

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
**PRODUÇÃO, QUALIDADE E SAÚDE  
DE OVELHAS LEITEIRAS  
SUPLEMENTADAS COM  
DISELELENETO DE DIFENILA**

**ANGELISA HAHN BIAZUS**

CHAPECÓ, 2017

# **PRODUÇÃO, QUALIDADE E SAÚDE DE OVELHAS LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM DISSELENETO DE DIFENILA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Ciência e Produção Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**.

**Orientador: Aleksandro Schafer da Silva**  
Co-orientador: Ana Luiza Bachmann Schogor

Chapéco, SC, Brasil

2017

Universidade do Estado de Santa Catarina  
Centro de Educação Superior do Oeste - UDESC Oeste  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**PRODUÇÃO, QUALIDADE E SAÚDE DE OVELHAS LEITEIRAS  
SUPLEMENTADAS COM DISSELENETO DE DIFENILA**

Elaborada por  
**Angelisa Hahn Biazus**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Zootecnia**

Comissão Examinadora:

Dr. Aleksandro Schafer da Silva - Orientador (UDESC-Oeste)

Dr. Julcemar Dias Kessler (UDESC-Oeste)

Dr. Ricardo Evandro Mendes (IFC-Concórdia)

Chapecó, 17 de março de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus, por me amar e me permitir tantas coisas sem mesmo eu merecer.

À minha linda filha Helena, por ser a razão de eu ter sonhos.

À mãe incrível que Deus me deu, dona Ines, por que são por ela e pra ela as minhas vitórias.

Aos meus amigos, meu refúgio nos momentos de angústia e com quem divido tantas alegrias.

Ao meu orientador, Dr. Aleksandro, pela confiança, incentivo e paciência.

Aos meus colegas do LPPA, por todas as coletas, risadas, apoio e cafés.

À UDESC, por ser minha segunda casa por tanto tempo.

À FAPESC, pela bolsa de estudos.

## **RESUMO**

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

Universidade do Estado de Santa Catarina

# **PRODUÇÃO, QUALIDADE E SAÚDE DE OVELHAS LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM DISSELENETO DE DIFENILA**

AUTOR: Angelisa Hahn Biazus

ORIENTADOR: Aleksandro Schafer da Silva

Chapecó, 17 de março de 2017

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da suplementação injetável com disseleneto de difenila ( $(\text{PhSe})_2$ ) na produção e composição de leite em ovelhas leiteiras, assim como investigar se a dose usada foi capaz de promover ativação do sistema antioxidante e anti-inflamatório, sem afetar a saúde dos animais e sem causar impactos negativos ao ambiente através de excretas. Foram selecionadas 16 fêmeas ovinas primíparas. Esses animais foram divididos em dois grupos (A e B) com oito animais cada, sendo os animais do grupo A usados como controle (sem suplementação) e os animais do grupo B que receberam  $(\text{PhSe})_2$  por via subcutânea na dose de 3,0  $\mu\text{mol/kg}$  nos dias 1, 7, 14, 30 e 45 do experimento. A produção de leite foi medida em intervalos de sete dias, já a composição centesimal, os níveis de antioxidantes totais (FRAP) e níveis de oxidação proteica (AOPP) no leite foram avaliados em intervalos de 15 dias. Também em intervalos de 15 dias foram coletadas amostras de sangue para avaliar níveis oxidantes, através variáveis EROs (especies reativas ao oxigênio) e TBARS (peroxidação lipídica), avaliou-se a atividade de enzimas antioxidantes como a SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase), GST (glutationa S-transferase) e GPx (glutationa peroxidase). E na amostras de soro foram analisadas a atividade da ALT e os níveis de triglicerídeos, proteína sérica total, colesterol, albumina, ureia, globulina e interleucina-10 (IL-10). Amostras de fezes para avaliação da infecção parasitária e para testes de ecotoxicologia foram coletadas. Como resultados desse estudo, destacamos que não houve diferença significativa na produção de leite, no entanto, a suplementação com  $(\text{PhSe})_2$  causou um aumento nos níveis de gordura e redução nos níveis de lactose e proteína em alguns momentos do experimento nas ovelhas. As suplementadas também tiveram um aumento nos níveis de extrato seco total e minerais. No leite foi observado níveis maiores de oxidação proteica (AOPP) associada a menores níveis de antioxidantes totais (FRAP) nos animais do grupo controle comparado ao grupo suplementado com  $(\text{PhSe})_2$ . Verificou-se redução significativa nos níveis séricos de TBARS nos animais do Grupo B e elevação na atividade das enzimas GTS, GPx, SOD e CAT. Também foi observado um aumento de IL-10 nas ovelhas suplementadas com  $(\text{PhSe})_2$ . Não foi verificada alteração nos parâmetros bioquímicos usados para avaliar a saúde dos animais pós-tratamento, assim como a suplementação com  $(\text{PhSe})_2$  não reduziu contagem de ovos de helmintos nas fezes dos animais. Nos testes ecotoxicológicos com colembolos, verificou-se que as fezes das ovelhas suplementadas com  $(\text{PhSe})_2$  podem ser usadas na adubação orgânica, sem causar impacto negativo a fauna do solo. Portanto, com base nos resultados é possível concluir que o protocolo de suplementação subcutânea com  $(\text{PhSe})_2$  nas ovelhas leiteiras foi capaz de ativar o sistema antioxidante e anti-inflamatório, assim como alterar a composição do leite das ovelhas. Além disso, a suplementação aumentou os níveis de antioxidantes e reduziu consequentemente os níveis de oxidantes no leite, o que pode refletir em um aumento no tempo de prateleira desse produto.

**Palavras-chave:** Antioxidantes, borregas, resposta imunológica.

## **ABSTRACT**

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade do Estado de Santa Catarina

## **PRODUCTION, QUALITY AND HEALTH OF DAIRY SHEEP SUPPLEMENTED WITH DIPHENYL DISSELENE**

AUTHOR: Angelisa Hahn Biazus

ADVISOR: Aleksandro Schafer da Silva

Chapecó, march 17 2017

The aim of this study was to evaluate the effects of injectable supplementation of diphenyl diselenide ( $(\text{PhSe})_2$ ) on milk production and composition in dairy sheep, as well to investigate whether the dose used was able to promote the activation of the antioxidant and anti-inflammatory system, without affecting the health of animals and without causing negative impacts to the environment through excreta. In the experiment, 16 primiparous ovine females were selected. These animals were divided into two groups (A and B) with eight animals each. The animals of group A being used as control (without supplementation) and the animals of group B being supplemented with dose of 3,0  $\mu\text{mol} / \text{kg}$  at subcutaneous, of  $(\text{PhSe})_2$ , on days 1, 7, 14, 30 and 45 of the experiment. Milk production was evaluated at 7-day intervals, while the centesimal composition, total antioxidant levels (FRAP) and protein oxidation levels (AOPP) in the milk were evaluated at 15-day intervals. Also at 15-day intervals, blood samples were collected to evaluate oxidant levels through variables such as EROs and TBARS (lipid peroxidation), as well as the activity of antioxidant enzymes, such as SOD (superoxide dismutase), CAT (catalase), GST (glutathione S-transferase) and GPx (glutathione peroxidase).

Serum samples were analyzed for ALT activity and levels of triglycerides, total serum protein, cholesterol, albumin, urea, globulin and interleukin-10 (IL-10). Stool samples for parasite infection evaluation and for ecotoxicology tests were also collected during the experiment. As a result of this study, we emphasize that there was no significant difference in milk production, however, supplementation with  $(\text{PhSe})_2$  caused an increase in fat levels and reduction in lactose and protein levels at some moments of the experiment in the sheep. The supplemented ones also had an increase in the levels of total dry extract and minerals. In the milk, higher levels of protein oxidation (AOPP) associated with lower levels of total antioxidants (FRAP) were observed in the control group compared to the group supplemented with  $(\text{PhSe})_2$ . There was a significant reduction in the serum levels of TBARS in the animals of Group B and elevation in the activity of the GTS, GPx, SOD and CAT enzymes. An increase of IL-10 in sheep supplemented with  $(\text{PhSe})_2$  was also observed. No change was observed in the biochemical parameters used to evaluate post-treatment animal health, as well as supplementation with  $(\text{PhSe})_2$  did not reduce counts of helminth eggs in the feces of the animals. In ecotoxicological tests with coleopters, it was verified that sheep feces supplemented with  $(\text{PhSe})_2$  can be used in organic fertilization negatively impacts the fauna of the soil. Therefore, based on the results, it is possible to conclude that the protocol of subcutaneous supplementation with  $(\text{PhSe})_2$  in dairy sheep was able to activate the antioxidant and anti-inflammatory system, as well as to alter the milk composition of the sheep. In addition, supplementation increased levels of antioxidants and consequently reduced levels of oxidants in milk, which may reflect an increase in the shelf life of this product.

**Keywords:** Antioxidants, immune response, lambs.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>8</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>8</b>
1. PANORAMA DA OVINOCULTURA DE LEITE .....	8
2. DESAFIOS SANITÁRIOS E NUTRICIONAIS .....	9
3. SUPLEMENTAÇÃO MINERAL .....	12
4. DISSELENETO DE DIFENILA.....	15
5. RESÍDUOS E IMPACTOS AMBIENTAIS .....	16
6. OBJETIVOS .....	18
6.1 OBJETIVO GERAL .....	18
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>19</b>
<b>INJECTABLE SUPPLEMENTATION OF DIPHENYL DISELENIDE IN DAIRY SHEEP: BENEFITS ON ANIMAL HEALTH AND MILK PRODUCTION AND COMPOSITION</b>	<b>20</b>
ABSTRACT .....	20
INTRODUCTION .....	21
MATERIALS AND METHODS .....	22
RESULTS .....	25
DISCUSSION.....	27
REFERENCES .....	29
<b>INJECTABLE DIPHENYL DISELENIDE SUPPLEMENTATION IN DAIRY SHEEP... </b>	<b>41</b>
ABSTRACT .....	41
RESUMEN .....	42
INTRODUCTION.....	43
MATERIALS AND METHODS .....	44
RESULTS .....	46
DISCUSSION.....	47
REFERENCES .....	48
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>
<b>CARTA DE APROVAÇÃO DO CETEA.....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>

## CAPÍTULO I

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 1. PANORAMA DA OVINOCULTURA DE LEITE

A produção de leite mundial, segundo dados da FAO (2015), gira em torno dos bovinos, sendo que o rebanho leiteiro ovino ocupa a 4<sup>a</sup> posição entre as espécies produtoras no mundo. Até 2013, a produção de leite era de 769 milhões de toneladas ao ano, e nesse total, apenas 1% era produzido por ovelhas (FAO, 2015). No Brasil, essa atividade iniciou em 1992 com a chegada dos primeiros ovinos de aptidão leiteira da raça Lacaune, originária da França, que se adaptaram muito bem às características de clima e pasto do sul do país. As fêmeas dessa raça chegam a produzir 4,5 litros de leite no seu pico de lactação, que ocorre cerca de 30 dias após o parto (LUQUET, 1991).

Diante de um mercado promissor, a criação ovina para diversos fins vem crescendo no Brasil, atingindo em 2014 um número próximo à 18 milhões de cabeças. O estado de Santa Catarina possui um pequeno percentual da produção nacional, isto é, 300 mil ovinos, sendo que destes, 1,7% destinados para a produção de leite. A maior concentração de animais, criados para diversos fins no estado localiza-se na região oeste, com pouco mais de 42% no total estadual (IBGE, 2010), o que pode ser em decorrência da ação de alguns produtores e incentivo de órgãos públicos.

O leite ovino é considerado o mais rico nutricionalmente entre os leites utilizados em laticínios (FURTADO, 2003; HAENLEIN e WENDORFF, 2006), apresentando elevados teores médios de proteína (5,62%), gordura (7,61%), sólidos totais (19,05%) e lactose (4,70%) (BENCINI e PURVES, 1990; NUDDA et al., 2002; HAELEIN, 2004; PARK et al., 2007; STUBBS et al., 2009) e possuindo particularidades como coloração branco-perolada característica relacionada à falta de carotenóides em sua gordura, opacidade marcante e maior viscosidade que o leite de outras espécies (ASSENAT, 1991). Tem maior resistência a proliferação microbiana devido à atividade imunológica presente e ao seu poder tampão (MARTINS, 2000). Essas propriedades tornam o leite adequado para a elaboração de queijos e iogurtes, que servem como alternativa para a substituição dos produtos oriundos do leite bovino (RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2005).

Vários fatores podem contribuir para a variação da composição e qualidade do leite das ovelhas, destacando-se o ambiente, a raça, idade, estágio de lactação, técnicas de ordenha e nível nutricional dos animais (PEETERS et al., 1992; BENCINI e PULINA, 1997). Além do aspecto nutricional, os problemas sanitários que podem acometer ovinos afetam a glândula mamária e assim contribuem tanto na quantidade como na qualidade do leite produzido (BENCINI e PULINA, 1997).

## 2. DESAFIOS SANITÁRIOS E NUTRICIONAIS

Ovelhas gestantes exigem maior atenção quanto às questões nutricionais, pois esta condição eleva as necessidades alimentares, especialmente durante as últimas seis semanas de gestação, fase esta em que o feto tem seu desenvolvimento acelerado e completa aproximadamente 70% do seu crescimento (PILAR; PÉREZ; SANTOS, 2002). Na mesma fase, ocorre aumento das necessidades maternas por nutrientes para que o úbere se desenvolva e a própria ovelha mantenha-se fisiologicamente saudável (EL-SHERIF e ASSAD, 2001; SAINZ, 2010). Durante o pré-parto, é comum que ocorram desequilíbrios metabólicos, que são definidos como um desbalanço entre a ingestão de alimentos e o uso dos nutrientes (ROYAL et al., 2000; BUTLER et al., 2003; DOBSON et al., 2007; NRC, 2007; MAAS e PEARSON, 2009)

Esse desequilíbrio de nutrientes que ocorre nas ultimas semanas de gestação, se estende por até três semanas após o parto, período esse chamado de transição (INGRAHAN e KAPPEL, 1988). Nesse momento, o consumo alimentar vai ser responsável pela elevação ou diminuição da produção láctea, do escore corporal do animal no puerpério, do aparecimento de enfermidades e consequentemente, do intervalo entre os partos (ROSSATO et al., 1999).

A fêmea ovina se encontra em pelo menos três situações referente à seu estado nutricional no período de lactação, isto é, (1) a primeira diz respeito ao pós-parto, onde ela apresenta balanço energético negativo, sendo que sua produção de leite é crescente, associado a baixo consumo de alimentos, que faz com que ocorra mobilização das reservas corporais (RODRIGUES, 2004); (2) a segunda se relaciona ao balanço energético igual a zero, ou seja, a produção de leite está reduzindo e a fêmea já atingiu o pico de consumo de matéria seca (LUCCI, 1993); (3) e a terceira, é o momento em que o balanço energético é positivo e onde as reservas corporais são

reestabelecidas (SANTOS et al., 1993). Cabe ressaltar que a produção leiteira é diretamente afetada pelo balanço energético negativo, isto é, além de afetar a produção de leite, causa decréscimo nos níveis de proteína e aumenta níveis de gordura do leite (WENDORFF, 2002).

Todos esses fenômenos ocorrem em todas as fêmeas, independente da idade, porém, as de primeira cria apresentam alguns processos exacerbados. As primíparas irão parir seu primeiro cordeiro e normalmente possuem menos de 1,5 anos de idade. Em geral, produzirão menos quantidade de leite que as fêmeas com mais de 2,5 anos por que estão em fase de crescimento, e isso vai influenciar diretamente no desenvolvimento do cordeiro (SILVA e ARAÚJO, 2000; RIBEIRO et al., 2004). A alimentação dessas borregas deve ser equilibrada durante toda a prenhez e seu desenvolvimento corporal deve ser observado. No terço final da gestação, a capacidade de ingestão dessas fêmeas não é máxima e o crescimento elevado do feto, que ocupa muito espaço, reduz ainda mais a capacidade de ingestão, enquanto aumenta a demanda por nutrientes. Além disso, essas fêmeas precisam atender às exigências da sua própria manutenção e desenvolvimento, afinal, ainda está em fase de crescimento (SUZIN et al., 2002). Acredita-se que as borregas, assim como as novilhas, apresentem mais propensão à distúrbios no pós-parto como distocia, metrite e toxemia (principalmente em caso de partos gemelares) (MEYER et al., 2001; UEMATSU et al., 2013; DUBUC et al., 2010) e que esses distúrbios estejam relacionados ao desenvolvimento incompleto desses animais na primeira prenhez, dependendo da sua idade.

De modo geral, ovinos apresentam maior quantidade de transtornos metabólicos no período pré-parto do que em qualquer outro período (CELI, 2010) e isso ocorre em decorrência do desenvolvimento fetal acelerado e do início da produção de leite conforme já mencionado (OLIVEIRA et al., 2008). Um exemplo comum de patologia observada durante esse período é a toxemia da prenhez (BROZOS et al., 2011), considerada fatal quando não há um diagnóstico apurado ou tratamento adequado (MAVROGIANNI e BROZOS, 2008). O desenvolvimento dessa doença coincide com a tentativa malsucedida da ovelha em atender a demanda do feto em crescimento (HARMEYER e SCHLUMBOHM, 2006). Esse transtorno está associado muitas vezes a ovelhas obesas, nas quais há depósito de gordura visceral, causando, juntamente com o útero gravídico, compressão dos órgãos digestivos, sobretudo o rúmen, reduzindo assim a capacidade de ingestão (VAN SAUN, 2000). Ovelhas com toxemia podem dar origem a cordeiros normais, no entanto, há riscos de os cordeiros serem fracos (BROZOS et al., 2011).

