os teores foram ao redor de $80 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ no plasma e $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ no leite.

Tabela 3 Concentração de Se no leite e no plasma e desempenho de vacas leiteiras suplementadas com levedura selenizada (Selemax) ou selenito de sódio (Selenito). Experimento 1

	Selemax	Selenito	EPM ¹	Trat	P ²	
					Sem	Int
	kg d ⁻¹					
Leite	26,7	26,9	0,7	0,84	0,05	0,31
Gordura	0,806	0,865	0,039	0,30	<0,01	0,28
Proteína	0,850	0,910	0,035	0,25	<0,01	0,09
Lactose	1,170	1,290	0,048	0,09	<0,01	0,25
	%					
Gordura	3,14	3,21	0,09	0,61	<0,01	0,51
Proteína	3,34	3,30	0,05	0,71	0,04	0,06
Lactose	4,43	4,55	0,08	0,30	0,15	0,12
	$\mu\text{g L}^{-1}$					
Selênio no leite	33,3	8,3	2,9	<0,01	<0,01	0,05
Selênio no plasma	91,4	77,3	6,3	0,14		
	mg dL ⁻¹					
Nitrogênio uréico no leite	14,3	15,0	0,7	0,46	<0,01	0,45
	x1000 células mL ⁻¹					
CCS ³	354	352	125	0,99	0,08	0,73
	Mcal d ⁻¹					
Energia no leite	16,4	17,8	0,7	0,18	<0,01	0,19

¹EPM = Erro padrão das médias

²P = Valores de P para o efeito de tratamento (Trat), semana (Sem) e interação entre Trat e Sem (Int)

³CCS = Contagem de células somáticas do leite

Tabela 4 Consumo de matéria seca, produção de leite, excreção de fezes e urina, e balanço de Se em vacas suplementadas com levedura selenizada (Selemax) ou selenito de sódio (Selenito). Experimento 1

	Selemax	Selenito	EPM ¹	P ²
	kg d ⁻¹			
Consumo	18,9	19,9	0,5	0,22
Leite	25,1	27,1	1,0	0,16
Fezes (Matéria natural)	43,2	45,4	1,5	0,32
Fezes (Matéria seca)	5,3	5,6	0,2	0,50
Urina	16,1	15,0	0,8	0,37
	mg d ⁻¹			
Se ingerido	6,16	6,47	0,06	<0,01
Se nas fezes	3,69	3,01	1,05	0,66
Se na urina	2,10	2,20	0,33	0,84
Se no leite	0,39	0,05	0,05	<0,01
Se excretado	6,18	5,26	1,15	0,58
	% do ingerido			
Digestibilidade aparente do Se	39,5	53,9	16,7	0,55
	mg d ⁻¹			
Se absorvido	2,48	3,46	1,06	0,52
Balanço de Se	-0,01	1,22	1,16	0,46

¹EPM = Erro padrão das médias

²P = Valores de P para o efeito de tratamento

O teor de Se no leite no Experimento 2, ao redor de 70 µg L⁻¹ no Selemax (Tabela 5), foi acima do observado no Experimento 1 (Tabela 3). O teor de Se no leite no Controle, ao redor de 45 µg L⁻¹ (Tabela 5), também foi elevado, mesmo com teor analisado de Se na dieta basal abaixo dos 0,3 ppm desejados (Tabela 2). O maior teor de Se no leite no Experimento 2 pode ter decorrido da maior CCS inicial das vacas neste experimento. Ceballos-Marquez et al. (2010) observaram que aumento de CCS pode aumentar a concentração de Se no leite, devido ao influxo de neutrófilos com alta atividade de GSH-Px para a glândula mamária infectada. No Experimento 2, a correlação linear entre o teor de Se no leite e a CCS teve r=0,28 (P=0,06), enquanto o relacionamento entre estas variáveis foi inexistente no Experimento 1 (r=0,10. P=0,62). Fatores

dietéticos também podem determinar a absorção e o metabolismo de Se. Baixo pH ruminal pode induzir maior formação de Se insolúvel (GERLOFF, 1992). Os teores de cálcio (HARRISON; CONRAD, 1984) e S (POPE et al., 1979) da dieta podem afetar a digestibilidade do Se ingerido. Também existe a possibilidade dos microminerais zinco (HOUSE; WELCH, 1989) e cobre (KOENIG et al., 1991b) determinarem a absorção e o metabolismo do Se. A disparidade nos valores de teor de Se no leite entre os Experimentos 1 e 2 (Tabelas 3 e 5), sugere que rebanhos com produção diária e ingredientes dietéticos similares podem ter alta variabilidade no teor de Se do leite.