A prenhez e o período pós-parto exigem das fêmeas uma adequada adaptação, torna-se necessário um intenso processo metabólico sendo que há modificação do metabolismo energético e maior consumo de oxigênio. Devido a esses fatores, essa fase é apontada também como período fisiológico favorável ao estresse oxidativo (GRUMMER, 1993; GOFF e HORST, 1997; DRACKLEY, 1999; BERNABUCCI et al., 2002). Este evento ocorre em decorrência do desequilíbrio entre as substâncias antioxidantes e os radicais livres, ou também chamados espécies reativas de oxigênio (ERO's). Dependendo da intensidade desse desequilíbrio, podem surgir danos moleculares às estruturas celulares com consequente prejuízo das funções vitais (DRÖGE, 2002; RIBEIRO e GONZÁLEZ, 2003; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; WEIGEL, 2008). Acredita-se que em ruminantes, o estresse oxidativo pode estar envolvido em diversas condições patológicas relacionadas à reprodução, desempenho e bem-estar animal (MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA; MADSEN, 1993; BEATTY et al., 2006; ESMAEILNEJAD et al., 2012).

Para barrar essas ações danosas, o sistema antioxidante atua de diversas formas, incluindo o bloqueio da formação dos radicais livres ou espécies não radicais (sistemas de prevenção), inibição da ação dos compostos oxidantes (sistemas de varredura) ou reparação da constituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (CLARKSON, 2000). Ferreira e Matsubara (1997) citaram a divisão do sistema de defesa em enzimático e não-enzimático, sendo que faz parte do sistema enzimático as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx), que agem por meio de mecanismos de prevenção. Para os mesmos autores, a GPx é a enzima que merece maior atenção entre elas, uma vez que sua ação depende da manutenção do ciclo redox da glutationa por meio do controle da relação entre a glutationa reduzida (GSH) e a oxidada (GSSG). Enquadrados como compostos não enzimáticos estão os antioxidantes de origem dietética, dos quais podemos tomar como exemplo as vitaminas (ácido ascórbico, a-tocoferol, b-caroteno), os compostos fenólicos e os minerais, sendo que os de maior destaque são o zinco, cobre e o selênio (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Diante de tantas alterações ocasionadas pela prenhez, as ovelhas, assim como as demais fêmeas ruminantes ainda apresentam resposta imunológica reduzida a fim de manter o conceito. No entanto, essa situação deixa os animais mais propensos a doenças infecciosas e verminoses (GENNARI et al., 2002). Ovelhas no periparto tornam-se mais susceptíveis a verminoses (CAVALCANTE et al., 2009) embora esse fenômeno tem gravidade e intensidade variável

conforme a raça ovina, afinal, raças com maior resistência helmíntica apresentam fenômenos periparto mais discretos (AMARANTE et al., 1999; WANYANGU et al., 1997; ROCHA et al., 2004). De acordo com a literatura, para que ocorra a infecção por helmintos é necessário adequada condição climática, resposta imunitária deficiente dos animais, assim como manejo incorreto dos indivíduos (CAVALCANTE et al., 2009). O prejuízo relacionado à infecção por parasitas, principalmente helmintos, inclui severa depressão da capacidade digestiva e da absorção na mucosa (MATTOS et al., 2005), podendo assim o animal apresentar redução do ganho de peso, além de comprometimento de funções reprodutivas e imunológicas (COSTA et al., 2004).

Para controle da verminose em ovinos é feito o uso de anti-helmínticos e manejo de pastagens (SOTOMAIOR, 2002; CROOK et al., 2016). No entanto, muitos dos princípios ativos não são eficazes devido à resistência anti-helmíntica adquirida pelos parasitos (KAPLAN e VIDYASHANKAR, 2012). De acordo com a literatura, o controle parasitário também está diretamente relacionado a condições nutricionais, manejo, estado fisiológico e idade dos animais (CAVALCANTE et al., 2009), afinal, indivíduos que recebem alimentação de boa qualidade provavelmente desenvolverão habilidade para enfrentar os prejuízos causados por parasitos (COOP e KYRIAZAKIS, 2001) e passar por adversidades metabólicas (HOUDIJK et al., 2001). Na ovinocultura de leite, no entanto, é necessário ressaltar que o tratamento com alguns anti-helmintico não pode ocorrer no período de lactação, a fim de evitar resíduos no leite. Em virtude disso, há necessidade de buscar alternativas, pois é nesse período que os animais estão mais susceptíveis a várias doenças. Nesse sentido, muitos pesquisadores têm sugerido a suplementação mineral como uma opção para diminuir os efeitos negativos do período de transição e proporcionar melhor qualidade de vida aos animais, reduzindo perdas ao produtor (BOUWSTRA, 2010; SEIJAN et al., 2014).

### **3. SUPLEMENTAÇÃO MINERAL**

Para que as ovelhas apresentem melhor desempenho e possam recuperar-se adequadamente no pós-parto, a adição de produtos à dieta que forneçam suporte nesse período

crítico pode ser uma ótima opção. Dentre os elementos utilizados para este fim ressaltam-se os minerais.

De acordo com o nível de exigência, minerais podem ser classificados em macro ou microminerais, ou seja, macrominerais são requeridos pelo organismo em grandes proporções (quantidades maiores que 100 ppm), e são usados principalmente para funções estruturais ou manutenção do balanço ácido-base. Dentro desse grupo se encaixam o cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), enxofre (S), sódio (Na), potássio (K) e cloro (Cl). Microminerais por sua vez são exigidos em proporções menores que 100 ppm e atuam principalmente como co-fatores enzimáticos contribuindo de forma estrutural ou funcional para a atividade das enzimas, hormônios ou vitaminas e são representados pelo zinco (Zn), ferro (Fe), cobalto (Co), cobre (Cu), molibdênio (Mo), manganês (Mn), iodo (I), selênio (Se), flúor (F) e níquel (Ni) (BERCHIELLI et al., 2006; MENDONÇA JUNIOR et al., 2011).

Os minerais podem ainda ser classificados em inorgânicos ou orgânicos. De acordo com Araújo et al. (2008), minerais inorgânicos podem ser definidos como aqueles de origem geológica ou industrial (óxidos, sulfatos, cloretos, carbonatos e fosfatos) e apresentam custo menor que os orgânicos. Por sua vez, os minerais orgânicos ou quelatados, são descritos por Moraes (2001) como elementos minerais fixados com moléculas orgânicas de baixo peso molecular e apresentam alto potencial pois na forma orgânica há maior biodisponibilidade e melhor aproveitamento, garantindo que a dose fornecida seja menor quando comparada com o mineral inorgânico, reduzindo uma possível contaminação através de dejetos excretados no ambiente (CANIATTO, 2011).

As exigências minerais são altamente dependentes do nível de produtividade dos animais (BERCHIELLI et al., 2006). Além da utilização para funções fisiológicas dos animais os minerais são requeridos também pelos microorganismos do rúmen para seu crescimento e metabolismo. A baixa concentração ou disponibilidade de certos minerais pode reduzir as atividades microbianas relacionadas com a digestão de fibra de forragem e a síntese de proteína, reduzindo o suprimento de nutrientes para o animal. Fósforo e enxofre são os minerais que podem afetar mais expressivamente essas ações (SPEARS, 1994).

McDowell e Valle (2000) afirmaram que forrageiras tropicais contêm teores de macrominerais inferiores às espécies que crescem em ambiente de clima temperado. Para eles, a grande parte das forrageiras tropicais não são capazes de suprir as exigências dos animais

ruminantes criados em pastagens. Em grãos o conteúdo mineral varia menos que em forragens. Segundo McDowell (1999), a concentração mineral nas plantas depende da interação entre vários fatores, entre os quais se inclui o solo, a espécie forrageira, o estado de maturidade, o rendimento, o manejo das plantas e o clima.

Nesse contexto está incluído o selênio, micromineral de propriedades antioxidantes (UNDERWOOD e SUTLLE, 1999) que protege as membranas celulares da degeneração oxidativa (MCDOWELL, 1996) através da sua participação na composição de enzimas glutationas e agindo de maneira sinérgica ao tocoferol na regulação da peroxidação lipídica (COMINETTI e COZOLINO, 2009). O selênio é também um estimulante do sistema imunológico, influenciando a expressão de respostas não-específicas, humorais e celulares (COMINETTI e COZOLINO, 2009). Smith et al. (1986) demonstraram que a dieta com acréscimo de selênio ajuda a manter os mecanismos de defesa do organismo, incluindo a produção de anticorpos, proliferação celular, produção de citocinas, metabolismo das prostaglandinas e função das células do sistema inato de defesa imune em vacas leiteiras. Acredita-se que o selênio estimule o sistema imune através de três mecanismos: (1) regulando a expressão de células T com alta afinidade por receptores de interleucina 2 (IL2); (2) prevenindo danos oxidativos à células do sistema imune; e (3) alterando a agregação plaquetária via redução da produção de tromboxanos em relação a leucotrienos (COMINETTI e COZOLINO, 2009).

Os animais alimentados com forrageiras cultivadas em áreas deficientes em selênio e não suplementados com minerais são mais vulneráveis ao estresse oxidativo, e as consequências clínicas incluem a queda da produção, problemas reprodutivos, redução da resistência a doenças infecciosas como a mastite e miopatias nutricionais (VAN METRE e CALLAN, 2001). De maneira geral, animais de produção exigem algum tipo de suplementação dietética com oligoelementos para que ocorra prevenção de deficiências (CHURCH, 1991). Tendo em vista os efeitos do selênio no metabolismo animal, torna-se possível sugerir que, quando há suplementação com esse composto em fêmeas recém-paridas, pode ocorrer uma diminuição dos compostos oxidantes ou aumento de antioxidantes tanto no sangue quanto no leite desses animais, tornando-os mais resistentes à distúrbios patológicos no pós-parto e originando um produto de melhor qualidade, de maior interesse para a indústria leiteira e com propriedades benéficas para os consumidores. Além disso, este mineral pode ainda interferir na resposta imunológica frente à infecção parasitária do rebanho, já que um estudo dirigido por Camargo

(2009) sobre suplementação com selênio verificou que o mesmo proporciona uma maior proteção contra oxidação celular e ao organismo como um todo de cordeiros experimentalmente infectados pelo *Haemonchus contortus*.

No entanto, cabe ressaltar que até o momento os efeitos positivos descritos pela suplementação de selênio em ovelhas envolvem apenas uma forma desse mineral, isto é, o selenito de sódio. Esse mineral é amplamente usado na dieta de diversas espécies animais (GRILLI et al., 2013; FAIXOVÁ et al., 2016; SETHY et al., 2015; WANG et al., 2011; CALVO et al., 2017). É importante ressaltar que existem outras formas de selênio, porém não usadas na alimentação animal, como é o caso do disseleneto de difenila descrito a seguir.

#### **4. DISSELENETO DE DIFENILA**

Várias classes de compostos orgânicos de selênio demonstram atividade de glutationa peroxidase (GPx) e podem decompor o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroperóxidos orgânicos (NOGUEIRA et al., 2004) que são maléficos para células e tecidos quando em grande quantidade. Na produção animal, o selenito de sódio destaca-se como a principal fonte de selênio usado nas dietas conforme já mencionado (GRILLI et al., 2013; FAIXOVÁ et al., 2016). No entanto, outro composto com atividade similar, o disseleneto de difenila ( $PhSe_2$ ), conserva as mesmas propriedades do selênio inorgânico (MEOTTI et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2004) e não é usado na alimentação provavelmente devido ao elevado custo. Pesquisadores consideram essa molécula de selênio de interesse na gestão de doenças (MEOTTI et al., 2004), devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias potencializadas (SILVESTRE et al., 2014; PETROLINO et al., 2015).

O ( $PhSe_2$ ) demonstra propriedades cardioprotetoras, assim como é capaz de reduzir a hipercolesterolemia e o estresse oxidativo (DE BEM et al., 2009). Além disso, essa molécula de selênio é capaz de inibir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) humana *in vitro* pela sua atividade GPx aumentada (DE BEM et al., 2008). Hort et al. (2011) sugerem que o efeito hipolipidêmico, previne a aterosclerose e disfunção endotelial em receptores LDL, e Straliotto et al. (2013) complementa que o selênio protege macrófagos contra a sinalização aterogênica desencadeada por LDLox. Cabe ressaltar ainda que existe uma forte associação entre estresse

oxidativo e resposta inflamatória, de acordo com pesquisadores uma exacerbada resposta inflamatória é um dos fatores responsáveis por desencadear e manter o estresse oxidativo (SALZANO et al., 2014)

Há experimentos com o disseleneto de difenila em algumas espécies animais. Em peixes, seu efeito protetor foi demonstrado no aumento da defesa antioxidante nos tecidos de animais expostos à poluentes (DE MENEZES et al., 2012; DE MENEZES et al., 2013). O uso do (PhSe)<sub>2</sub> foi testado em ratos com desordens decorrentes do uso de neurolépticos e se mostrou eficaz na redução desses distúrbios (FACHINETTO et al., 2007); também foi eficaz na diminuição da deposição de metilmercúriono poluente ambiental com potente ação oxidante, no cérebro, rim e fígado de camundongos expostos (DE FREITAS et al., 2008) e apresentou-se como eficaz protetor contra danos oxidativos em camundongos expostos a exercícios físicos extenuantes (PRIGOL et al., 2009).

Diante dos efeitos benéficos do selênio no metabolismo animal (HOEKSTRA, 1975; BIANCHI e ANTUNES, 1999; COMINETTI e COZZOLINO, 2009), conhecidas apenas pelo uso de selenito de sódio em animais de produção, procura-se testar outras formas de selênio, como foi o caso nesse estudo, que investigamos os efeitos do (PhSe)<sub>2</sub>. Como esse tipo de mineral nunca foi usado em ovelhas, um estudo piloto foi realizado, aplicando 4 doses de (PhSe)<sub>2</sub>. Nesse estudo, verificou-se que a dose de 3,0 µmol/kg não era tóxica, assim como tinha atividade antioxidante (Dados não publicados). Portanto, acredita-se que essa forma de selênio poderia minimizar os efeitos negativos no período de transição, assim como permitir a obtenção de produtos (leite) com valor nutricional elevado. Como não existem pesquisas com essa forma de selênio em ovinos, informações acerca da sua excreção são escassas, podendo o mesmo, através de fezes e urina, ser um contaminante ambiental e se houver resíduos no leite, se este alimento pode apresentar potencial antioxandante, mostrando efeito nutracêutico.

## 5. RESÍDUOS E IMPACTOS AMBIENTAIS

Sabe-se que as fezes de vários animais de produção são comumente usadas como fertilizantes em pastagens, sendo que os resíduos de ovinos seguem a mesma linha de interesse (AZIZI, 2007). Porém, muitos são os produtos veterinários utilizados para a manutenção da saúde

dos rebanhos, fazendo com que antibióticos e antiparasitários sejam comumente detectados no solo, nas águas superficiais e nos lençóis freáticos. Esses fármacos eliminados de maneira residual nas fezes são suspeitos de causarem efeitos adversos à fauna e microflora do solo e por isso, nos últimos anos, vários estudos sobre o potencial impacto dos medicamentos e suplementos veterinários ao ambiente têm sido conduzidos (SUAREZ, 2002; BOXALL et al., 2004; KOLAR et al., 2006; ACCINELI et al., 2007).

De acordo com a literatura, a urina é uma importante via de excreção do selênio oriundo de  $(\text{PhSe})_2$  em camundongos e ratos, e alguns de seus metabólitos armazenam-se na gordura (PRIGOL et al., 2012), porém, a principal forma de excreção do selênio em ovelhas, é através das fezes (PETERSON e SPEEDING, 1963). Não há estudos recentes relacionando a excreção do disseleneto de difenila pelas fezes, então acredita-se que esse composto siga a mesma rota de eliminação.

Busca-se em larga escala, o desenvolvimento de métodos analíticos para a detecção de drogas e resíduos no ambiente aquático e terrestre (HIRSCH et al., 1999; GOLET et al., 2001). Baseado nesse interesse, alguns artrópodos podem ser utilizados para indicar agressão de dejetos animais ao ambiente. Os colêmbolos, mais comumente utilizados para esse fim, estão entre os invertebrados mais abundantes do solo e são facilmente adaptáveis (BELLINGER et al., 2007) e por isso, uma diversidade de colêmbolos edáficos tem sido usada como bioindicador de intervenções antrópicas, bem como, da qualidade do solo (SAUTTER e SANTOS, 1991; CULIK et al., 2002; CHAUVAT et al., 2003; PONGE et al., 2003; CUTZ-POOL et al., 2007).

A utilização de atributos químicos e microbiológicos do solo como variáveis ambientais explicativas no entendimento do funcionamento do solo, aliada à quantificação da diversidade de invertebrados edáficos como os colêmbolos é um ponto de partida importante para entender os processos ecológicos de decomposição e ciclagem de nutrientes no solo (CHAUVAT et al., 2003; PONGE et al., 2003; CUTZ-POOL et al., 2007). Baseado nessa informação surge o interesse em saber se as fezes dos animais que recebem suplementação com o mineral orgânico  $(\text{PhSe})_2$  seriam aptas a serem utilizadas para adubação sem causar danos ambientais, haja visto que são inúmeros os trabalhos que demonstram o impacto negativo de fezes de animais com resíduos de aditivos e fármacos à microfauna do solo (GIL-DÍAZ et al., 2011; ZHAO et al., 2016). Entre os estudos recentes destaca-se o efeito residual negativo da cipermetrina usada para controle de cascudinhos em aviários (ZORTEA et al., 2015) e de antiparasitários (ivermectina, fipronil, fluazuron e

closantel) usados no controle de carapatos em bovinos (ZORTEA et al., 2017) sobre a sobrevivência de colêmbolos presentes no solo. Portanto, para fins de segurança para uso de novos produtos como suplementos minerais, os testes ecotoxicológicos devem ser realizados.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 OBJETIVO GERAL

Com este estudo objetivou-se avaliar o efeito da suplementação de ovelhas leiteiras com disseleneto de difenila sobre a produção e qualidade do leite, resposta imune, perfil oxidativo e infecção por nematódeos gastrointestinais. Além disso, realizar testes de ecotoxicologia com fezes de animais tratados com essa forma de selênio, a fim de avaliar impactos ambientais.