Tabela 5 Concentração de Se no leite e desempenho de vacas suplementadas com levedura selenizada (Selemax) ou Controle. Experimento 2

	Selemax	Controle	EPM ¹	Trat	P ²	
					Sem	Int
	kg d ⁻¹					
Leite	25,6	26,0	0,8	0,72	<0,01	0,35
Gordura	0,802	0,854	0,031	0,25	<0,01	0,03
Proteína	0,816	0,829	0,024	0,70	<0,01	0,77
Lactose	1,137	1,153	0,035	0,75	<0,01	0,56
Sólidos	2,723	2,803	0,078	0,48	<0,01	0,36
	%					
Gordura	3,26	3,34	0,09	0,54	<0,01	0,05
Proteína	3,25	3,25	0,04	0,95	<0,01	0,25
Lactose	4,44	4,44	0,02	0,91	<0,01	0,19
Sólidos	10,85	10,93	0,10	0,60	<0,01	0,09
	µg L ⁻¹					
Selênio no leite	72,0	46,5	4,92	<0,01		
	x1000 células mL ⁻¹					
CCS ³	358	598	97	0,10	0,41	0,23
	Mcal d ⁻¹					
Energia no leite	16,4	17,0	0,5	0,40	<0,01	0,19

¹EPM = Erro padrão das médias

²P = Valores de P para o efeito de tratamento (Trat), semana (Sem) e interação entre Trat e Sem (Int).

³CCS = Contagem de células somáticas do leite

Houve variação no teor de Se do leite ao longo da suplementação após indução de deficiência de Se, mas o teor de Se do leite no Selemax foi maior que o teor no Selenito em todas as amostragens realizadas (Figura 3). Aumento substancial no teor de Se do leite em resposta ao Selemax foi observado com quatro dias do início da suplementação. Stockdale et al. (2011) também observaram resposta rápida em teor de Se do leite à suplementação com levedura selenizada. Estes autores detectaram que 89% do valor de platô na concentração láctea de Se ocorreu cinco dias após o início da suplementação, valor seis vezes superior ao mensurado imediatamente antes da suplementação.

O pico no teor de Se do leite ($P < 0,01$ para o efeito de dia de amostragem) foi observado em ambos os tratamentos 16 dias após o início da suplementação (Figura 3), momento no qual foi observada a maior diferença numérica entre tratamentos ($P = 0,05$ para a interação entre tratamento e dia de amostragem). No Selenito, o teor de Se do leite foi maior que $10 \mu\text{g L}^{-1}$ apenas neste dia de amostragem. A glândula mamária parece ter preferência pela SeMet oriunda de Se orgânico, rapidamente incorporada à proteína láctea, mas a capacidade de transporte do aminoácido selenizado parece variar ao longo da lactação. Knowles et al. (1999) observaram que levedura selenizada aumentou mais o teor de Se do leite que selenato de sódio, mas a relação entre o teor de Se do leite e o teor no sangue, uma medida indireta da eficiência de absorção pela glândula mamária, foi 0,24 antes da suplementação, 0,47 no dia 21 de suplementação, e 0,20 aos 133 dias de suplementação, e foi constante e próxima de 0,20 no selenato. Distintamente, a concentração de Se no leite em vacas suplementadas com 16 mg por dia de Se oriundo de levedura selenizada atingiu o platô no dia 12 e permaneceu constante até o dia 42 do período experimental (STOCKDALE et al., 2011). Pode ser que vacas suplementadas acima da exigência nutricional têm padrão de teor de Se no leite ao longo da suplementação diferente do de vacas suplementadas para suprir a demanda

nutricional. Isto explicaria a alta concentração de Se no dia 42 do Experimento 2, enquanto houve queda na concentração após o pico de Se no leite no Experimento 1.

A variabilidade no teor de Se do leite ao longo do período de suplementação (Figura 3) e entre experimentos (Tabelas 3 e 5) pode ter implicações comerciais. A predição do teor lácteo de Se em leite selenizado por inclusão dietética de suplementos capazes de aumentar a incorporação do mineral no leite pode ter baixa acurácia. Em uma situação hipotética de pagamento de leite por qualidade em teor de Se, análises rotineiras de Se podem ser necessárias para definir o teor do mineral na matéria prima disponível para a indústria. Entretanto, as técnicas atuais de mensuração de Se em alimentos, como espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (ALEIXO; NÓBREGA, 2003) ou geração de hidreto (HAHN et al., 1981), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (CONI et al., 1990), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (STÜRUP; BÜCHERT, 1996) e cromatografia gasosa (SHIMOISHI, 1976), podem ser demasiadamente complexas e lentas para uso rotineiro em laticínios. Amostragens sequenciais para a análise do teor de Se em amostras compostas e pagamento de prêmios cumulativos por qualidade seria uma alternativa para reduzir a quantidade de análises laboratoriais de Se.

A produção de leite selenizado também deve considerar o possível impacto de produtos lácteos contendo alto teor de Se para o aporte de Se dietético em humanos. O Instituto de Medicina dos Estados Unidos (2000) considera que a ingestão diária de Se em humanos adultos deve ser ao redor de 55 µg. A estimativa de ingestão diária de Se em alguns países é: Egito 29 µg, Bélgica 30 µg, Turquia 32 µg, Suécia 38 µg, França e Alemanha 47 µg, Itália 49 µg (REILLY, 1996), e Inglaterra 32 µg (MAcPHERSON et al., 1997). Segundo Maihara et al. (2004) a ingestão diária de Se no Brasil varia de 28 a 37 µg. Com

base nestes relatos, a média entre países na ingestão diária de Se é próxima de 37 μg . Considerando como meta o consumo diário de 55 μg de Se, a deficiência média de Se na população seria ao redor de 18 μg . Baseado no Experimento 1, 540 mL dia^{-1} de leite selenizado organicamente seriam suficientes para suprir a deficiência populacional, e 250 mL a supriria no Experimento 2.

Em estudos clínicos, dosagens diárias de formas suplementares de Se com efeito positivo comprovado sobre a saúde humana variaram de 50 a 200 μg (BLOT et al., 1993; CLARK et al., 1996; DELMAS-BEAUVIEUX et al., 1996). Para ingestões diárias de 200 μg de Se suplementar, consumos diários de leite ao redor de 6,0 e 2,8 L seriam necessários com base nos Experimentos 1 e 2, respectivamente, de obtenção pouco plausível em populações. Estudos clínicos de suplementação com Se raramente consideram a eficiência das fontes em suprir Se metabólico. Tem sido demonstrado que formas orgânicas de Se aumentam mais rapidamente a concentração de Se no sangue de humanos que Se inorgânico (NEVE, 1995). Quando selenato ou selenito suplementaram dietas de baixo Se com 32 μg de Se por dia, a absorção de Se foi 69 e 15% e a retenção 40 e 13%, respectivamente (FINLEY, 1999). A absorção de Se da dieta na forma de SeMet foi 95% (THOMSON; BURTON; ROBINSON, 1978), de selenato 90% e de selenito 60% (THOMSON; ROBINSON, 1986). A biodisponibilidade de sais de Se em humanos dificilmente excede 20%, enquanto a do Se em alimentos é geralmente maior que 60% (GMOSHINSKII; MAZO, 2006). A biodisponibilidade para humanos do Se em produtos lácteos precisa ser melhor definida, apesar de ser teoricamente alta, já que boa parte do Se se encontra como SeMet nestes alimentos. O consumo de dosagens clinicamente efetivas de Se suplementar oriundo de produtos lácteos selenizados pode ser plausível, caso a biodisponibilidade do Se no leite seja maior que a do Se em outros suplementos orgânicos e inorgânicos.

A maior eficiência de fontes orgânicas de Se em aumentar a concentração de Se no leite, comparativamente a suplementos inorgânicos, poderia resultar em menor proporção do Se absorvido disponível para suprir a exigência nutricional de Se do animal. Neste caso, poderia ocorrer deficiência na função de selenoproteínas, como a GSH-Px (ROTRUCK et al., 1973) e a iodotironina deiodinase Tipo I (BERRY; BANU; LARSEN, 1991). Entretanto, a maior excreção de Se no leite no Selemax não foi associada a menor teor de Se no plasma (Tabela 3) e nem a queda na atividade da GSH-Px. A atividade da GSH-Px foi maior no Selenito 43 dias após o início da suplementação, mas foi maior no Selemax aos 106 dias (Figura 4). Podoll et al. (1992) observaram oscilação na atividade da GSH-Px no soro sanguíneo ao longo dos 49 dias de suplementação de vacas leiteiras com 0,3 ppm da dieta de Se oriundo de selenito ou selenato de sódio. Os animais foram alimentados com dieta basal contendo 0,076 ppm de Se por duas semanas antes do início do experimento. A atividade da GSH-Px não foi afetada pela fonte de Se, mas foi determinada pelo momento de amostragem do soro.

A diferença na resposta em atividade da GSH-Px ao longo do período de suplementação (Figura 4) pode se explicar pela diferença no metabolismo das formas orgânica e inorgânica de Se. O Se em selenito absorvido no intestino é transformado via selenoglutationa em selenido, que é incorporado em selenoproteínas funcionais, como a glutatona, na forma de SeCis (ALLAN; LACOURCIERE; STADTMAN, 1999). A SeCis, também sintetizada pelas bactérias ruminais a partir de fontes inorgânicas de Se, pode ser rapidamente incorporada em proteínas no lugar de Cis, ou ficar disponível para a síntese de selenoproteínas funcionais através da ação de enzimas como SeCis β -liase. Bois de corte suplementados com levedura selenizada, quando comparado a selenito de sódio, tiveram maior acúmulo de Se nos tecidos como SeMet que como SeCis (JUNIPER et al., 2008). A indução experimental de deficiência

nutricional de Se nas vacas pode ter direcionado o Se oriundo do Selemax, maior parte na forma de SeMet, inicialmente para incorporação em outros tecidos como os músculos, e só depois de recuperar o *pool* de Se no organismo este foi incorporado à GSH-Px. O Se oriundo de selenito na forma de SeCis, a forma bioativa de Se que é incorporada às selenoenzimas como a glutathione, pode explicar maior atividade da GSH-Px para Selenito no dia 43.