### 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar a produção de leite;
- Analisar a produção e composição centesimal do leite (gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado e sólidos totais);
- Analisar no soro e no leite de ovelhas lactantes os níveis de oxidantes (TBARS, AOPP e EROs) e antioxidantes (CAT, GST, GPx, SOD, FRAP);
- Mensurar no soro das ovelhas os níveis de IL-10;
- Avaliar parâmetros bioquímicos séricos (ALT, triglicerídeos, colesterol, proteínas séricas totais, albumina, globulina e uréia) das ovelhas suplementadas;
- Realizar testes de ecotoxicologia utilizando as fezes.

## CAPÍTULO II

### MANUSCRITOS

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de dois manuscritos com suas formatações de acordo com as orientações das revistas as quais foram submetidos:

**Manuscrito I – Injectable supplementation of diphenyl diselenide in dairy sheep: benefits on animal health and milk production and composition**

Submetido a revista Small Ruminant Research

**Manuscrito II – Suplemento de difenil diselenuro inyectable en ovejas lecheras**

Submetido a Revista MZV Cordoba

## 2.1. MANUSCRITO I

### Injectable supplementation of diphenyl diselenide in dairy sheep: benefits on animal health and milk production and composition

A.H. Biazus<sup>a</sup>, R.K. Grosskopf<sup>a</sup>, H.M. Grosskopf<sup>a</sup>, C.J. Cazarotto<sup>a</sup>, J.P. Boito<sup>a</sup>, G. Machado<sup>b</sup>, N.B. Bottari<sup>c</sup>, M.S. Alves<sup>c</sup>, V.M. Morsch<sup>c</sup>, M.R.C. Schetinger<sup>c</sup>, M.L.R. Leal<sup>d</sup>, N. F. Fernandes<sup>e</sup>, R.N. Moresco<sup>e</sup>, M.D. Baldissera<sup>f</sup>, A.S. da Silva<sup>b,c\*</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program in Animal Science and Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, Santa Catarina (SC), Brazil.

<sup>b</sup> Veterinary Population Medicine, University of Minnesota, Sait Paul, MN, United States of America.

<sup>c</sup> Graduate Program in Toxicological Biochemical and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>d</sup> Department of Large Animal Medicine (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>e</sup> Department of Clinical and Toxicological Analysis (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>f</sup> Department of Microbiology and Parasitology (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

\*Author for correspondence: Department of Animal Science, University of Santa Catarina State. 680 D, Beloni Trombeta Zanin Street, Chapecó/SC, Brazil Zip: 89815-630, Phone: 55 49 2049-9560. (E-mail: [aleksandro\\_ss@yahoo.com.br](mailto:aleksandro_ss@yahoo.com.br)).

### ABSTRACT

Diphenyl diselenide ( $\text{PhSe}_2$ ) is a selenium organic compound of potent antioxidant property. Therefore, the aim of this study was to evaluate whether injectable supplementation of ( $\text{PhSe}_2$ ) would have positive effect on milk production and composition, as well as in the prevention of oxidative stress and anti-inflammatory responses in dairy sheep. For this, sixteen primiparous recently calved sheep were divided into two groups: A (the control group), and B (group supplemented with five doses of 3  $\mu\text{mol/kg}$  via subcutaneous with seven days intervals). Blood samples showed an increase in the antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase,

glutathione peroxidase, and glutathione-S-transferase), associated with a reduction of reactive oxygen species and lipid peroxidation of supplemented dairy sheep, preventing oxidative damage in the lactation period, as well as increased serum interleukin-10, an anti-inflammatory cytokine. As consequence, supplemented animals showed an increase in total antioxidants, as well as a reduction in protein oxidation in milk samples. Moreover, milk from supplemented sheep showed higher fat and lower total protein and lactose. Thus, the subcutaneous supplementation of (PhSe)<sub>2</sub> in dairy sheep was able to activate the antioxidant and anti-inflammatory systems, as well as to modify milk composition. Moreover, this protocol increased the antioxidant and, consequently, reduced the oxidant levels in milk, which may lead to a longer shelf life of the product.

**Keywords:** Sheep, milk, diphenyl diselenide, oxidative stress.

## 1. INTRODUCTION

Lacaune sheep produces approximately 4.5 L of milk during their peak of lactation, that occurs around 30 days postpartum (Luquet, 1991). Many factors may cause variation in the production and composition of milk, such as environment, age, lactation stage and nutritional levels of the animals (Bencini and Pulina, 1997). Females recently calved require major nutritional requirements, since this transition period interferes directly on the productive status due to physiological alterations occurred in this phase (Drackley 1999).

Several studies have been demonstrated the association between oxidative stress and postpartum disturbances in dairy cows (Harrison et al., 1984; Smith et al., 1984; Gröhn et al., 1989; Lomba, 1996). The oxidative stress is a disequilibrium between antioxidant/oxidant status in favor of the production of free radicals, which in adequate proportions, allows the production of ATP (adenosine triphosphate), but in excesses can lead to cell and tissue damage (Ferreira e Matsubara, 1997). These oxidative effects are often neutralized by antioxidant agents, that remove the free radicals and, consequently, inhibit their deleterious effects on cells and tissues (Halliwell and Whiteman, 2004).

The antioxidant system can be divided in enzymatic and non-enzymatic, being the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase the most important enzymes (Ferreira and Matsubara, 1997). Regarding the non-enzymatic compounds, we can emphasize the vitamins (ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, and  $\beta$ -carotene), phenolic compounds, and

minerals, such as zinc, copper and selenium (Bianchi and Antunes, 1999). In the particular interest, the study conducted by McDowell (1992) demonstrated that selenium was able to protect the cell membranes against oxidative degeneration, and its action is linked to enzyme GPx, as well as in the synergic effect with tocopherol in the regulation of lipid peroxidation (Cominetti and Cozzolino 2009). Since the 80s, researchers have demonstrated that diet supplemented with selenium aid in the defense mechanism, including the antibodies production, cell proliferation, cytokines production, metabolism of prostaglandins and the innate immunity of dairy cows (Smith et al., 1986).

In animal production, sodium selenite is considered the main source of selenium in the diet (Grilli et al., 2013; Faixová et al., 2016). However, laboratorial studies have demonstrated that other selenium sources, such as the  $(\text{PhSe})_2$ , shows similar effects of the inorganic selenium (Meotti et al., 2004; Nogueira et al., 2004), being considered an interesting molecule against diseases (Meotti et al., 2004) due to its antioxidant and anti-inflammatory properties (Silvestre et al., 2014; Petrolino et al., 2015). Based on the beneficial effect of selenium in the animal metabolism (Hoekstra, 1975; Bianchi and Antunes, 1999; Hoffmann, 2007; Cominetti and Cozzolino, 2009), we believe that  $(\text{PhSe})_2$  supplementation in dairy sheep can prevent oxidative stress and minimize pathological disturbances in the transition period, and consequently, can lead to a better-quality product, with major interest for dairy industry with beneficial properties for consumers. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of injectable supplementation of  $(\text{PhSe})_2$  on animal health, and on milk production and composition.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Diphenyl diselenide

Diphenyl diselenide ( $\text{PhSe})_2$  (99.9%) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), and diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) right before sheep injection.

### 2.2. Animals

The experiment was conducted in a farm localized in Chapecó, Santa Catarina, Southern Brazil. For this study, sixteen primiparous and recently calved Lacaune sheep (approximately seven days postpartum), with similar age, weight and milk production were used as the experimental model. These animals were distributed into two groups, containing eight animals

each: the group A (control group) received 1.5 mL/kg of DMSO via subcutaneous, while the group B received 1.5 mL/kg of  $(\text{PhSe})_2$  via subcutaneous, corresponding to a dose of 3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ . A pilot study was conducted to determine the non-toxic dose, since the  $(\text{PhSe})_2$  was never used in sheep. Based on this pilot study, the dose of 3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  was considered ideal (data not published). The selenium application occurred on days 0, 7, 15, 30 and 45, i.e.

The sixteen females were housed in the same pen ( $24 \text{ m}^2$ ), with beaten floor and wood shaving beds. The diet of all sheep was composed by corn silage, cynodont hay, and concentrated (ground corn, soybean meal, vitamin and mineral core, calcitic limestone and monensin), that was provided twice a day, with water *ad libitum*.

### **2.3. Milk production**

The milking was performed daily through mechanic milking between 5:00 a.m and 4 p.m. The individual volumetric measurement of produced milk occurred weekly through the "Milk Meter" True Test® measurer (Auckland, New Zealand). Moreover, milk samples were collected on days 0, 15, 30, 45, 60 and 75, and were stored in plastic bottles containing Bronopol (2-Bromo-2-nitro-1, 3-propanediol) for conservation and centesimal composition analysis. Aliquots of milk were separated in microtubes for measurement of oxidant and total antioxidant levels, as described below.

### **2.4. Milk analyses**

#### *2.4.1. Centesimal composition*

Fat, total dry extract (TDE), defatted dry extract (DDE), minerals, lactose and density were evaluated using the infrared analyzer LactoStar Funke Gerber®.

#### *2.4.2. Oxidant and antioxidant levels*

Protein oxidation was measured through the advanced oxidation protein products (AOPP) technique (Witko-Sarsat et al., 1998), and the antioxidant levels were measured by ferric reducing ability of plasma (FRAP) technique (Benzie and Strain, 1996). These methodologies were standardized for milk whey, as described by Radavelli et al. (2016). The results were expressed as  $\mu\text{mol/L}^{-1}$ .

## 2.5 Sample collection and blood analyses

Blood samples were collected on days 0, 15, 30, 45, 60 e 75 by jugular vein puncture. The blood was collected in tubes without anticoagulant and in tubes containing sodium citrate. To obtain serum, the blood collected without anticoagulant was centrifuged for 10 min at 8000 rpm. After, the serum was stored in microtubes at -20 °C. The blood collected in sodium citrate was homogenized and stored in microtubes at -20 °C until utilization.

### 2.5.1. Seric oxidative biomarkers

The occurrence of lipid peroxidation was evaluated by seric malondialdehyde levels (MDA), using the measurement of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) (Jentzsch et al., 1996). The results were expressed in nanomols of malondialdehyde per milliliter of serum (nmol MDA/mL serum).

The oxidation of 2'-7'- dichlorofluorescein (DCFH) levels was determined in serum as an index of peroxide produced by cellular components, according to the modified method described by Colpo et al. (2008), to determine the reactive oxygen species (ROS) levels. For this, 10 µL of serum was incubated with DCFH (10 µL) 1 mM at 37 °C during 1 h in the dark. The fluorescence was determined using 448 nm for excitation and 520 nm for emission. Fluorescence measurement was normalized for time, values and fluorescence rates (reflecting the levels of ROS). The results were expressed in U DCFH/mL of serum.

### 2.5.2. Activity of antioxidant enzymes

Seric GST was determined spectrophotometrically according to the method described by Habig et al. (1974) and expressed in nmol/h/mg of protein. Seric GPx was determined according to the method described by Paglia and Valentine (1967), that determine the oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADH). The enzymatic activity was expressed in nmol of oxidized NADPH/h/mg of protein.

The total blood was used to determine the SOD and CAT activities. The SOD activity was determined spectrophotometrically through the inhibition of autocatalytic formation adrenochrome rate (McCords and Fridovich, 1969), and the result was expressed in U SOD/mg of protein. Already, the CAT activity was measured according to Aebi et al. (1984), that

determines the decomposition rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into water and oxygen. The specific CAT activity was expressed in U CAT/mg of protein.

## 2.6. IL-10 levels

Seric interleukin-10 (IL-10) was quantified using the commercial immunoassay Quantikine® for ovine, according to manufacturer's recommendations (R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA). The presence and concentration of cytokine were determined by color intensity measured spectrophotometrically in micro ELISA reader (Tecan, Sunrise, Melbourne, Australia).

## 2.7. Statistical analysis

SOD, CAT, ROS, TBARS, GST, GPX, IL-10, AOPP, FRAP, milk production, milk fat, DDE, milk protein, TDE in milk, milk mineral, lactose and density were first analyzed by descriptive statistics for contingency of the information and for further assumptions, and were presented as descriptive (mean and standard deviation). The data were tested for normality of variance by Kolmogorov-Smirnov test, skewness and homogeneity by Levene's test previously to ANOVA analyses. An one-way ANOVA for repeated measurements was used to evaluate the influence of time (an error term was added to accommodate the dependence of subjects [sheep that were re-sampled] when necessary (statistical differences were found), Bonferroni's test was used since it controls the family-wise type I error rate, by adjusting the observed significance level to the number of multiple comparisons. Secondly, one-way ANOVA was used to analyze all significant parameters that had shown significant differences over time on the repeated measured analyses, mean comparison between groups on each time period were tested (day 0, 15, 30, 45, 60 and 75). It was considered significantly different when P<0.05. The statistical process was carried out with R-Language, V.3.3.0 (R Development Core Team, 2012).

## 3. RESULTS

### 3.1. Production and milk composition

No difference was observed between groups regarding milk production during the experimental period (Table 1). However, an increase in the levels of fat in the milk of supplemented sheep with (PhSe)<sub>2</sub> was observed between days 30-60 of the study. Also, protein

levels decreased on day 15, while the same decrease was observed for lactose levels in the end of experiment (days 60 and 75) in sheep supplemented with  $(\text{PhSe})_2$  ( $P<0.05$ ). In consequence, the levels of TDE differ between groups ( $P<0.05$ ), while the DDE did not ( $P>0.05$ ). In some period of sampling, the mineral levels were significantly higher ( $P<0.05$ ) in the milk of sheep supplemented with  $(\text{PhSe})_2$ .

### **3.2. Milk oxidant and antioxidant levels**

AOPP levels in milk differ between groups (Figure 1-A) during all experimental period ( $F=86.42$ ,  $P<0.001$ ), as demonstrated in the Figure 3-B. AOPP levels decreased on days 30, 60 and 75 ( $P<0.05$ ) in the group supplemented with  $(\text{PhSe})_2$  compared to the control group (Figure 1-A). The AOPP levels increased on day 30<sup>th</sup> in both groups, however with higher values in the control group (Figure 1B).

FRAP levels in milk differ between groups (Figure 1-C) throughout the experiment ( $F=42.95$ ,  $P<0.001$ ), as demonstrated in the Figure 3-D. FRAP levels increased on days 45, 60 and 75 in animals supplemented with  $(\text{PhSe})_2$  compared to the control group (Figure 1-C). Also, an increase in the FRAP levels was observed on days 30 to 75 ( $P<0.001$ ) in the group supplemented with  $(\text{PhSe})_2$  (Figure 1-D).

### **3.3. Seric ROS and TBARS levels**

Seric ROS levels oscillated and differed between groups in some sampling times, being higher in supplemented animals on days 15 and 75, and lower on day 45 (Table 2). Seric TBARS levels decreased on days 45, 60 and 65 in the group supplemented compared to the control group (Table 2) but not in the other sampling times ( $F=7.85$ .  $P=0.0006$ ; Figure 2). A significant reduction on TBARS levels was observed on days 0 and 45 ( $P=0.01$ ), day 0 and 60 ( $P<0.0001$ ), day 15 to 75 ( $P<0.0001$ ) and day 45 to 75 ( $P=0.004$ ) (Figure 2-C).

### **3.4. Activity of seric antioxidant enzymes**

The results of seric antioxidant enzymes are shown in Table 3 and Figure 2. The seric SOD, CAT, GST and GPx increased ( $P<0.05$ ) in animals supplemented with  $(\text{PhSe})_2$  compared to the control group (Table 3). Similarly, an increase on SOD (Figure 2-A), CAT (Figure 2-B), GST

(Figure 2-D) and GPx (Figure 2-E) activities was observed in sheep supplemented with (PhSe)<sub>2</sub> along the experimental period.

### 3.3. Seric IL-10 levels

The results of IL-10 levels are shown in the Figure 3. The difference on IL-10 levels between groups occurred in all experimental periods (Figure 3-A), since IL-10 levels discretely increased on days 15 and 30, and remained stable after 30 days. Over the time, an increase ( $P<0.01$ ) in the seric IL-10 was observed between day 0 and 30 in the group supplemented with (PhSe)<sub>2</sub>.

## 4. DISCUSSION

Selenium compound has potential antioxidant effect due to its involvement in the structure of selenoproteins, such as GPx and GST enzymes (Hoekstra 1975), and (PhSe)<sub>2</sub> can enhance this effect (Ghisleni et al., 2003, Nogueira et al., 2003; Savegnago et al., 2007). (PhSe)<sub>2</sub> treatment was able to activate the enzymatic antioxidant system, i.e. increased SOD, CAT, GST and GPx activities. According to John et al. (2005), the GST and GPx are enzymes responsible to detoxification of toxic compounds, while SOD and CAT acts controlling the formation of free radicals (Ferreria and Matsubara, 1997). The activation of the antioxidant system is related to a reduction in the formation of free radicals and lipid peroxidation (Armstrong and Browne, 1998), preventing the oxidative stress, that is commonly observed during lactation in highly productive animals (Castillo et al., 2006). In this present study, the reduction of oxidative stress process can be verified due to the reduction of aldehydes or lipid hydroperoxides in dairy sheep supplemented with (PhSe)<sub>2</sub>, which demonstrates that protocol used lead to a beneficial effect on animal health.

In this study, the (PhSe)<sub>2</sub> supplementation did not affect milk production, however alterations in milk composition occurred in some experimental moments, by increasing fat concentration, and reducing protein and lactose levels. The exact mechanism involved in these alterations remains unknown, but we believe that it might be related to the effect of selenium in animal's health, since milk composition is strongly related to the health of the mammary gland (Butler, 2000). These results are promising, since increased fat content is an important source to the milk industry to produce many products. On the other hand, studies conducted by Givens et

al. (2004) and Ran et al. (2010) demonstrated that selenium (sodium selenite) did not alter milk composition of dairy cows, demonstrating that  $(\text{PhSe})_2$  can be better used by sheep.