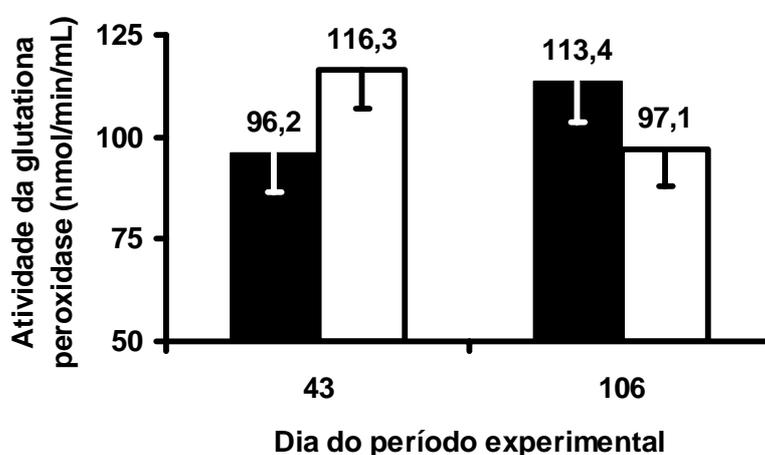


Figura 4 Atividade da glutathione peroxidase no plasma de vacas leiteiras suplementadas com levedura selenizada (■, Selemax) ou selenito de sódio (□, Selenito). Valor no final da padronização foi 84,9 para Selemax e 76,7 para selenito de sódio. $P=0,86$ para o efeito de tratamento, $P=0,91$ para o efeito de dia e $P=0,05$ para a interação entre tratamento e dia. Experimento 1

Nos tratamentos Selemax e Selenito a proporção da excreção total de Se que ocorreu pelas fezes foi 59,7 e 57,3%, pela urina 34,0 e 41,9%, e pelo leite 6,3 e 1,0%, respectivamente (Tabela 4), sugerindo que o Se orgânico foi mais excretado pelo leite em detrimento da excreção urinária. Entretanto, a baixa proporção do Se ingerido excretado pelo leite, é uma explicação plausível para a

ausência de efeito detectável da fonte de Se suplementar sobre o balanço de Se, mesmo com efeito acentuado da fonte sobre a excreção láctea do mineral. Juniper et al. (2006) também não observaram diferença na concentração de Se nas fezes e na urina de vacas leiteiras quando selenito foi substituído por levedura selenizada. A baixa retenção do Se ingerido e a alta importância relativa da excreção de Se via fezes e urina, justificam a preocupação quanto à adequação nutricional do Se em dietas de vacas leiteiras a questões ambientais relacionadas à qualidade da água (DAVIS; MAIER; KNIGHT, 1988).

Os valores de digestibilidade aparente do Se, entre 40 e 55% do ingerido, são coerentes (Tabela 4). O NRC (2001) de gado leiteiro considera com base em quatro publicações de 1984 a 1997 que a digestibilidade aparente do Se em forragens e concentrados varia de 30 a 60% em ovinos, caprinos e vacas não lactantes. Esta publicação assume que o Se em selenito de sódio e levedura selenizada tem digestibilidade aparente ao redor de 40 a 50%, similar numericamente aos valores observados neste trabalho. A atuação sobre a biodisponibilidade do Se dietético através da substituição de selenito por levedura selenizada não aumentou o potencial poluente do Se ingerido quando as dietas consumidas tinham cerca de 0,3 ppm de Se, sendo 0,2 ppm oriundo dos suplementos.

No Experimento 1, em que as vacas tinham CCS ao redor de 340.000 células mL⁻¹ no final da padronização, não foi observado efeito da suplementação com Se sobre a CCS do leite (Tabela 3). Entretanto, no Experimento 2, em que as vacas tinham CCS no final da padronização de 830.000 células mL⁻¹ no Selemax e 660.000 no Controle (Figura 5), houve tendência ($P=0,10$) da suplementação com Se orgânico de reduzir a CCS do leite para valores ao redor de 350.000 (Tabela 5). A CCS se manteve mais menos constante ao longo do período de comparação, mas sempre menor para levedura que selenito (Figura 5). O maior suprimento alimentar de Se na forma orgânica

pode ter reduzido a susceptibilidade da glândula mamária a infecções. O Se em selenoproteínas, como a GSH-Px, atua na proteção das membranas celulares contra a degradação oxidativa (SMITH et al., 1984), mantendo a integridade dos neutrófilos e melhorando a resposta do organismo a infecções intramamárias. A resposta favorável em CCS à suplementação com levedura selenizada, apesar de ter obtido baixo suporte estatístico, é coerente biologicamente à resposta observada a este tratamento em teores de Se no leite e no plasma e em atividade da GSH-Px aos 106 dias de suplementação.

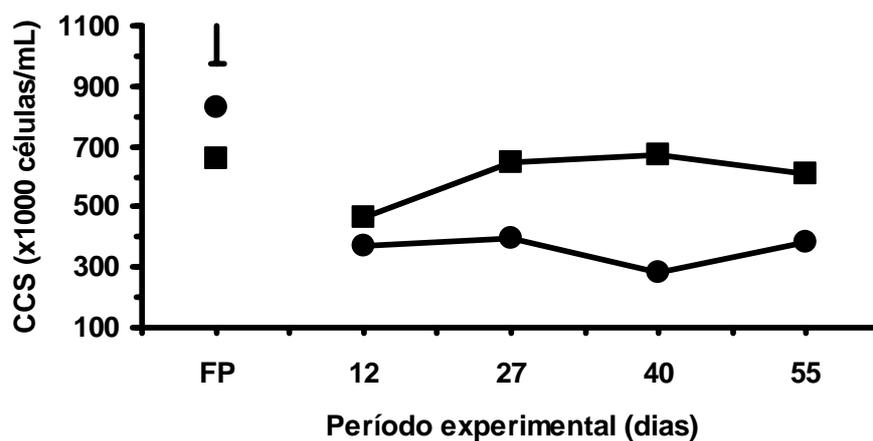


Figura 5 Contagem de células somáticas do leite de vacas suplementadas com levedura selenizada (●, Selemax) ou Controle (■). Valores ajustados para a medida da mesma variável no final da padronização (FP). Experimento 2

5 CONCLUSÃO

A substituição de selenito de sódio por levedura selenizada em dietas com teor de Se total na MS ao redor de 0,3 ppm aumentou a atividade da glutathione peroxidase no plasma aos 106 dias de suplementação e a incorporação de Se no leite, sem afetar o balanço de Se e a excreção nas fezes e na urina, demonstrando ser uma opção para a produção comercial de leite nutracêutico rico em Se orgânico.

REFERÊNCIAS

ALEIXO, P. C.; NÓBREGA, J. A. Direct determination of iron and selenium in bovine milk by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, Barking, v. 83, p. 457-462, 2003.

ALLAN, C. B.; LACOURCIERE, G. M.; STADTMAN, T. C. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 19, p. 1-16, 1999.

AMMERMAN, C. B.; GOODRICH, R. D. Advances in mineral nutrition in ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 57, n. 2, p. 519-533, 1983.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12th ed. Washington, 1975. v. 1, 1094 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, 1990. v. 1, 1117 p.

ATROSHI, F. et al. Possible roles of vitamin E and glutathione metabolism in bovine mastitis. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, Bern, v. 57, p. 37-43, 1986.

AWADEH, F. T. et al. Effect of selenium supplements on the distribution of selenium among serum proteins in cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 4, p. 1089-1094, 1998.

BAUM, M. K. et al. High risk of HIV-related mortality is associated with selenium deficiency. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, New York, v. 15, n. 5, p. 370-374, 1997.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat. Low-Fat Milk Syndrome, **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 480, p. 209-216, 2000.

BEILSTEIN, M. A.; WHANGER, P. D. Deposition of dietary organic and inorganic selenium in rat erythrocyte proteins. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 116, p. 1701- 1710, 1986.

BEHNE, D.; KYRIAKOPOULOS, A. Mammalian selenium-containing proteins. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 21, p. 453-473, 2001.

BERRY, M. J.; BANU, L.; LARSEN, P. R. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocystein-containing enzyme. **Nature**, London, v. 349, p. 438-440, 1991.

BLOT, W. J. et al. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v. 1985, p. 1483-1492, 1993.

BUCKLEY, W. T. **Farm animal metabolism and nutrition**. London: CABI, 2000. p. 161-182.

BURK, R. F.; HILL, K. E.; MOTLEY, A. K. Plasma selenium in specific and non-specific forms. **Biofactors**, Oxford, n. 14, p. 107-114, 2001.

BUTLER, J. A. et al. Selenium distribution in blood fractions of New Zealand women taking organic or inorganic selenium. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 53, p. 748-754, 1991.

CAO, Y. Z. et al. Selenium deficiency alters the lipoxygenase pathway and mitogenic response in bovine lymphocytes. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, n. 122, p. 2121-2127, 1992.

CEBALLOS, A. et al. Meta-analysis of the effect of oral selenium supplementation on milk selenium concentration in cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 1, p. 324-342, 2009.

CEBALLOS-MARQUEZ, A. et al. Milk selenium concentration and its association with udder health in Atlantic Canadian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 10, p. 4700-4709, 2010.

CEBRA, C. K. et al. The relationship between endogenous cortisol, blood micronutrients, and neutrophil function in postparturient Holstein cows. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 17, p. 902-907, 2003.

CLARK, L. C. et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 276, p. 1957-1963, 1996.

COMBS JÚNIOR, G. F. Selenium in global food systems. **British Journal of Nutrition**, London, v. 85, p. 517-547, 2001.

CONI, E. et al. Analytical approach to obtaining reference values for minor and trace elements in human-milk. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 5, p. 581-586, 1990.

CONRAD, H. R.; MOXON, A. L. Transfer of dietary selenium to milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 62, n. 3, p. 404-411, 1979.

CORTESE, V. Selenium and reproductive performance in dairy cattle. **Agri-Practice**, Santa Barbara, v. 9, p. 5-7, 1988.

CRAVEN, N.; WILLIAMS, M. R. Defenses of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancements. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 71-127, 1985.

DANIELS, L. A. Selenium metabolism and bioavailability. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 54, p. 185-199, 1996.

DAVIS, E. A.; MAIER, K. J.; KNIGHT, A. W. The biological consequences of selenium in aquatic ecosystems. **California Agriculture**, Berkeley, v. 42, n. 1, p. 18-20, 1988.

DELMAS-BEAUVIEUX, M. C. et al. The enzymatic antioxidant system in blood and glutathione status in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients: effects of supplementation with selenium or beta-carotene. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 64, p. 101-107, 1996.

DONG, Y. et al. Characterization of the biological activity of γ -glutamyl-Se-methylselenocysteine: a novel, naturally occurring anticancer agent from garlic. **Cancer Research**, Baltimore, v. 61, p. 2923-2928, 2001.

DWORKIN, B. M. et al. Abnormalities of blood selenium and glutathione peroxidase activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome and AIDS-related complex. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 15, p. 167-177, 1988.