FRAP and AOPP values differed between groups, with important desirable alterations found in sheep supplemented with  $(\text{PhSe})_2$ . FRAP assay measures the total antioxidant capacity (Benzie and Strain, 1999; Smet et al., 2008), and our results demonstrated that  $(\text{PhSe})_2$ , in the administered dose, was able to modify the concentration of this antioxidant in the milk, and to decrease oxidative reactions, i.e., it has positive effects in the control of free radicals. Thus, it is possible to suggest that decreased levels of AOPP is intimately linked to the reduction of oxidant enzymes, such as lactoperoxidase and xanthine-oxidase (Silanikove et al., 2005), due to increased antioxidant levels present in the milk. The reduction on protein oxidation can also be linked to better health of the mammary gland, as observed by Guzzo et al. (2015). This author demonstrated a significant correlation between AOPP levels and somatic cell counts in the mammary gland. Moreover, the reduction of AOPP levels may be considered an indirect consequence of reduced lipid peroxidation as carbohydrate glycosylation due to the  $(\text{PhSe})_2$  action, since this compound is highly lipophilic and has high biodisponibility, preventing efficiently lipid peroxidation (Barbosa et al., 2014). The antioxidant and oxidant levels in the milk can influence milk quality and shelf life, assuring therapeutic properties to consumers (Roesler et al., 2007), if the increase on total mineral levels in milk is due to increased forms of selenium.

Serum IL-10 levels increased in dairy sheep supplemented with  $(\text{PhSe})_2$  during all the experiment. This cytokine is important to regulate the immune system through the inhibition of B and T-lymphocytes proliferation (Arababadi et al., 2010). The selenium possesses the capacity to promote the activation of the immune system by regulating the expression of T lymphocytes (Hoffman, 2007), cells that are responsible for IL-10 expression (Fiorentino et al., 1989; Trounstein et al., 1990), which can explain the increase on this anti-inflammatory cytokine. Recently, a study demonstrated that  $(\text{PhSe})_2$  exhibits potent anti-inflammatory activity (Nogueira et al., 2003b), and it is effective in reducing the levels of reactive species due to its antioxidant property and by preventing the occurrence of oxidative stress (Prigol et al., 2009). Thus, the effects of  $(\text{PhSe})_2$  is directly linked to its capacity to modulate the inflammatory response, and consequently reducing cellular and tissue damage.

Thus, we can suggest that subcutaneous supplementation of (PhSe)<sub>2</sub> in dairy sheep was able to modulate the oxidative reaction due to the activation of the antioxidant system, as well as to modulate the inflammatory response in the animals. These alterations may contribute to animal health, reflecting on the increase of milk fat by a mechanism not yet elucidated. Also, the exogenous (PhSe)<sub>2</sub> administration leads to an increase of antioxidants, which consequently, reduce milk protein oxidation, contributing to increase product stability. Moreover, selenium, is an essential mineral for human and animal health, and its use in dairy animals may lead to the production of milk with nutraceutical properties.

### **ETHICS COMMITTEE**

This study was approved by the ethics committee for animal experimentation of Universidade do Estado de Santa Catarina (CETEA/UDESC) under protocol number 5446050216.

### **REFERENCES**

- Aebi H., 1984. Catalase in vitro. Method. Enzymol. 105, 121-126.
- Ali S.F., Lebel C.P., Bondy S.C., 1992. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. Neurotoxicology. 113, 637–648.
- Arababadi M.K., Mosavi R., Khorramdelazad H., Yaghini N., Zarandi E.R., Araste M., Pourali R., Nekhei Z., Kennedy D., 2010. Cytokine patterns after therapy with Avonex®, Rebif®, Betaferon® and CinnoVex® in relapsing-remitting multiple sclerosis in Iranian patients. Biomark. Med. 4, 755–759.
- Armstrong D., Browne R., 1998. Synthesis of lipid and cholesterol hydroperoxide standards, Free radical and antioxidant protocols. 108, 139–145.
- Bannister J.V., Calabrese L., 1987. Assays for SOD. Methods Biochem. Anal. 32, 279-312.
- Barbosa C.F., Tonin A.A., Da Silva A.S., Azevedo M.I., Monteiro D.U., Waczuk E.P., Duarte T., Hermes C., Camillo G., Vogel F.F., Faccio L., Tonin P.T., Wolkmer P., Leal M.R., Duarte M.M.F., Moresco R.N., Lopes S.T.A., De La Rue M.L., 2014. Diphenyl diselenide and sodium selenite associated with chemotherapy in experimental toxoplasmosis: influence on oxidant/antioxidant biomarkers and cytokine modulation. Parasitology, v.141, p. 1761-1768, 2014.

- Bencini R., Pulina G., 1997. The quality of sheep milk: a review. *Wool Techn. Sheep Breed.* 45, 182-220.
- Benzie I.F.F., Strain J.J., 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method. Enzym.*, 299, 15–27.
- Bianchi M.L.P., Antunes L.M.G., 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.* 12, 123-130.
- Butler, W.R., 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 449-457.
- Castillo C., Hernandez J., Valverde I., Pereira V., Sotillo J., López A.M., Benedito J.L., 2006. Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 80, 133–139.
- Cominetti C., Cozzolino S.M.F., 2009. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes - Selênio/ ILSI Brasil.
- Drackley J.K., 1999. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *J. Dairy Sci.* 82, 2259–2273.
- Faixová, Z., Piešová, E., Maková Z., Čobanová, K., Faix, S., 2016. Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on ruminal enzyme activities and blood chemistry in sheep. *Acta Vet. Brno.*, 85, 185-194.
- Ferreira A.L.A., Matsubara L.S., 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Méd. Bras.* 43, 61-68.
- Fiorentino D.F., Bond M.W., Mosmann T.R., 1989. Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exper. Med.*, 170, 2081-2095.
- Ghisleni G., Porciuncula L.O., Cimarosti H., Rocha J.B.T., Salbego C.G., Souza D.O., 2003. Diphenyl diselenide protect rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase innunocontent *Brain Res.*, 986, 196–199.

- Givens D.I., Allison R., Cottrill B., Blake J.S., 2004. Enhancing the selenium content of bovine milk through alteration of the form and concentration of selenium in the diet of the dairy cow. *J. Sci. Food Agric.* 84, 811–817.
- Grilli E., Gallo A., Fustini M., Fantinati P., Piva A., 2013. Microencapsulated sodium selenite supplementation in dairy cows: effects on selenium status. *Animal.* 7, 1944-1949.
- Grohn Y.T., Erb H.N., McCulloch C.E., Saloniemi H.S., 1989. Epidemiology of metabolic disorders of dairy cattle: Association among host characteristics, disease, and production. *J. Dairy Sci.* 72, 1876–1885.
- Guzzo N., Bailoni L., Mantovani R., Da Dalt L., Gabai G., 2015. Oxidized protein biomarkers in the blood and milk of cows supplemented with flaxseed during the dry period. In: Knight C.H., editor. 2nd DairyCare Conference; 2015 Mar 3–4. Cordoba, Spain: DairyCare COST Action FA1308, 60.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakob W.B., 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Halliwell B., Whiteman M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142, 231-255.
- Harrison J.P., Hancock D.D., Conrad H.R., 1984. Vitamin E and selenium for reproduction of the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 67, 123–131.
- Hoekstra W.G., 1975. Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E. *Federation Proc. J.* 34, 2083–2090.
- Hoffmann P.R., 2007. Mechanisms by which selenium influences immune responses. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 55, 289–297.
- Jentzsch A.M., Bachmann H., Furst P., Biesalski H., 1996. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biol Med.* 20, 251–256.
- John D.H., Jack U.F., Ian R.J., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88.
- Lomba F., 1996. Influence of dietary cation-anion and oxidative-antioxidants balances on diseases occurring around parturition in the dairy cows. *Ann. Med. Vet.* 140, 109–122.
- Luquet F.M., 1991. La leche: de la mama a la lechería. Zaragoza: Acribia, 195.

- McCords M.J., Fridovich I., 1969. Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6065.
- Mcdowell L.R., Williams S.N., Hidirogloou N., Nieru C.A., Hill G.M., Ochoa L., Wilkinson N.S., 1996. Vitamin E and selenium suplementation for the ruminant. *Anim. Feed Sci. Techn.* 60, 273 296.
- Meotti F.C., Stangherlin E.C., Zeni G., Nogueira C.W., Rocha J.B.T., 2004. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Envir. Res.*, 94, 276-282.
- Moore K.W., Vieira P., Fiorentino D.F., Trounstine M.L., Khan T.A., Mosmann T.R., 1990. Homology of cytokine synthesis inhibitory fator (IL-IO) to the Epstein Barr Virus gene BCRFI. *Science*, 248, 1230-1234.
- Nogueira C.W., Meotti F.C., Pilissão C., Zeni G., Rocha J.B.T., 2003. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology*, 183, 29–37.
- Nogueira, C.W., Quinhones, E.B., Jung, E.A. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm Res*, 52 (2003b), pp. 56–63
- Nogueira C.W., Zeni G., Rocha J.B.T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* 104, 6255-6286.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K., 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Ann. Biochem.* 95, 351–358.
- Paglia D., Valentine W., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocute glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158–169.
- Petronilho F., Florentino D., Silvestre F., Danielski L.G., Nascimento D.Z., Vieira A., Kanis L.A., Fortunato J.J., Badawy M., Barichello T., Quevedo J., 2015. Ebselen attenuates lung injury in experimental model of carrageenan-induced pleurisy in rats, *Inflammation*, 38, 1394–1400.
- Prigol, M., Bruning, C.A., Zeni, G., Nogueira, C.W., 2009. Protective effect of disubstituted dayryl diselenides on cerebral oxidative damage caused by sodium nitroprusside. *Biochem. Eng. J.* 45, 94–99
- Radavelli W.M., Campigotto G., Machado G., Bottari N.B., Bochi G., Moresco R.N., Morsch V.M., Schetinger M.R.C., Bianchi A., Baldissera M.D., Ferreira R., Da Silva A.S., 2016 . Effect of lactation induction on milk production and composition, oxidative and antioxidant status, and biochemical variables. *Comp. Clin. Path.* 25, 639-64.

- Ran L., Wu X., Shen X., Zhang K., Ren F., Huang K., 2010. Effects of selenium form on blood and milk selenium concentrations, milk components and milk fatty acid composition in dairy cows. *J. Sci. Food Agric.* 90, 2214–2219.
- Roesler R., Malta L.G., Carrasco L.C., Holanda R.B., Sousa C.A.S., Pastore G.M., 2007. Antioxidant activity of native fruits. *Cien. Tecnol. Alim.* 27, 53–60.
- Savegnago L., Pinto L.G., Jesse C.R., Alves D., Rocha J.B.T., Nogueira C.W., Zeni G., 2007. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: evidences for the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.*, 555, 129–138
- Silanikove N., Shapiro F., Shamay A., Leitner G., 2005. Role of xanthine oxidase, lactoperoxidase, and NO in the innate immune system of mammary secretion during active involution in dairy cows: manipulation with casein hydrolyzates. *Free Radic. Biol. Med.*, 38, 1139–1151.
- Silvestre F., Danielski L.G., Michels M., Florentino D., Vieira A., Souza L., Cardoso L.C., Schraiber R., Rezin G.T., Vuolo F., da Rocha J.B., Barichello T., Quevedo J., Dal-Pizzol F., Petronilho F., 2014. Effects of organoselenium compounds on early and late brain biochemical alterations in sepsis-survivor rats, *Neurotoxic. Res.* 26, 382–391.
- Smet K., Raes K., De Block J., Herman L., Dewettinck K., Coudijzer K., 2008. A change in antioxidative capacity as a measure of onset to oxidation in pasteurized milk. *Int. Dairy J.* 18, 520–530.
- Smith K.L., Harrison J.H., Hancock D.D., Todhunter D.A., Conrad H.R., 1984. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. *J. Dairy Sci.* 67, 1293–1300.
- Vincent H.K., Innes K.E., Vincent K.R., 2007. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Dayabetes Obes, Metab.* 9, 813–839.
- Witko-Sarsat V., Friedlander M., Nguyen Khoa T., Capeillère-Blandin C., Nguyen A.T., Canteloup S., 1998. Advanced oxidation protein products as a novel mediators of inflammation and monocyte activation in a chronic renal failure, *J. Immun.* 161, 2524–2532.

**Table 1:** Daily milk production, and percentage of fat, protein, lactose, defeated dry extract (DDE), total dry extract (TDE) and minerals contained in milk.

<b>Variable</b>	<b>Day</b>	<b>Mean ± standard deviation</b>		<b>P value</b>
		Group A	Group B	
<b>Production (L)</b>	0	0.95 (0.26)	0.94 (0.24)	0.92
	15	1.31 (0.22)	1.30 (0.36)	0.93
	30	1.31 (0.24)	1.27 (0.41)	0.82
	45	1.35 (0.21)	1.29 (0.37)	0.68
	60	1.52 (0.19)	1.43 (0.4)	0.53
	75	1.01 (0.16)	0.99 (0.35)	0.87
<b>Fat milk (%)</b>	0	8.18 (1.32)	8.51 (0.83)	0.60
	15	6.29 (0.85)	5.46 (0.99)	0.09
	30	5.68 (0.61)	6.66 (0.59)	0.005*
	45	4.68 (0.72)	6.42 (0.80)	0.007*
	60	6.02 (0.42)	7.94 (0.64)	0.006
	75	5.71 (0.62)	6.23 (1.27)	0.31
<b>Protein (%)</b>	0	3.82 (0.33)	4.03 (0.53)	0.40
	15	3.84 (0.40)	3.05 (0.45)	0.002*
	30	3.85 (0.24)	3.86 (0.17)	0.95
	45	3.89 (0.23)	4.29 (0.60)	0.09
	60	3.95 (0.19)	4.01 (0.17)	0.56
	75	3.29 (0.17)	3.24 (0.29)	0.65
<b>Lactose (%)</b>	0	4.42 (0.55)	4.58 (0.16)	0.51
	15	5.09 (1.19)	4.87 (0.92)	0.68
	30	5.63 (0.36)	5.64 (0.26)	0.94
	45	5.72 (0.34)	5.80 (0.52)	0.75
	60	5.79 (0.27)	4.81 (0.80)	0.008*
	75	4.95 (0.28)	4.41 (0.21)	<0.001*
<b>DDE (%)</b>	0	8.97 (0.72)	9.33 (0.54)	0.33
	15	9.39 (2.14)	8.31 (1.16)	0.22
	30	10.51 (0.61)	10.55 (0.43)	0.88
	45	10.45 (0.63)	10.85 (0.66)	0.24
	60	10.80 (0.46)	10.81 (0.63)	0.96
	75	8.61 (0.47)	8.56 (0.35)	0.81
<b>TDE (%)</b>	0	17.15 (1.44)	17.85 (1.17)	0.36
	15	15.68 (2.31)	13.77 (1.68)	0.07
	30	16.19 (0.76)	17.21 (0.57)	0.008*
	45	15.13 (1.13)	16.27 (0.99)	0.05
	60	17.82 (0.48)	18.75 (0.76)	0.01*
	75	14.32 (0.85)	14.79 (1.17)	0.37

<b>Mineral (%)</b>	0	0.57 (0.05)	0.60 (0.02)	0.30
	15	0.56 (0.03)	0.59 (0.01)	0.04*
	30	0.81 (0.05)	0.84 (0.04)	0.34
	45	0.53 (0.11)	0.60 (0.03)	0.09
	60	0.80 (0.04)	0.80 (0.04)	0.95
	75	0.72 (0.03)	0.79 (0.03)	<0.001*

| Values of  $p \leq 0.05$  (\*) represents significant differences between the groups.

**Table 2:** Mean and standard deviation of seric reactive oxygen species (ROS) and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in dairy sheep in different days post-supplementation.

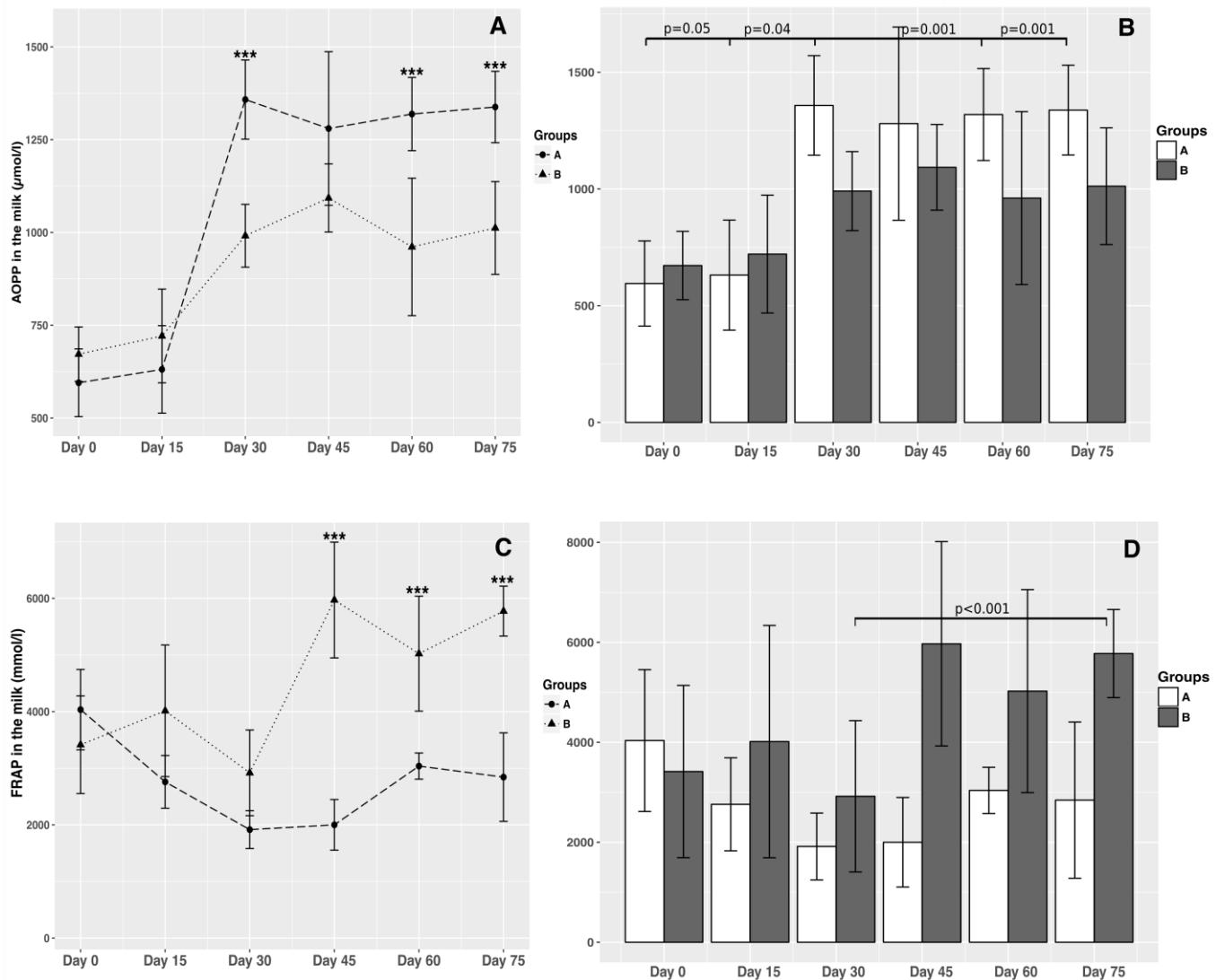
<b>Variable</b>	<b>Day</b>	<b>Mean ± standard deviation</b>		<b>P value</b>
		Group A	Group B	
<b>ROS</b>	0	878.14 (118.65)	716.01 (142.06)	0.09
(UDCF/mg protein)	15	371.73 (172.14)	744.46 (296.34)	0.008*
	30	792.45 (297.73)	771.81 (226.72)	0.87
	45	512.65 (170.16)	212.72 (68.19)	<0.001*
	60	568.78 (301.41)	688.24 (218.57)	0.38
	75	821.51 (114.85)	1114.31 (188.87)	0.002*
<b>TBARS</b>	0	15.93 (2.66)	15.83 (3.28)	0.94
(nmol MDA/mL)	15	15.08 (4.38)	14.57 (3.11)	0.79
	30	12.87 (3.18)	12.11 (1.03)	0.53
	45	13.92 (2.88)	11.10 (0.34)	0.01*
	60	12.37 (1.27)	9.36 (1.98)	0.002*
	75	10.91 (2.16)	5.90 (0.24)	<0.001*

Values of p ≤ 0.05 (\*) represents significant differences between the groups. Note: the group A (control). The group B (supplemented with 3 mmol/Kg of (PhSe)<sub>2</sub>).