ECKER, D. J. et al. Yeast metallothionein function in metal ion detoxification. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 261, n. 36, p. 16895-16900, 1986.

EDENS, F. W.; GOWDY, K. M. Selenium sources and selenoproteins in practical poultry production. In: ANNUAL SYMPOSIUM BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 19., 2004, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University, 2004. p. 35-55.

ERSKINE, R. J. et al. Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in dairy herds with high and low somatic cell counts. **Journal American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 190, n. 11, p. 1417-1421, 1987.

ERSKINE, R. J. et al. Induction of *Escherichia coli* mastitis in cows fed selenium deficient or selenium-supplemented diets. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v. 50, p. 2093-2100, 1989.

FINLEY, J. W. Does selenium accumulation in meat confer a health benefit to the consumer? **Proceedings of the American Society of Animal Science**, Indianapolis, p. 1-10, 1999.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **Statistical database**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/default.jsp>>. Acesso: em 21 mar. 2011.

GANTHER, H. E. Metabolism of hydrogen selenide and methylated selenides. In: DRAPER, H. H. (Ed.). **Advances in Nutritional Research**. New York: Plenum, 1979. v. 2, p. 107-128.

GERLOFF, B. J. Effect of selenium supplementation on dairy cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, p. 3934-3940, 1992.

GMOSHINSKII, I. V.; MAZO, V. K. Mineral substance in human nutrition. selenium: absorption and bioavailability. **Voprosy Pitaniia**, Moscou, v. 75, n. 5, p. 15-21, 2006.

GRACE, N. D.; KNOWLES, S. O.; LEE, J. Relationships between blood Se concentrations and milk somatic cell counts in dairy cows. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 45, p. 171-172, 1997.

HAHN, M. H. et al. Determination of trace amounts of selenium in corn, lettuce, potatoes, soybeans, and wheat by hydride generation/condensation and flame atomic absorption spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 29, p. 792-796, 1981.

HARRISON, J.; CONRAD, H. R. Effect of selenium intake on selenium utilization by the nonlactating dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, p. 219-223, 1984.

HEARD, J. W. et al. Increasing selenium concentration in milk: effects of amount of selenium from yeast and cereal grain supplements. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 9, p. 4117-4127, 2007.

HENRY, P. R. et al. Estimation of the relative biological availability of inorganic selenium sources for ruminants using tissue uptake of selenium. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 66, p. 2306-2312, 1988.

HOGAN, J. S. et al. Relationships among vitamin E, selenium, and bovine blood neutrophils. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 9, p. 2372-2378, 1990.

HOGAN, J. S.; WEISS, W. P.; SMITH, K. L. Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 9, p. 2795-2803, 1993.

HOUSE, W. A.; WELCH, R. M. Bioavailability of and interactions between zinc and selenium in rat fed wheat grain intrinsically labeled with ^{65}Zn and ^{75}Se . **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 119, p. 916-921, 1989.

ILIAN, M. A.; WHANGER, P. D. In vitro metabolism of ^{75}Se -selenite and ^{75}Se -selenomethionine in chick blood. **Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease**, Berlin, v. 3, p. 9-16, 1989.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids**. Washington: National Academy, 2000.

IVANCIC JÚNIOR, J.; WEISS, W. P. Effect of dietary sulfur and selenium concentrations on selenium balance of lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 1, p. 225-232, 2001.

JASKOWSKI, J. M. Influence of selenium administered at various times before parturition on the course of the puerperium and fertility of cows. **Medycyna Weterynaryjna**, Lublin, v. 46, p. 247-250, 1990.

JASKOWSKI, J. M.; ROGOZIEWICZ, M. Influence of selenium administered post partum on ovarian disorders, conception rate and fertility in cows. **Medycyna Weterynaryjna**, Lublin, v. 46, p. 50-53, 1990.

- JUKOLA, E. et al. Blood selenium, vitamin E, vitamin A, and β -carotene concentrations and udder health, fertility treatments, and fertility. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, p. 838-845, 1996.
- JULIEN, W. E. et al. Selenium and vitamin E and incidence of retained placenta in parturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 59, n. 11, p. 1954-1959, 1976.
- JUNIPER, D. T. et al. Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 3100-3109, 2008.
- JUNIPER, D. T. et al. Selenium supplementation of lactating dairy cows: effect on selenium concentration in blood, milk, urine, and feces. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 9, p. 3544-3551, 2006.
- KNOWLES, S. O. et al. Significance of amount and form of dietary selenium on blood, milk, and casein selenium concentration in grazing cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 2, p. 429-437, 1999.
- KOENIG, K. M.; BUCKLEY, W. T. SHELFORD, J. A. Measurement of endogenous fecal excretion and true absorption of selenium in dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 71, p. 167-174, 1991a.
- KOENIG, K. M.; BUCKLEY, W. T. SHELFORD, J. A. True absorption of selenium in dairy cows: Stable isotope tracer methodology and affect of dietary copper. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 71, p. 175-183, 1991b.
- KOENIG, K. M. et al. Effects of diet and chemical form of selenium on selenium metabolism in sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, p. 817-827, 1997.
- KRUZE, J. et al. Somatic cell count in milk of selenium-supplemented dairy cows alter an intramammary challenge with *Staphylococcus aureus*. **Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine**, Berlin, v. 54, n. 9, p. 478-483, 2007.
- LEAN, L. J. et al. An investigation of bulk tank milk selenium levels in the San Joaquin Valley of California. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 80, p. 41-51, 1990.