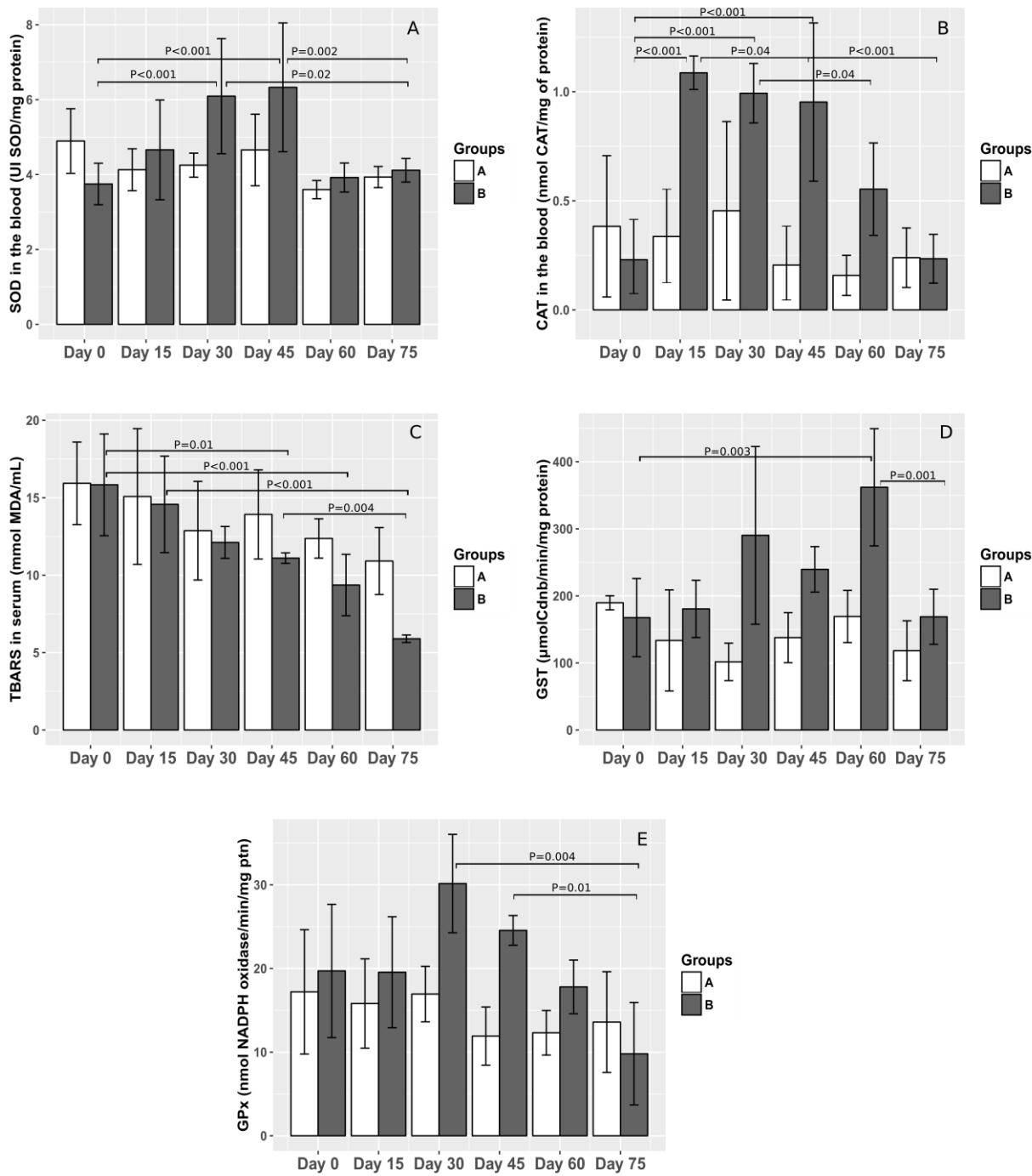
**Table 3:** Superoxide dismutase (SOD -  $U\ SOD/mg\ protein$ ), catalase (CAT -  $nmol\ CAT/mg\ protein$ ), glutathione S-transferase (GST -  $nmol\ Cdnb/h/mg\ protein$ ) and glutathione peroxidase (GPx -  $nmol\ NADPH\ oxidado/h/mg\ protein$ ) activities in blood and serum of dairy sheep in different days post-supplementation.

<b>Variable</b>	<b>Day</b>	<b>Mean ± standard deviation</b>		<b>P value</b>
		Group A	Group B	
<i>SOD</i>	0	3.89 (0.86)	3.75 (0.55)	0.20
	15	4.13 (0.56)	4.66 (1.33)	0.31
	30	4.25 (0.32)	6.09 (1.54)	0.005
	45	4.66 (0.95)	6.33 (1.72)	0.03*
	60	3.60 (0.24)	3.92 (0.39)	0.05*
	75	3.93 (0.28)	4.11 (0.32)	0.24
<i>CAT</i>	0	0.38 (0.32)	0.23 (0.23)	0.26
	15	0.34 (0.39)	1.09 (0.08)	<0.001*
	30	0.45 (0.41)	0.99 (0.14)	0.003*
	45	0.21 (0.27)	0.95 (0.36)	<0.001*
	60	0.16 (0.09)	0.55 (0.21)	0.002*
	75	0.24 (0.14)	0.23 (0.11)	0.94
<i>GST</i>	0	189.73 (10.51)	167.64 (58.29)	0.48
	15	133.59 (75.38)	180.61 (42.64)	0.31
	30	101.66 (27.91)	290.30 (132.48)	0.03*
	45	137.78 (37.26)	239.56 (33.91)	0.006*
	60	169.29 (38.92)	361.94 (87.40)	0.006*
	75	118.29 (44.65)	168.90 (41.05)	0.14
<i>GPx</i>	0	17.20 (7.43)	19.70 (7.96)	0.66
	15	15.81 (5.34)	19.55 (6.63)	0.41
	30	16.94 (3.32)	30.15 (5.88)	0.007*
	45	11.92 (3.48)	24.55 (1.77)	<0.001*
	60	12.31 (2.67)	17.80 (3.20)	0.03*
	75	13.59 (6.02)	9.81 (6.13)	0.41

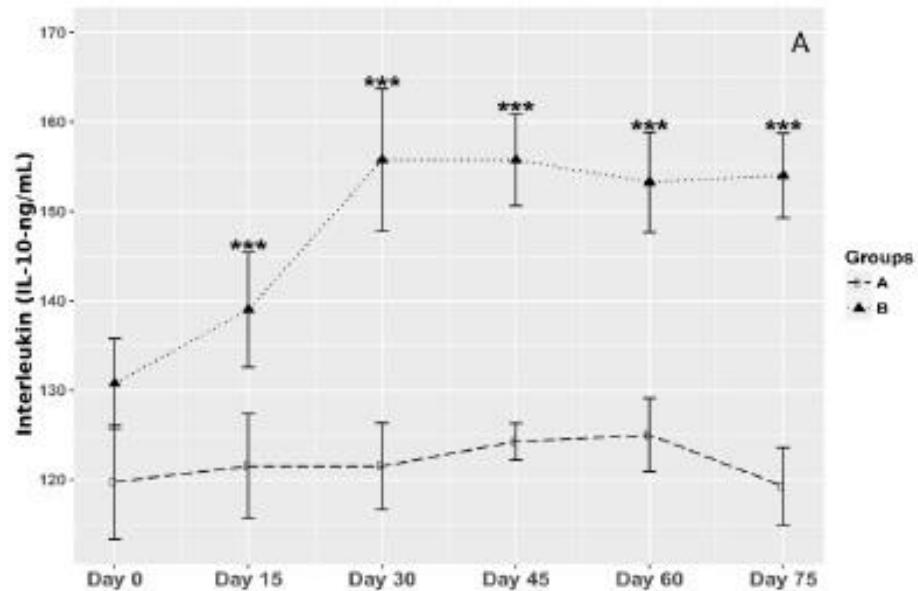
| Values of  $p \leq 0.05$  (\*) represents significant differences between the groups.



**Figure 1:** Levels of advanced oxidation protein products (AOPP) [A and B] and ferric reducing ability of plasma (FRAP) [C and D] in sheep supplemented with 3  $\mu\text{mol}/\text{Kg}$  of  $(\text{PhSe})_2$ .



**Figure 2:** Superoxide dismutase (SOD) [A] and catalase (CAT) [B] activities, thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) levels [C], glutathione S-transferase (GST) [D] and glutathione peroxidase (GPx) [E] activities of dairy sheep in different days post-supplementation with  $(\text{PhSe})_2$ .



**Figure 3:** Seric interleukin-10 (IL-10) levels of the control group (A) and the supplemented group (B) throughout the study (Figure A).

## MANUSCRITO II

### **Injectable diphenyl diselenide supplementation in dairy sheep**

### **Suplemento de difenil diselenuro inyectable en ovejas lecheras**

### **Injectable (PhSe)<sub>2</sub> supplementation in sheep**

Angeliza H. Biazus,<sup>1</sup> M.Sc, Chrystian J Cazarotto<sup>1</sup> M.Sc, Roger R Gebert<sup>1</sup> M.Sc, João H. dos Reis<sup>1</sup> M.Sc, Talyta Zortea<sup>1</sup> M.Sc, Dilmar Baretta<sup>1</sup> Ph.D, Gustavo Machado<sup>2</sup> Ph.D, Matheus D. Baldissera,<sup>3</sup> PhD, Aleksandro S da Silva<sup>1\*</sup> PhD

<sup>1</sup>Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, Santa Catarina (SC), Brazil.

<sup>2</sup>University of Minnesota, Sait Paul, MN, United States of America. <sup>3</sup>UFSM, Department of Microbiology and Parasitology, Santa Maria, RS, Brazil. Correspondence: [aleksandro\\_ss@yahoo.com.br](mailto:aleksandro_ss@yahoo.com.br); Tel. 55 49 3330-9432.

### **ABSTRACT**

**Objective.** The aim of this study was to evaluate the influence of subcutaneous supplementation with diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> in dairy sheep infected with gastrointestinal nematodes on animal health and possible damage to environment when the feces of these animals will be used for fertilizing. **Material and methods.** The experiment was performed using 16 primipara dairy sheep, that were divided into two groups: the group A as control and the group B supplemented with (PhSe)<sub>2</sub> subcutaneously. Blood samples were used to determine the hepatic function, as well as the protein and lipid metabolism in animals. Feces were used to determine the number of

helminths eggs per gram of feces (EPG), as well as used for ecotoxicology tests. **Results.** The  $(\text{PhSe})_2$  supplementation not affected the helminths reproduction, since the EPG did not differ ( $p>0.05$ ) between groups. Total protein and globulin levels increase ( $p<0.05$ ) in supplemented animals, while the seric alanine aminotransferase (ALT) levels decrease ( $p<0.05$ ) in the end of experimental design. Cholesterol levels increase ( $p<0.05$ ) in the supplemented animals, while triglycerides, albumin and urea not differ between groups ( $p>0.05$ ). The feces of supplemented sheep not interfered the springtails reproduction. **Conclusions.** At the administered dose, the  $(\text{PhSe})_2$  is not able to control the parasitism, however, it did increase the globulins and cholesterol levels, that are important to immune response and for sheep reproduction, respectively. Also, the feces of supplemented animals with  $(\text{PhSe})_2$  can be used as organic fertilizing, without negative impacts to environment.

**Keywords:**  $(\text{PhSe})_2$ , sheep, helminths, springtails. (Source: CAB, MeSH).

## RESUMEN

**Objetivo.** El objetivo de este estudio fue evaluar la influencia de la suplementación subcutánea con diselenuro de difenilo  $(\text{PhSe})_2$  en ovejas lecheras infectadas espontáneamente con nematodos sobre la salud animal y posible daño al medio ambiente cuando las heces de estos animales se utilizarán para fertilizar. **Material y métodos.** El experimento se realizó utilizando 16 ovejas lecheras primiparas, que se dividieron en dos grupos: el grupo A se usó como control y el grupo B se suplementó con  $(\text{PhSe})_2$  vía subcutánea. Se utilizaron muestras de sangre para determinar la función hepática, así como el metabolismo de proteínas y lípidos en las ovejas. Las heces se utilizaron para determinar el número de huevos por gramo de heces (EPG), así como para las pruebas de ecotoxicología. **Resultados.** La suplementación  $(\text{PhSe})_2$  no afectó la reproducción de helmintos. Los niveles totales de proteína y globulina aumentan ( $p<0,05$ ) en los animales suplementados, mientras que los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT) disminuyeron ( $p<0,05$ ) al final del diseño experimental. Los niveles de colesterol aumentaran ( $p<0,05$ ) en los animales suplementados, mientras que los triglicéridos, la albúmina y la urea no difirieron entre los grupos ( $p>0,05$ ). Las heces de ovejas suplementadas no interferiran en la reproducción de los colémbolos. **Conclusiones.** A la dosis administrada, el  $(\text{PhSe})_2$  no es capaz de controlar el

parasitismo, sin embargo, aumenta los niveles de globulinas y colesterol, que son importantes para la respuesta inmune y para la reproducción, respectivamente. Las heces de animales suplementados pueden usarse como fertilizantes orgánicos, sin impactos negativos en el ambiente.

**Palabras clave:** Colémbolos, helmintos, ovejas, (PhSe)<sub>2</sub>.

## INTRODUCTION

In dairy sheep industry, females in the post-partum period are susceptible to metabolic disorders in consequence to major nutritional requirements, being that this period is particularly important to animal health and consequent female performance due physiologic changes and metabolic stress (1). In attempt to improve the performance and recuperation, the animal supplementation is an interesting approach. The vitamins and mineral, such as selenium, an micromineral with antioxidant properties (2,3), that is able to protects the cell membranes against oxidative degeneration (4), as well as your participation in the composition of glutathione enzymes, a potent antioxidant enzyme (5). Therefore, the selenium is also considered an important stimulant for immunology system, influencing the expression of non-specific, humoral and cellular response (2-5).

Many studies have demonstrated that sodium selenite supplementation possesses beneficial effects for sheep (6-8), however, is important the search for alternative sources of selenium. In this sense, the diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub>, an organic compound with anti-inflammatory, neuroprotective and antioxidant properties (9), may be considered an important source for sheep health improvement. Experimental studies demonstrating the beneficial effects of (PhSe)<sub>2</sub> in rats and fish as experimental model, but was not been evaluated in sheep yet. Based on the effects of (PhSe)<sub>2</sub> in the animal metabolism, is possible suggest that the supplementation with (PhSe)<sub>2</sub> may exerts beneficial properties, such as decrease of oxidant compounds associated with increase of antioxidant compounds in the blood, as well as the improve of immune system, and consequently control de parasitism, such as observed in infected lambs with *Haemonchus contortus* supplemented with sodium selenite (10). Similarly, the injectable administration of sodium

selenite and  $(\text{PhSe})_2$  in mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii* (11) was able to stimulate the inflammatory response, and consequently increase animal longevity.

The feces of production animals are commonly used as fertilizing in pastures (12). Based in this information, arise the interest whether feces of supplemented animals with  $(\text{PhSe})_2$  can be used as fertilizing without consequences for the environment, since several studies demonstrated the negative impact of feces of animals with residues of additives and veterinary drugs for soil microflora (13,14). It is important emphasize that studies demonstrating the use of  $(\text{PhSe})_2$  in the livestock are recent, being necessary progress in this lines of research. Therefore, the aim of this study was to evaluate whether subcutaneously  $(\text{PhSe})_2$  supplementation can control the sheep parasitic infection during the lactation period, as well as be exerts beneficial properties for animal health. Moreover, a second objective was verifying whether feces of supplemented sheep with  $(\text{PhSe})_2$  can be used as organic fertilizing without negative impacts for soil biomass/diversity.

## MATERIALS AND METHODS

**Local and animals:** The experiment was performed in a rural property involved in sheep farming, localized in Chapecó (west of Santa Catarina state, southern of Brazil – Latitude: 27° 05'47"S; Longitude: 52° 37'06"W). For this study, sixteen primipara newly calved sheep Lacaune race, with similar age, weight and milk production were used as experimental model. The animals were divided in two groups (A and B), with eight animals each. The group A was used as control (non-supplemented), that received via subcutaneously dimethyl sulfoxide (DMSO) at dose of 1,5 mL (used to dilute the  $(\text{PhSe})_2$ ). The group B was composed by supplemented sheep with  $(\text{PhSe})_2$  subcutaneously at 1,5 mL, corresponding at dose of 3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , that was applied on days 0, 7, 15, 30 and 45 of experiment. The diet was provided to both groups in two periods (7:00 a.m and 5:00 p.m), and was constituted by corn silage, cynodon hay and concentrated (ground corn, soybean meal, vitamin and mineral core, calcite limestone and nonensin). Water was provided *ad libitum*. All animals were contained in the same bay ( $24 \text{ m}^2$ ), with beaten floor and bed with wood shavings.

**Sample collection.** At intervals of 15 days, the total blood was collected by jugular tail using vacuolated tubes without anticoagulant (days 0, 15, 30, 45, 60 and 75). The samples were centrifuged at 8000 rpm during 10 min to obtain serum that was stored at -20 ° C until biochemical analysis. The feces samples were collected at same experimental period of blood samples, i.e., on days: 0, 15, 30, 45, 60 and 75, to perform the parasitological exam described below. A sample of feces from each animal was collected on day 35, and the feces of each group was homogenized to assessment the ecotoxicological tests.

**Biochemical analyses.** Seric levels of alanine aminotransferase (ALT), total protein, albumin, triglycerides, cholesterol and urea were performed using a semi-automatized analyzer (BioPlus-2000®) and commercial kits (Analisa®). Globulin values were obtained between total protein and albumin levels.

**Coproparasitological analyses.** The feces samples were used for gastrointestinal nematodes eggs search using the modified McMaster technique (15) using sucrose solution as flotation fluid for determination the quantity of eggs per gram of feces (EPG). The coproculture was performed to verify the helminths involved in the infection.

**Ecotoxicological test.** The feces homogenized of each group collected on day 35 were used in the ecotoxicological test to evaluate the springtails reproduction (*Folsomia candida*). The test was conducted based in the protocol ISO 11267 and as concluded after 28 days (16), with experimental design totally randomized and with 4 replicas. Each replica consisted of plastic container (capacity for 140 mL), filled with 30 grams of soil containing 0, 2, 4, 8 and 16 tons of feces/hectare. In each container were added 10 springtails (*F. candida*) with age synchronized of 10-12 days (after hatching). On day 14, the springtails were feed with biological ferment (*Saccharomyces cerevisiae*), and were opened to aeration and water supply weekly. On day 28, the soil of each replica was transferred for another container with major volumetric capacity, that was added water and some drops of black ballpoint ink. After light agitation with glass cane, the numbers of live springtails were counted in the water superficies. Photographs of container were performed to posteriorly count of juveniles of springtails using the software ImageTool (ImageTool 3.0, The University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX).

**Statistical analyses.** The data from the dairy sheep of ALT, triglyceride, total protein, cholesterol, albumin, urea, globulin, OPG, were first analyzed by descriptive statistics for contingency of the information and for further assumptions and what is presented as descriptive is the mean and standard deviation. The data were tested for normality of variance by Kolmogorov-Smirnov test, skewness and homogeneity by *Levene's* test previously to ANOVA analysis. A one-way ANOVA for repeated measurements to test was used to evaluate the influence of time (an error term was added to accommodate dependence of subjects {sheep that were resampled), where necessary (statistic difference were found), test was used since it controls the family-wise Type I error rate, by adjusting the observed significance level to the number of multiple comparisons. Secondly, one-way ANOVA was used to analyze all significant parameters that had shown significant difference over time on the repeated measure analysis, mean comparison between groups on each time period were tested (day 0, day 15, day 30, day 45, day 60 and day 75). It was considered significantly different when  $P<0.05$ . The whole statistical process was carried out with R-language, v.3.3.0 (17). For the reproduction test with *F. candida*, the results were submitted to one-way ANOVA followed by Dunnett *post hoc* test ( $P<0.05$ ), using the software Statistica v 7.0.

## RESULTS

The results regarding seric biochemical analysis were showed in Tables 1 and 2. Seric ALT reduced significantly on days 60 and 75 in supplemented dairy sheep with  $(\text{PhSe})_2$ , while cholesterol levels increased significantly on days 30, 60 e 75, as well as a tendency to increase was observed on day 45. Moreover, an increase of total protein and globulins levels in serum were observed in the supplemented dairy sheep on days 60 and 75 compared to control group. No difference was observed between groups regarding seric levels of triglycerides, albumin and urea.

No difference was observed between groups regarding the number of helminths eggs per gram of feces (EPG) during the experiment (Table 3). The coproculture revealed that eggs counted in the EPG corresponded to the *Haemonchus* spp. and *Trichostrongylus* spp.

The number of young springtails did not differ between groups (Figure 1). Therefore, the feces of supplemented dairy sheeps with  $(\text{PhSe})_2$  via injectable not interfere in the springtails reproduction.

## DISCUSSION

The antioxidant action of selenium is well established, since the mineral protects the cells against deleterious effects and aggressive agents (18,19). This action can be proven by result of serum ALT activity, that is considered an important biomarker of hepatic function. ALT activity reduced in the supplemented sheep with  $(\text{PhSe})_2$ , that can be considered a protective effect of this selenium form in the liver of sheep during the lactation period. This enzyme is released in the blood after hepatic injury, which can occur during the lactation period of sheep, due the major metabolic requirement and oxidative stress (20). Besides the protective effect of selenium, is important emphasize that supplementation with five doses of  $(\text{PhSe})_2$  was not toxic to animals.

Triglycerides, albumin and urea levels did not differ between groups, i.e., the  $(\text{PhSe})_2$  no exerts effects in the metabolism or synthesis of these variables. The increase of cholesterol levels can be beneficial for animals, since a positive correlation between increase of cholesterol and progesterone in sheep reflects in a better reproductive performance (21). The augmentation on total protein levels is directly linked to increase of globulins levels in the supplemented animals with  $(\text{PhSe})_2$  after 60 days of experiment. This result can be explained by selenium capacity to protect the structure and protein function against oxidation (22), maintaining the protein viability and integrity. Also, the  $(\text{PhSe})_2$  can exerts a directly or indirectly effects on cells involved in the immune response, since selenium acts a modulator of immunology system (4,5).

The helminths oviposition was not affected by  $(\text{PhSe})_2$  supplementation. We expected an indirectly action of selenium, i.e., the  $(\text{PhSe})_2$  supplementation would stimulate a response against gastrointestinal helminths, and consequently would reduce the parasitic infection and oviposition. This could occurred because selenium acts in the expression of L-selectin and interleukin-8R genes, and in the TLR-4 neutrophils receptor in sheep, that are involved in the recognition and response to bacterial and parasitic pathogens (23).

Ecotoxicological test is very important to verify the homeostasis between production and environment, since this test evaluate whether residues of chemicals would cause impact on soil microfauna. In this study, the residues of  $(\text{PhSe})_2$ , or its metabolites, did not affected the springtails reproduction. The quantification of springtails is the initial point to understanding the ecological processes of nutrient cycling, because they are considered indicators of anthropogenic interventions and soil quality (24). Recently, research to evaluate the effects of pig manure, from diets incorporating veterinary pharmaceuticals, on survival and reproduction of *F. candida* observed that application of these residues should be regulated not only using a volume-based criterion, but should incorporate data on soil properties (25). Thus, we believe that test for new supplements can be accomplished with an ecotoxicological assessment, seeking environmental safety.

The protocol with  $(\text{PhSe})_2$  at administered dose was not able to control the parasitic infection or reduce the helminths oviposition, although has been observed an increase in globulin levels, a fraction of protein composed by immunoglobulins and inflammatory protein of acute phase. The increase of cholesterol levels in the supplemented dairy sheep with  $(\text{PhSe})_2$  may have been a beneficial effect, since cholesterol is a cofactor for progesterone synthesis, hormone directly linked with better reproductive performance. Moreover, the feces of supplemented animals with  $(\text{PhSe})_2$  can be used for organic fertilizing without significant negative impacts to soil springtails fauna, an important marker of soil quality and environmental contamination.

## **ETHICS COMMITTEE**

This project was approved by ethics committee for animal experimentation of Universidade do Estado de Santa Catarina (CETEA/UDESC), under protocol number 5446050216.

## **REFERENCES**

1. Caroprese M, Albenzio M, Annicchiarico G, Sevi A. Changes occurring in immune responsiveness of single and twin-bearing Comisana Ewes durin the transition period. J Dairy Sci 2006; 89(2):562-568.

2. Underwood EJ, Suttle NF. The Mineral Nutrition of Livestock. Wallingford: CABI 1999, 3:614.
3. Battin, EE, Perron NR, Brumaghim JL. The central role of metal coordination in selenium antioxidant activity. Inorg Chem 2006; 45(2):499–501.
4. McDowell LR, Williams SN, Hidiroglou N, Njeru CA, Hill GM, Ochoa L, Wilkinson NS. Vitamin E and selenium supplementation for the ruminant. Anim Feed Sci Technol 1996; 60(3-4):273–296.
5. Riaz M, Mehmood KT. Selenium in human health and disease: A Review. J Postgrad Med Inst 2012; 26(2): 120–133.
6. Sadeghian S, Kojouri GA, Mohebb A. Nanoparticles of Selenium as Species with Stronger Physiological Effects in Sheep in Comparison with Sodium Selenite. Biol Trace Elem Res 2012; 146(3):302–308.
7. Kamdev S, Dass RS, Garg AK, Sahu S, Gogoi S. Effect of different selenium sources (Selenium yeast and Sodium selenite) on haematology, blood chemistry and thyroid hormones in male goats (*Capra hircus*). Indian J Anim Res 2015; 49(6):788–792.
8. Faixová Z, Piešová E, Maková Z, Cobanová K, Faix S. Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on ruminal enzyme activities and blood chemistry in sheep. Acta Vet Brno 2016; 85(2):185–194.
9. Freitas AS, Prestes AS, Wagner C, Sudati JH, Alves D, Porciúncula LO, Kade IJ, Rocha JBT. Reduction of diphenyl diselenide and analogs by mammalian thioredoxin reductase is

independent of their glutathione peroxidase-like activity: a possible novel pathway for their antioxidant activity. Molec 2010; 15(11):7699–7714.

10. Nicolodi PRSJ, Camargo EV, Zeni D, Rocha RX, Cyrillo FC, Souza FN, Della Libera AMM, Bondan C, Leal MLR. Perfil proteico e metabolismo oxidativo de cordeiros experimentalmente infectados pelo *Haemonchus contortus* e suplementados com selênio e vitamina E. Cienc Rural 2010; 40(3):561–567.
11. Barbosa CF, Tonin AA, Da Silva AS, Azevedo MI, Monteiro DU, Waczuk EP, Duarte T, Hermes C, Camillo G, Vogel FF, Faccio L, Tonin PT, Wolkmer P, Leal MR, Duarte MMF, Moresco RN, Lopes STA, De La Rue ML. Diphenyl diselenide and sodium selenite associated with chemotherapy in experimental toxoplasmosis: influence on oxidant/antioxidant biomarkers and cytokine modulation. Parasitol 2014; 141(13):1761–1768.
12. Azizi P. Characterization of Humic Fertilizers from Horse, Sheep and Cattle Dung by their Density. Asian J Chem 2007; 19(5):3677–3680.
13. Gil-Díaz MDM, Perez-Sanz A, Martín M, Lobo MC. Potential diffusion of doramectin into a soil amended with female pig manure. A Field Experiment. J Agric Food Chem 2011; 59(19):10635–10640.
14. Zhao Z, Zhang Y, Xuan Y, Song W, Si W, Zhao Z, Rao Q. Ion-exchange solid-phase extraction combined with liquidchromatography-tandem mass spectrometry for the determination of veterinary drugs in organic fertilizers. J Chromat 2016; 1022(1):281–289.
15. Gordon HM, Whitlock HV. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. J Counc Sci Ind Res 1939; 12(1):50–52.

16. ISO 11267. Soil Quality – Inhibition of Reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by Soil Pollutants. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 1999.
17. R-Core-Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013.
18. Cemek M, Büyükbelen A, Büyükkokuroglu ME, Aymelet F, Tür L. Protective roles of vitamin E (-tocopherol), selenium and vitamin E plus selenium in organophosphate toxicity in vivo: a comparative study. Pest Biochem Physiol 2010; 96(3):113–118.
19. El-Demerdash FM. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. J Trace Elem Med Biol 2004; 18(1):113–122.
20. Piccione G, Casella S, Assenza A, Fazio F, Caola G. Evaluation of serum homocysteine and oxidative stress during lactation in ewes. Czech J Anim Sci 2008; 53:462–465.
21. Bianchi AE, Macedo VP, França RT, Lopes STA, Lopes LS, Stefani LM, Volpato A, Lima HL, Paiano D, Machado G, Da Silva AS. Effect of adding palm oil to the diet of dairy sheep on milk production and composition, function of liver and kidney, and the concentration of cholesterol, triglycerides and progesterone in blood serum. Small Rum Res 2014; 117: 78–83.
22. Reddy KP, Sailaja G, Krishnaiah C. Protective effects of selenium on fluoride induced alterations in certain enzymes in brain of mice. J Environ Biol 2009; 30(5):859–64.
23. Hugejiletu H, Bobe G, Vorachek WR, Gorman ME, Mosher WD, Pirelli GJ, Hall JA. Selenium supplementation alters gene expression profiles associated with innate immunity in whole-blood neutrophils of sheep. Biol Trace Elel Res 2013; 154(1):28–44.

24. Cutz-Pool LQ, Palacios-Vargas JG, Castañomeneses G, García-Calderón, NE. Edaphic Collembola from two agroecosystems with contrasting irrigation type in Hidalgo State, México. *Appl Soil Ecol* 2007; 36(1):46–52.
25. Maccari AP, Baretta D, Paiano D, Leston S, Freitas A, Ramos F, Sousa JP, Klauberg-Filho O. Ecotoxicological effects of pig manure on *Folsomia candida* in subtropical Brazilian soils. *J Hazardous Materials* 2016; 314:113–120.

**Table 1:** Mean and standard deviation of seric alanine aminotransferase (ALT) activity, seric levels of triglycerides and cholesterol in supplemented sheep with diphenyl diselenide (group B) at different days of experiment compared control group (group A).

<b>Variable</b>	<b>Day</b>	<b>Mean ± standard deviation</b>		
		Group A	Group B	<b>P value</b>
<b>ALT</b> <i>(U/L)</i>	0	17.50 (2.98)	17.12 (3.60)	0.13
	15	17.75 (4.59)	18.50 (6.05)	0.78
	30	16.75 (2.96)	15.12 (2.80)	0.27
	45	16.50 (5.13)	14.50 (4.38)	0.41
	60	18.25 (3.85)	13.12 (4.52)	0.05*
	75	17.50 (4.96)	12.50 (3.25)	0.03*
<b>Triglyceride</b> <i>(mg/dL)</i>	0	22.57 (6.73)	23.71 (8.56)	0.78
	15	18.50 (4.72)	17.00 (3.74)	0.49
	30	23.07 (16.05)	24.62 (8.09)	0.81
	45	16.75 (4.68)	18.75 (7.13)	0.51
	60	13.12 (5.57)	17.50 (6.63)	0.17
	75	40.62 (4.41)	40.50 (4.31)	0.95
<b>Cholesterol</b> <i>(mg/dL)</i>	0	51.38 (7.80)	49.75 (6.73)	0.66
	15	62.12 (12.54)	65.38 (10.42)	0.58
	30	59.25 (11.84)	71.38 (8.23)	0.05*
	45	66.38 (11.96)	74.88 (7.73)	0.056
	60	68.88 (11.46)	95.00 (15.93)	0.011*
	75	71.88 (9.66)	83.00 (9.85)	0.027*

\* Significant difference between groups

**Table 2:** Mean and standard deviation of seric levels of total protein, albumin, globulin and urea in supplemented sheep with diphenyl diselenide (group B) at different days of experiment compared control group (group A).