LI, J. Y. et al. Nutrition intervention trials in Lixian, China: multiple vitamin/mineral supplementation, cancer incidence, and disease-specific mortality among adults with esophageal dysplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, n. 85, p. 1492-1498, 1993.

LITTELL, R. C. et al. **SAS[®] system for mixed models**. Cary: SAS Institute Inc, 1996. 633 p.

LOPEZ, P. L.; PRESTON, R. L.; PFANDER, W. H. Whole-body retention, tissue distribution and excretion of selenium-75 after oral and intravenous administration in lambs fed varying selenium intakes. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 97, p. 123-132, 1969.

LUCCI, C. S.; MOXON, A. L.; ZANETTI, M. A. Selênio em bovinos leiteiros do estado de São Paulo. I. Níveis de Se em soros sanguíneos. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 20, p. 65-70, 1983.

LYONS, G.; STANGOULIS, J.; GRAHAM, R. High-selenium wheat: biofortification for better health. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 16, p. 45-60, 2003.

MACPHERSON, A. et al. Loss of Canadian wheat imports lowers selenium intake and status of the Scottish population: trace elements in man and animals. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRACE ELEMENTS IN MAN AND ANIMALS, 9., 1997, Ottawa, 1997. **Proceedings...** Ottawa: NRC Research, 1997. p. 203-205.

MAHAN, D. C.; CLINE, T. R.; RICHERT, B. Effects of dietary levels of selenium-enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, carcass characteristics, and loin quality. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, p. 2172-2179, 1999.

MAIHARA, V. A. et al. Daily dietary selenium intake of selected Brazilian population groups. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Suíça, v. 259, n. 3, p. 465-468, 2004.

MAUS, R. W. et al. Relationship of dietary selenium to selenium in plasma and milk from dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, n. 4, p. 532-537, 1980.

MILLER, J. K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F. C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 2812-2823, 1993.

MORAES, M. F. et al. Evidences of selenium deficiency in Brazil: from soil to human nutrition. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON SELENIUM IN THE ENVIRONMENT AND HUMAN HEALTH, 1., 2009, Suzhou. **Selenium: deficiency, toxicity and biofortification for human health**. Suzhou: University of Science and Technology of China, 2009. p. 73-74.

MULLER, F. et al. Virological and immunological effects of antioxidant treatment in patients with HIV infection. **European Journal of Clinical Investigation**, Berlin, v. 30, p. 905-914, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 6th ed. Washington: National Academy Press, 1989. 158 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington: National Academy of Sciences, 2001. 381 p.

NEVE, J. Human selenium supplementation as assessed by changes in blood selenium concentration and glutathione peroxidase activity. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Stuttgart, v. 9, n. 2, p. 65-73, 1995.

OLSON, O. E.; PALMER, I. S.; CARY, E. E. Modification of official fluorimetric method for selenium in plants. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v. 58, n. 1, p. 117-121, 1975.

ORTMAN, K.; PEHRSON, B. Effect of selenate as a feed supplement of dairy cows in comparison to selenite and selenium yeast. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, p. 3365-3370, 1999.

PASCHOAL, J. J.; ZANETTI, M. A.; CUNHA J. A. Suplementação de Se e vitamina E sobre a contagem de células somáticas no leite de vacas da raça holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 6, p. 2032-2039, 2003. (Supl. 2).

PAYNE, R. L.; LAVERGNE, T. K.; SOUTHERN, L. L. Effect of inorganic versus organic selenium on hen product and egg selenium concentration. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, p. 232-237, 2005.

PEHRSON, B. et al. The influence of dietary selenium as selenium yeast or sodium selenite on the concentration of selenium in the milk of Suckler cows and on the selenium status of their calves. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, p. 3371-3376, 1999.

PETER, D. W. et al. Excretion of selenium, zinc, and copper by sheep receiving continuous intraruminal infusions of selenite or selenomethionine. **Proceedings of Nutrition Society of Australia**, Victoria, v. 7, p. 178-181, 1982.

PODOLL, K. L. et al. Dietary selenate versus selenite for cattle, sheep, and horses. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, p. 1965-1970, 1992.

POPE, A. L. et al. The effect of (dietary) sulphur on ⁷⁵Se (selenium isotope) absorption and retention in sheep. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 190, p. 1448-1455, 1979.

REILLY, C. Selenium: a new entrant into the functional food arena. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 9, p. 114-118, 1998.

REILLY, C. **Selenium in food and health**. London: Blackie Academic and Professional, 1996.

RICE, D. A.; KENNEDY, S. Vitamin E, selenium, and polyunsaturated fatty acid concentrations and glutathione peroxidase activity in tissues from pigs with dietetic microangiopathy (mulberry heart disease). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 50, p. 2101-2104, 1989.

ROPSTAD, E.; OVERNES, G.; REFSDAL, A. Selenium levels in Norwegian dairy herds related to reproductive and health performance. **Acta Agriculturae Scandinavica**, London, v. 37, p. 397-405, 1987.