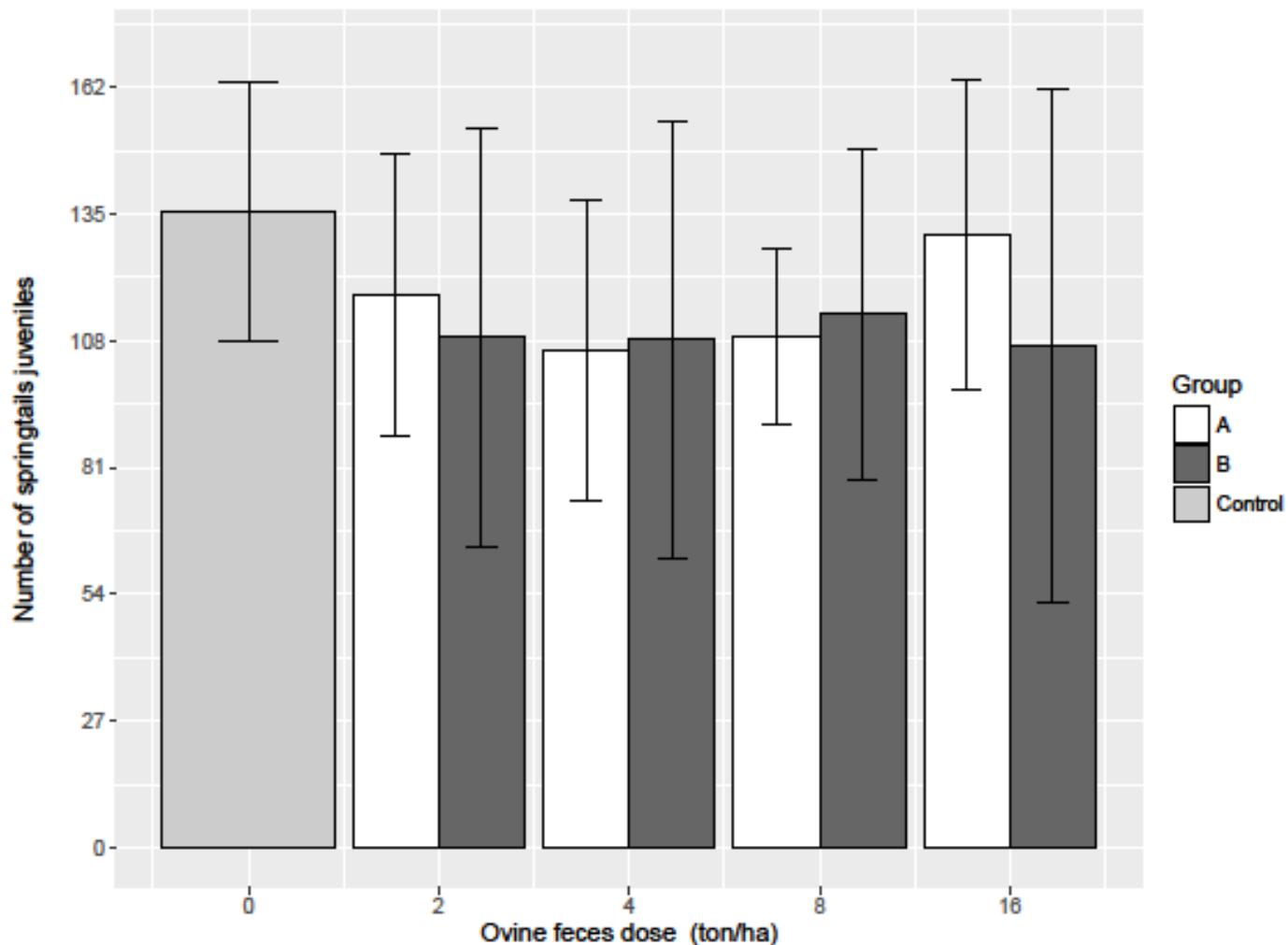
<b>Variable</b>	<b>Day</b>	<b>Mean ± standard deviation</b>		<b>P value</b>
		<b>Group A</b>	<b>Group B</b>	
<b>Total protein</b> (g/dL)	0	6.38 (0.79)	6.86 (0.87)	0.26
	15	5.95 (0.80)	6.36 (0.92)	0.35
	30	6.40 (0.55)	6.33 (1.27)	0.88
	45	5.59 (0.29)	5.69 (0.61)	0.67
	60	6.88 (0.91)	8.65 (0.55)	0.003*
	75	6.90 (1.06)	7.74 (0.95)	0.052
<b>Albumin</b> (g/dL)	0	3.08 (0.42)	3.04 (0.46)	0.86
	15	2.35 (0.75)	2.35 (0.93)	0.10
	30	2.60 (0.55)	2.89 (0.55)	0.31
	45	2.95 (0.24)	2.89 (0.59)	0.78
	60	2.76 (0.45)	3.26 (0.53)	0.06
	75	2.98 (0.53)	2.86 (0.2)	0.59
<b>Globulin</b> (g/dL)	0	3.30 (0.83)	3.83 (0.86)	0.23
	15	3.60 (0.90)	4.01 (1.43)	0.50
	30	3.80 (0.67)	3.44 (1.17)	0.45
	45	2.64 (0.29)	2.80 (0.45)	0.40
	60	4.11 (1.05)	5.39 (0.8)	0.01*
	75	4.01 (0.85)	4.88 (0.94)	0.08
<b>Urea</b> (mg/dL)	0	39.00 (8.04)	33.75 (6.71)	0.09
	15	33.12 (7.94)	33.12 (5.41)	0.10
	30	34.50 (10.14)	42.12 (9.28)	0.13
	45	40.88 (5.00)	43.50 (6.21)	0.36
	60	75.62 (11.17)	67.12 (19.48)	0.30
	75	45.38 (6.23)	46.38 (8.25)	0.78

\* Significant difference between groups

**Table 3:** Number of eggs per gram of feces (EPG) of supplemented dairy sheep with diphenyl diselenide (group B) in different days of experiment compared control group (group A).

<b>Variable</b>	<b>Day</b>	<b>Mean ± standard deviation</b>		<b>P value</b>
		Group A	Group B	
<b>EPG</b>	0	1512.50 (1318.48)	1237.50 (1101.87)	0.65
	15	1975.00 (1587.23)	1800.00 (1918.33)	0.84
	30	1425.00 (1525.73)	1612.50 (1776.38)	0.82
	45	1975.00 (2210.20)	2600.00 (2394.64)	0.59
	60	2412.50 (3711.16)	2112.50 (1679.66)	0.83
	75	425.00 (365.47)	500.00 (667.62)	0.78

Note: There was no significant difference between groups.



**Figure 1:** Number of juveniles forms of springtails submitted with organic fertilizing with ovine feces at doses of 2, 4, 8 and 16 ton per hectare ( $t\ ha^{-1}$ ). A pool of feces was used of each group. Note: No difference was observed between groups in the tested doses. Group A – Control; and Group B - supplemented dairy sheep with diphenyl diselenide.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Infinitos são os desafios enfrentados pela indústria do leite ovino no Brasil e de maneira especial, em Santa Catarina. Além da busca por mercado e pela apresentação de produtos que sejam atrativos aos consumidores, é necessário investir conhecimento na produção de alimentos que forneçam benefícios à saúde de quem os utiliza e ainda promover melhorias na saúde dos animais produtores.

As fêmeas ovinas em fase de lactação são, neste caso, as que merecem maior atenção e os estudos devem ser intensificados visando buscar maior produção com maior qualidade. A modulação dietética ainda é a ferramenta mais eficaz para estimular essas características nos animais e o uso de suplementos vem de encontro a esse pensamento. Minerais, especialmente o selênio, são exemplos de como é possível realizar alterações satisfatórias num produto, através da modulação do metabolismo do animal produtor.

A forma orgânica do selênio, o disseleneto de difenila, além de permitir que o mineral seja melhor biodisponibilizado ao animal, vai exacerbar as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do mesmo, propiciando recuperação eficaz das fêmeas ovinas após o parto e permitindo que o composto aja também no leite, alterando os níveis de antioxidantes e podendo causar um aumento do tempo de prateleira dos derivados.

Ainda há muito a ser descoberto sobre as propriedades do  $(PhSe)_2$ , muitas informações podem ser acrescentadas à futuros trabalhos, incluindo mecanismos de absorção, metabolismo e excreção desse composto. Descobertas satisfatórias foram feitas ao utilizarmos esse mineral na forma orgânica em ovinos leiteiros. Através desse trabalho foi possível comprovar a modulação do sistema antioxidante dos animais e a melhora da qualidade do leite produzido por eles. Também verificamos que o uso do disseleneto não é nocivo à fauna edáfica, permitindo que ele seja usado de maneira segura.

## REFERÊNCIAS

- ACCINELLI, C., KOSKINEN, W.C., BECKER, J.M., SADWSKY, M.J. Environmental fate of two sulfonamide antimicrobial agents in soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.2677–2682, 2007.
- AMARANTE, A.F.T., CRAIG, T.M., RAMSEY, W.S., SAYED, N. M. E., DESOUKI, A.Y., BAZER, F.W. Comparasion of naturally acquired parasite burdens among Florida Native. Rambouillet and crossbred ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 85, p. 61-69, 1999.
- ASSENAT, L. Leche de oveja. In: LUCHET, F.M. Leche y productos lácteos: vaca, oveja e cabra. Zaragoza: **Acribia**, p. 277-32, 1991.
- AZIZI, P. Characterization of Humic Fertilizers from Horse, Sheep and Cattle Dung by their Density. **Asian Journal of Chemistry**, v.19, n. 5, 3677-3680, 2007.
- BEATTY, D.T., BARNES, A., TAYLOR, E., PETHICK, D., MCCARTHY, M.AND MALONEY, S.K. Physiological response of Bos taurus and Bos indicus cattle to prolonged, continuous heat and humidity. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 972–985, 2006.
- BELLINGER, P.F., CHRISTIANSEN, K.A, JANSSENS, F. Checklist of the Collembola of the world. Disponível em: <<http://www.collembola.org>>. Acesso em: 15 fev. de 2017.
- BENCINI, R., PULINA, G. The quality of sheep milk: a review. **Wool Technology and Sheep Breeding**, v.45, p.182-220, 1997.
- BENCINI, R., PURVIS, I.W. The yield and composition of milk from Merino sheep. **Proceedings of the Australian Society of Animal Production**, Sydney. v.18, p.144-147, 1990.
- BERNABUCCI, U., RONCHI, B., LACETERA, N., NARDONE, A. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2173-2179, 2002.
- BIANCHI, M.L.P., ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, p123-130, 1999.
- BOUWSTRA, R. J. et al. Vitamin E supplementation during the dry period in dairy cattle. Part II: Oxidative stress following vitamin E supplementation may increase clinical mastitis incidence postpartum. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 12, p. 5696-5706, 2010.
- BOXALL, A.B.A., FOGG, L.A., BLACKWELL, P.A., KAY, P., PEMBERTON, E. J., CROXFORD, A. Veterinary medicines in the environment. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.180, p. 1–91, 2004.
- BROZOS, C., MAVROGIANNI, V.S., FTHENAKIS, G.C., Treatment and control of peri-parturient metabolic diseases: pregnancy toxemia, hypocalcemia, hypomagnesemia. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 27, p. 105-113, 2011.
- BUTLER, S.T., MARR, A.L., PELTON, S.H., RADCLIFF, R.P., LUCY, M.C., BUTLER, W.R. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. **Journal of Endocrinology**, v.176, p.205–217, 2003.

CALVO, L., TOLDRÁ, F., RODRÍGUEZ, A. I., LÓPEZ-BOTE, C., REY, A. I. Effect of dietary selenium source (organic vs. mineral) and muscle pH on meat quality characteristics of pigs. **Food Science & Nutrition**, v.5, n.1, p.94-102, 2017.

CAMARGO, E. Atividade de neutrófilos e estresse oxidativo em cordeiros infectados experimentalmente com *Haemonchus contortus* e suplementados com selênio e vitamina E. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, 2009.

CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. S. da; CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. CELI, P. The role of oxidative stress in small ruminants health and production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 348-363, jul. 2010.

CHARLES, T.P., POMPEU, J., MIRANDA, D.B. Efficacy of three broad-spectrum anthelmintics against gastrointestinal nematode infections of goats. **Veterinary Parasitology**, v.34, p.71-75, 1989.

CHAUVAT, M., ZAITSEV, A.S., WOLTERS, V. Successional changes of Collembola and soil microbiota during forest rotation. **Oecologia**, v.137, p.269-276, 2003.

CHURCH, D.C. Livestock Feeds and Feeding. **Prentice Hall**, New Jersey, p.164, 1991.

COMINETTI, C., COZZOLINO, S.M.F. Funções plenamente reconhecidas de nutrientes: selênio. São Paulo: ILSI Brasil; 2009.

COSTA, A.J., OLIVEIRA, G.P., ARANTE, P.T., BORGES, F.A., MENDONCA, R.P., SANTANA, L.F., SAKAMOTO, C.A.M. Avaliação comparativa da ação antihelmíntica e do desenvolvimento ponderal de bezerros tratados com diferentes avermectinas de longa ação. **A Hora Veterinária**, v. 24, n. 139, p. 31-34, 2004.

CROOK, E.K., O'BRIENA, D.J., HOWELL, S.B., STOREY, B.E., WHITLEY, N.C., BURKED, J.M., KAPLANB, R.M. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the mid-Atlantic region and comparison of in vivo and in vitro detection methods. **Small Ruminant Research**, v.143, p. 89–96, 2016.

CULIK, M.P.; SOUSA, J.L. & VENTURA, J.A. Biodiversity of Collembola in tropical agricultural environments of Espírito Santo, Brasil. **Applied Soil Ecology**, v.21, p.49-58, 2002.

CUTZ-POOL, L.Q., PALACIOS-VARGAS, J.G., CASTAÑOMENESES, G., GARCÍA-CALDERÓN, N.E. Edaphic Collembola from two agroecosystems with contrasting irrigation type in Hidalgo State, México. **Applied Soil Ecology**, v.36, p.46-52, 2007.

DA ROCHA, J.T., TRAPANI, L., SEGATTO, M., LA ROSA, P., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., PALLOTTINI, V., Molecular effects of diphenyl diselenide on cholesterol and glucose cell metabolism, **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, 2013.

DE BEM, A.F., FARINA, M., PORTELLA RDE, L., NOGUEIRA, C.W., DINIS, T.C., LARANJINHA, J.A., ALMEIDA, L.M., ROCHA, J.B. Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro. **Atherosclerosis**, v.201, p.92-100, 2008.

DE BEM, A.F., PORTELLA RDE, L., COLPO, E., DUARTE, M.M., FREDIANE, A., TAUBE, P.S., NOGUEIRA, C.W., FARINA, M., DA SILVA, E.L., TEIXEIRA ROCHA, J.B.

Diphenyl diselenide decreases serum levels of total cholesterol and tissue oxidative stress in cholesterol-fed rabbits, **Basic e Clinical Pharmacology Toxicology**, v.105, p.17-23, 2009.

DE FREITAS, A.S., FUNCK, V.R., DOS SANTOS ROTTA, M., BOHRER, D., MÖRSCHBÄCHER, V., PUNTEL, R.L., ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. **Brain Research Bulletin**, v.79, n.1, p.77-84, 2009.

DE MENEZES C.C., LEITEMPERGER J., SANTI, A., LOPES, T., VEIVERBERG C.A., PEIXOTO, S., ADAIME, M.B., ZANELLA, R., BARBOSA, N.B.V, LORO, V.L.. The effects of diphenyl diselenide on oxidative stress biomarkers in Cyprinus carpio exposed to herbicide quinclorac (Facet®). **Ecotoxicology and environmental safety**, v.81, p.91-97, 2012.

DOBSON, H., SMITH, R., ROYAL, M., KNIGHT, C., SHELDON, I. The highproducing dairy cow and its reproductive performance. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.17-23, 2007.

Doenças Parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle. Brasília: EMBRAPA Informações tecnológica, p.603, 2009.

DRACKLEY, J.K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2259-2273, 1999.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

EL-SHERIF, M.M.A., ASSAD, F. Changes in some blood constituents of Bark ewes during pregnancy and lactation under semi arid conditions. **Small Ruminant Research**, v. 40, p. 269-277, 2001.

ESMAEILNEJAD, B., TAVASSOLI, M., ASRI-REZAEI, S., DALI-NAGHADEH, B. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in sheep naturally infected with Babesia ovis. **Veterinary Parasitology**, v.185, p.124-130, 2012.

FACHINETTO, R., VILLARINHO, J. G., WAGNER, C., PEREIRA, R. P., PUNTEL, R. L., PAIXÃO, M. W., FERREIRA, J. Diphenyl diselenide decreases the prevalence of vacuous chewing movements induced by fluphenazine in rats. **Psychopharmacology**, v.194, n.3, p.423-432, 2007.

FAIXOVÁ, Z., PIEŠOVÁ, E., MAKOVÁ Z., ČOBANOVÁ, K., FAIX, S., Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on ruminal enzyme activities and blood chemistry in sheep. **Acta Veterinaria Brno**, v.85, p.185-194, 2016.

FAO. Dairy production and products, Milk production: Milk facts. Rome, 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/en/c/273893/> Acesso em: 20 jan 2017.

FURTADO, M. M. Queijos finos maturados por fungos. São Paulo: **Milkbizz**, 128 p, 2003.

GENNARI, S. M., BLASQUES, L. S., RODRIGUES, A. A. R., CILENTO, M. D. C., SOUZA, S.L.P.D., FERREIRA, F. Determinação da contagem de ovos de nematódeos no

período peri-parto em vacas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.1, p.32-3, 2002.

GIL-DÍAZ, M.D.M., PEREZ-SANZ, A., MARTÍN, M., LOBO, M.C. Potential Diffusion of Doramectin into a Soil Amended with Female Pig Manure. **A Field Experiment. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.10635–10640, 2011.

GOFF, J. P.; HORST, R. L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1260- 1268, 1997.

GOLET, E. M.; ALDER, A. C.; HARTMANN, A.; TERNES, T. A.; GIGER, W. **Analytical Chemistry**, v.73, 3632, 2001.

GRILLI, E., GALLO, A., FUSTINI, M., FANTINATI, P., PIVA, A. Microencapsulated sodium selenite supplementation in dairy cows: effects on selenium status. **Animal**. v.7, p. 1944-1949, 2013.

GRUMMER, R. R. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3882-3896, 1993.

HAENLEIN, G.F.W., WENDORFF, W.L. Sheep milk: production and utilization, Chapter 3 in Handbook of Milks of Non-bovine Mammals, Blackwell Publishing, p. 137-194, 2006.

HAENLEIN, George. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v. 51, n. 2, p. 155-163, 2004.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in biology and medicine. 4. ed. New York: Oxford University Press, 851 p, 2007.

HARMEYER, J., SCHLUMBOHM, C. Pregnancy impairs ketone body disposal in late gestating ewes: implication for onset of pregnancy toxæmia. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 254-264, 2006.

HIRSCH, R., TERNES, T., HABERER, K., KRATZ, K.L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, v. 225(1), p.109-118, 1999.

HOEKSTRA, W.G. Biochemical function of selenium and it's relation to vitamin E. **Federation Proceedings Journal**, v.34, p.2083–2090, 1975.

HOFFMANN, P.R. Mechanisms by which selenium influences immune responses. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**. v.55, p.289-297, 2007.

HORT, M.A., STRALIOTTO, M.R., NETTO, P.M., DA ROCHA, J.B., DE BEM, A.F., RIBEIRO DO VALLE, R.M., Diphenyl diselenide effectively reduces atherosclerotic lesions in LDLr mice by attenuation of oxidative stress and inflammation, **Cardiovascular Pharmacology Journal**, v.58, p.91-101, 2011.

HOUDIJK, J.M.D., KYRIAZAKIS, I., COOP, R. L., JACKSON, F. The expression of immunity to Teladorsagia circumcincta in ewes and its relationship to protein nutrition depend on body protein reserves. **Parasitology**, London, v. 122, p. 661-672, 2001.

HOUDIJK, J.G.M., KYRIAZAKIS, I., JACKSON, F., COOP, R.L. The relationship between nutrition, reproductive effort and breakdown in immunity to Teladorsagia circumcincta in periparturient ewes. **Animal Science**, v. 72, p. 595- 606, 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática, 2011. Capturado 20/02/2017. On line. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>.

INGRAHAM, R.H., KAPPEL, L.C. Metabolic profile testing. **Veterinary Clinical of North America: Food Animal Practice**, v.4, p.391-411, 1988.

KAPLAN, R.M., BURKE, J.M., TERRILL, T.H., MILLER, J.E., GETZ, W.R., MOBINI, S., VALENCIA, E., WILLIAMS, M., WILLIAMSON, L.H., LARSEN, M., VATTA, A.F. Validation of the FAMACHA# eye color chart for detecting clinical anemia on sheep and goat farms in the southern United States. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.105–120, 2004.

KOLAR, L., FLAJS, V.C., KU\_ZNER, J., MARC, I., POGACNIK, M., BIDOVEC, A., VAN GESTEL, C.A.M., KO\_ZUH ER\_ZEN, N. Time profile of abamectin and doramectin excretion and degradation in sheep faeces. **Environmental Pollutant**. v. 144, p.197–202, 2006.

LUCCI, C.S. Alimentação da vaca leiteira: bases técnicas. IN: PEIXOTO, A.M., MOURA, J.C., FARIA, V.D., Bovinocultura leiteira, fundamentos da exploração racional. Piracicaba, FEALQ, v.9, p.135-152, 1993.

LUQUET, F.M. La leche: de la mama a la lechería. Zaragoza: **Acribia**, 195p, 1991.

MAAS, J., PEARSON, E.G. Hepatic lipidosis. In: Smith BP, editor. Large animal internal medicine. 4th ed. St. Louis, USA: **Mosby Elsevier**; 2009. pp. 912–918.

MARTINS, M.O.R.V., MIMOSO, M.C.E.M. Leite de ovelha da região do Azeitão. Grupos Microbianos. Trabalhos desenvolvidos no núcleo de tecnologias de Leite e Derivados do Dep. Tecnol. Dos produtos agráriod do EAN. Investigaçāo Agrária. 2000.

MATTOS, M.J.T., OLIVEIRA, C.M.B., LUSTOSA, A., LACERDA, L.A., TERRA, S. Influência do parasitismo por nematódeos sobre o perfil hematológico de caprinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 1, p. 133-135, 2005.

MCDOWELL, L.R., WILLIAMS, S.N., HIDIROGLOU, N., NIERU, C.A., HILL, G.M., OCHOA, L., WILKINSON, N.S. Vitamin E and selenium suplementation for the ruminant. **Animal feed Science Technology**, v.60, p. 273-296, 1996.

MENEZES, C., LEITEMPERGER, J., TONI, C., SANTI, A, LÓPES, T., BARBOSA, N.B.V., NETO, J.R., LORO, V.L. Comparative study on effects of dietary with diphenyl diselenide on oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*) and silver catfish (*Rhamdia* sp.) exposed to herbicide clomazone. **Environmental toxicology and pharmacology**, v.36, n.2, p.706-714, 2013

MEOTTI, F.C., STANGHERLIN, E.C., ZENI, G., NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B.T. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environmental Research**, v.94, p.276-282, 2004.

MILLER, J.K., BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E., MADSEN, F.C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 9, p. 2812-2823, 1993.

NOGUEIRA, C.W., ZENI, ROCHA, J.B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology, **Chemical Reviews**, v.104, p. 6255-6285, 2004.

NRC . Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids and new world camelids. 1st ed. . Washington DC, USA: National Academies Press, p. 135, 2007.

NUDDA, A., BENCINI, R., MIJATOVIC, S., PULINA, G. The yield and composition of milk in Sarda, Awassi, and Merino sheep milked unilaterally at different frequencies. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, n.11, p.2879-2884, 2002.

OLIVEIRA, D.R., DOURADO, A.P., CARDOSO, E.C., BRANDÃO, F.Z., ALMOSNY, N.R.P., ALENCAR, N.X., KÜHNER, J.S.O. Perfil metabólico de ovelhas da raça Santa Inês no período periparto criadas na baixada litorânea do estado do Rio de Janeiro: peso, condição corporal, volume globular e hemoglobinometria. **Rio Grande do Sul: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária e Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul**, 2008.

PARK, Y.W., JUÁREZ, M., RAMOS, M., HAENLEIN, G.F.W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small ruminant research**, v.68, n.1, p.88-113, 2007.

PAYNE, J.M., PAYNE, S. The Metabolic Profile Test. **Oxford University Press**. New York, 1987.

PEETERS, R., BUYS, N., ROBIJNS, L., VANMONTFORT, D., VAN ISTERDAEL, J. Milk yield and milk composition of Flemish Milksheep, Suffolk and Texel ewes and their crossbreds. **Small Ruminant Research**, v.7, p.279-288, 1992

PETERSON, P.J., SPEDDING, D.J. The excretion by sheep of" selenium incorporated into red clover (*Trifolium pratense* L.): the chemical nature of the excreted selenium and its uptake by three plant species. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.6, n.13, p.13, 1963.

PETRONILHO, F., FLORENTINO, D., SILVESTRE, F., DANIELSKI, L.G., NASCIMENTO, D.Z., VIEIRA, A., KANIS, L.A., FORTUNATO, J.J., BADAWY, M., BARICHELLO, T., QUEVEDO, J. Ebselen attenuates lung injury in experimental model of carrageenan-induced pleurisy in rats. **Inflammation**, v.38, p.1394–1400, 2015.

PILAR, R.C.; PÉREZ, R.J.O., SANTOS, C.L. Manejo reprodutivo da ovelha: recomendação para uma parição a cada oito meses. **Boletim Agropecuário**, Lavras, n. 50, p. 1-28, 2002.

PONGE, J.F., GILLET, S., DUBS, F., FEDOROFF, E., HAESE, L., SOUSA, J.P. LAVELLE, P. Collembolan communities as bioindicators of land use intensification. **Soil Biology and Biochemistry**, v.35, p.813-826, 2003

PRIGOL, M., BRÜNING, C. A., MARTINI, F., & NOGUEIRA, C. W. Comparative excretion and tissue distribution of selenium in mice and rats following treatment with diphenyl diselenide. **Biological trace element research**, v. 150, n.1-3, p. 272-277, 2012.

PRIGOL, M., LUCHESE, C., NOGUEIRA, C. W. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative stress caused by acute physical exercise in skeletal muscle and lungs of mice. **Cell biochemistry and function**, v.27, n.4. p. 216-222, 2009.

RAYNAL-LJUTOVAC, K., GABORIT, P., LAURET, A. The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products. **Small Ruminant Research**, v. 60, n. 1-2, p. 167-177, 2005.

RIBEIRO, L., GONZÁLEZ, F. Perfil metabólico de borregas Corriedale em pastagem nativa do Rio Grande do Sul. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 3, p. 167-170, 2003.

ROCHA, R.A., AMARANTE, A.F.T., BRICARELLO, P.A. Resistance of Santa Inês and Ile de France suckling lambs to gastro-intestinalnematode infections. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, p. 17-20, 2005.

RODRIGUES, M.T. Alimentação de cabras leiteiras. In: ENCONTRO NACIONAL PARA O DESENVOLVIMENTO DA ESPÉCIE CAPRINA, 8, Botucatu. UNESP/FMVZ, Anais... Botucatu:UNESP/FMVZ, p.121-155, 2004.

ROSSATO, W.L., GONZÁLEZ, F.D., DIAS, M.M. FARIA, S.V., RICCÓ, D. Condição metabólica e desempenho reprodutivo no pós-parto em vacas leiteiras no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 155-156, 1999.

ROYAL, M., MANN, G.E., FLINT, A.P. Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. **The Veterinary Journal**, v.160, p.53–60, 2000.

RUSSEL, A.J.F. The nutrition of the pregnant ewe. In: **British Council**. The management and diseases of sheep. Edinburg, 1979

SAINZ, J.M.G. Estrategias de la alimentación en el ganado ovino de carne. In: CONGRESSO INTERNACIONAL FEINCO, 5, 2010, São Paulo. Anais... São Paulo: Agrocentro, 2010.

SALZANO, S., CHECCONI, P., HANSCHMANN, E. M., LILLIG, C. H., BOWLER, L. D., CHAN, P., VAUDRYEF, D., MENGOTZIA, M., COPPOA, L., SACREA, S., ATKURIG, KR., SAHAFG, B., HERZENBERGG, L.A., HERZENBERGG, L.A., MULLENA, L., GHEZZI, P. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.111, n.33, p.12157-12162, 2014.

SANTOS, G.T., PRADO, I.N., BRANCO, A.F. Aspectos do manejo do gado leiteiro especializado. Universidade Estadual de Maringá. 1993. 23 p. (Apontamentos, 22).

SAUTTER, K.D., SANTOS, H.R. Recuperação de solos degradados pela mineração de xisto, tendo como bioindicadores insetos da Ordem Collembola. **Scientia Agricola**, v.11, p.85-91, 1991.

SEJIAN, V., SINGH, A. K., SAHOO, A., NAQVI, S. M. K. Effect of mineral mixture and antioxidant supplementation on growth, reproductive performance and adaptive capability of Malpura ewes subjected to heat stress. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 98, n.1, p.72-83, 2014.

SETHY, K., MISHRA, C., MISHRA, S. K., SWAIN, R. K., BEHERA, K., MOHANTY, G. P. Effect of sodium selenite supplementation in goats. Indian **Journal of Small Ruminants** (The), v.21, n.1, p.129-131, 2015.

SILVESTRE, F., DANIELSKI, L.G., MICHELS, M., FLORENTINO, D., VIEIRA, A., SOUZA, L., CARDOSO, L.C., SCHRAIBER, R., REZIN, G.T., VUOLO, F., DA ROCHA, J.B., BARICELLO, T., QUEVEDO, J., DAL-PIZZOL, F., PETRONILHO, F., Effects of organoselenium compounds on early and late brain biochemical alterations in sepsis-survivor rats, **Neurotoxic Research**, v.26, p.382–391, 2014.

SMITH K.L., HARRISON J.H., HANCOCK D.D., TODHUNTER, D.A., CONRAD H.R. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. **Journal Dairy Science**, n.67, p.1293-1300, 1984.

SOTOMAIOR, C.S. Seleção de ovinos em resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPECIALIDADES EM MEDICINA VETERINÁRIA**, 1, 2002, Curitiba. Anais..., Curitiba: CBEMV, 2002

STRALIOTTO, M.R., HORT, M.A., FIUZA, B., ROCHA, J.B., FARINA, M., CHIABRANDO, G., DE BEM, A.F. Diphenyl diselenide modulates oxLDL-induced cytotoxicity in macrophage by improving the redox signaling, **Biochimie**, v.95, p.1544-1551, 2013.

STUBBS, A., ABUD, G., BENCINI, R. Dairy Sheep Manual - Farm Management Guidelines. Kingston: RIRDC, 2009. 69 p.

SUAREZ, V.H. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. **Veterinary Research**, v. 33, p. 563-573, 2002

UNDERWOOD E.J., SUTTLE N.F. The Mineral Nutrition of Livestock. **Wallingford: Cabi**, p. 614, 1999.

VAN METRE, D.C., CALLAN, R.J. Selenium and vitamin E. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.17, n. 2, p. 373-402, 2001.

VAN SAUN, R. J. Pregnancy toxemia in a flock of sheep. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 10, p. 1536-1539, 2000.

WANG, Y. X., ZHAN, X. A., YUAN, D., ZHANG, X. W., WU, R. J. Effects of selenomethionine and sodium selenite supplementation on meat quality, selenium distribution and antioxidant status in broilers. **Czech Journal of Animal Science**, v.56, n.7, p. 305-313, 2011.

WANYANGU, S.W., MUGAMBI, J.M., BAIN, R.K., DUNCAN, J.L., MURRAY, M., STEAR, M.J. Response to artificial and subsequem natural infection with Haemonchus contortus in Red Massai and Dorper ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 69, p. 275-282, 1997.

WEIGEL, R.A. Avaliação do metabolismo oxidativo e função renal de ovinos intoxicados por cobre e tratados com tetratilmolibdato e vitaminas antioxidantes. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo

WENDORFF, Bill. Milk composition and cheese yield. In: Great Lakes Dairy Sheep Symposium, 8., 2002, Ithaca. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, 2002. p. 104-117.

ZHAO, Z., ZHANG, Y., XUAN, Y., SONG, W., SI W., ZHAO, Z., RAO, Q. Ion-exchange solid-phase extraction combined with liquidchromatography-tandem mass spectrometry for the determination ofveterinary drugs in organic fertilizers. **Journal of Chromatography**, v.1022, p.281-289, 2016.

ZORTÉA, T., SEGAT, J.C., MACCARI, A.P., SOUSA, J.P., DA SILVA, A.S., BARETTA, D. Toxicity of four veterinary pharmaceuticals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* in tropical soils. **Chemosphere**, v. 173, p. 460-465, 2017.

ZORTÉA, T., BARETTA, D., ACCARI, A.P., SEGAT, J.C. BOIAGO, E.S., SOUSA, J.P., DA SILVA, A.S. Influence of cypermethrin on avoidance behavior, survival and reproduction of *Folsomia candida* in soil. **Chemosphere**, v. 122, p. 94-98, 2015.

## ANEXO



**UDESC**  
UNIVERSIDADE  
DO ESTADO DE  
SANTA CATARINA

**LAGES**  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
AGROVETERINÁRIAS

**Comitê de Ética em  
Experimentação Animal**

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Suplementação de ovelhas leiteiras com disseleneto de fenila: investigação dos benefícios sobre produção e qualidade do leite, resposta imune, perfil oxidativo e infecção por nematódeos gastrointestinais", protocolado sob o CETEA nº 5446050216, sob responsabilidade de Aleksandro Schaefer Da Silva e equipe; Angelisa H. Blazus - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina (CETEA/UDESC) em reunião de 05/05/2016.

We certify that the proposal "Supplementation of dairy sheep with diphenyl diselenide: research the benefits of production and quality of milk, immune response, oxidative profile and infection by gastrointestinal nematodes", utilizing 16 Ovines (16 females), protocol number CETEA 5446050216, under the responsibility of Aleksandro Schaefer Da Silva and team; Angelisa H. Blazus - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the University of the State of Santa Catarina (CETEA/UDESC) in the meeting of 05/05/2016.

Vigência da Proposta: de 09/2015 a 08/2016

Área: Zootecnia

Procedência: Não aplicável

Espécie: Ovinos

Gênero: Fêmeas

idade: 18 a 20 meses N: 16

Linhagem: Lacaune

Peso: 45 a 50 kg

Resumo: A ovinocultura leiteira, atividade comum nos países europeus e asiáticos, vem crescendo nos últimos anos no Brasil. Além de produzir leite com altos teores de sólidos, os seus derivados são considerados alimentos funcionais, devido os benefícios à saúde. Com isso, o objetivo do trabalho será avaliar o efeito da suplementação com selênio (disseleneto de fenila) na alimentação de ovelhas lactantes da raça Lacaune, sobre a produção do leite, composição centesimal e perfil de ácidos graxos do leite, perfil imunológico e oxidativo no animal e no leite, além de influências sobre a carga parasitária. Neste estudo serão usadas 16 ovelhas adultas, borregas, sendo estes animais divididos em dois grupos (A: não suplementado com a forma de selênio; B: suplementados com disseleneto de fenila). O experimento terá inicio entre 8-12 dias após inicio da lactação dos animais. Todos os animais receberam diariamente concentrados e após será fornecido o volumoso (silagem de milho). A dieta será balanceada conforme as exigências do NRC 2007, e será ajustada por animal após a pesagem do leite. A mesma dieta será fornecida aos dois grupos (A e B), está será isoproteica e isoenergética. Para avaliar o efeito do selênio, os animais do grupo B com irão receber pela via subcutânea a dose de 3,0 mg kg<sup>-1</sup> de disseleneto de fenila no dia 10 pós-parto (inicio do experimento) e será repetida em intervalos de 7 dias nos primeiros 42 dias de experimentos, posteriormente as doses serão aplicadas em intervalos 15 dias ate 80 dias pós-parto. Amostras para testar os objetivos serão coletadas em intervalos de 15 dias (dias 10, 25, 40, 55, 70 e 85 pós-parto). A mensuração do volume de leite produzido e pesagem das ovelhas serão realizadas em intervalos de sete dias. Com base em vários estudos, que mostram os benefícios do uso da suplementação de selênio, espera-se com o trabalho melhor a qualidade do leite, assim como reduzir níveis de radicais livres no animal e no leite, além de melhorar a resposta imune do animal, e com isso controlar a infecção por nematódeos gastrointestinais. Esta proposta também vai realizar teste de ecotoxicologia (usando metodologias ISO), usando fezes as ovelhas, para verificar se o tratamento proposto com disseleneto de fenila pode causar algum impacto ao ambiente. Além disso, difundir os conhecimentos encontrados no projeto para produtores, técnicos e instituições de Ensino e Pesquisa e contribuir para a melhoria da atividade da ovina cultura leiteira em Santa Catarina e no Brasil.

Santa Catarina, 05 de maio de 2016



**UDESC**  
UNIVERSIDADE  
DO ESTADO DE  
SANTA CATARINA

**LAGES**  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
AGROVETERINÁRIAS

**Comitê de Ética em  
Experimentação Animal**

Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa  
Coord. do Comitê de Ética em Experimentação Animal  
Universidade do Estado de Santa Catarina