ROTRUCK, J. T. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, Washington, v. 179, p. 588-590, 1973.

ROWNTREE, J. E. et al. Effect of selenium on selenoprotein activity and thyroid hormone metabolism in beef and dairy cows and calves. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 2995-3005, 2004.

SALONEN, J. T. et al. Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched pair longitudinal study. **Lancet**, London, v. 2, p. 175-179, 1982.

SCHRAUZER, G. N. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, p. 1653-1656, 2000.

SCHRAUZER, G. N. Nutritional selenium supplements: product types, quality, and safety. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 20, n. 1, p. 1-4, 2001.

SCHRAUZER, G. N. The nutritional significance, metabolism and toxicology of selenomethionine. **Advances in Food and Nutrition Research**, New York, v. 47, p. 73-112, 2003.

SCHUKKEN, Y. H. et al. *Staphylococcus aureus*: incidence, prevalence and risk factors for intramammary infection. **Proceedings National Mastitis Council Annual**, Madison, p. 19, 1993.

SHIMOISHI, Y. The gas-chromatographic determination of selenium (VI) and total selenium in milk, milk products and albumin with 1,2-diamino-4-nitrobenzene. **The Analyst**, Cambridge, v. 101, p. 298-305, 1976.

SMITH, K. L. et al. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 6, p.1293-1300, 1984.

SMITH, K. L. et al. Incidence of environmental mastitis as influenced by vitamin E and selenium. **Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber**, v. 37, p. 482, 1985.

SMITH, K. L.; HOGAN, J. S.; WEISS, W. P. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, p. 1659-1665, 1997.

SPEARS, J. W. Trace mineral bioavailability in ruminants. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, n. 5, p. 1506-1509, 2003. Suppl.

STOCKDALE, C. R. et al. Selenium levels in cows fed pasture and concentrates or a total mixed ration and supplemented with selenized yeast to produce milk with supra-nutritional selenium concentrations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 1, p.262-272, 2011.

STOWE, H. D. et al. Responses of dairy cattle to long-term and short-term supplementation with oral selenium and vitamin E. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, p. 1830-1839, 1988.

STOWE, H. D.; HERDT, T. H. Clinical assessment of selenium status of livestock. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, p. 3928-3933, 1992.

STÜRUP, S.; BÜCHERT, A. Direct determination of copper and iodine in milk and milk powder in alkaline solution by flow injection inductively coupled plasma mass spectrometry. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 354, p. 323-326, 1996.

SURAI, P. F. **Selenium in nutrition and health**. In: SELENIUM in ruminant nutrition. Nottingham: Nottingham University, 2006b. 974 p.

SURAI, P. F. **Selenium in nutrition and health**. Nottingham: Nottingham University, 2006a. 974 p.

SUZUKI, K. T.; OGRA, Y. Metabolic pathway for selenium in the body: speciation by HPLC-ICP MS with enriched Se. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, p. 974-983, 2002.

THOMSON, C. D. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. **European Journal of clinical Nutrition**, London, v. 58, p. 391-402, 2004.

THOMSON, C. D.; BURTON, C. E.; ROBINSON, M. F. On supplementing the selenium intake of New Zealanders. Short experiments with large doses of selenite or selenomethionine. **British Journal of Nutrition**, London, v. 39, p. 579-587, 1978.

THOMSON, C. D.; ROBINSON, M. F. Urinary and fecal excretions and absorption of large supplement of selenium: superiority of selenate over selenite. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 44, p. 659-663, 1986.

TINGGI, U.; PATTERSON, C.; REILLY, C. Selenium levels in cow's milk from different regions of Australia. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Basingstoke, v. 52, p. 43-51, 2001.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of livestock**. 3rd ed. Great Britain: CAB International, 1999. 614 p.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN DAEL, P. et al. Selenium content of cow's milk and its distribution in protein fractions. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, Colney, v. 192, p. 422-426, 1991.

VAN RYSSSEN, J. B. J. et al. Comparative metabolism of organic and inorganic selenium by sheep. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 37, p. 1358-1363, 1989.

VITOLO, M.; MINAMI, P. S.; CURY, A. E. **Leveduras em biotecnologia**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1987. 98 p.

WALKER, G. P. et al. Output of selenium in milk, urine, and feces is proportional to selenium intake in dairy cows fed a total mixed ration supplemented with selenium yeast. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 10, p. 4644-4650, 2010.

WEISS, W. P. et al. Relationships among selenium, vitamin E, and mammary gland health in commercial dairy herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, p.381-390, 1990.

WEISS, W. P.; HOGAN, J. S. Effect of selenium source on selenium status, neutrophil function and response to intramammary endotoxin challenge of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 4366-4374, 2005.

WEISS, W. P. Selenium nutrition of dairy cows: comparing responses to organic and inorganic selenium forms. In: ANNUAL SYMPOSIUM, 19., 2003, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: University, 2003. p. 333-343.

WOLFFRAM, S. Absorption and metabolism of selenium: differences between inorganic and organic sources. In: ALLTECH ANNUAL SYMPOSIUM BIOTECHNOLOGY FEED FOOD INDUSTRY. 15., 1999, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University, 1999. p. 547-566.