Biodisponibilidade do Selénio em Cogumelos – Avaliação de Efeito nas Propriedades Antioxidantes

Dissertação Final de Mestrado

Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

CHRISTOPHE LOPES LEMOS

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

VILA REAL, 2010

Biodisponibilidade do Selénio em Cogumelos – Avaliação de Efeito nas Propriedades Antioxidantes

Dissertação Final de Mestrado

Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

CHRISTOPHE LOPES LEMOS

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

VILA REAL, 2010

Agradecimentos

Terminado este trabalho, e dado o contributo, directo ou indirecto, por muitas pessoas, cabe-me dedicar-lhes este espaço como forma de agradecimento e de reconhecimento.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao departamento de Química da universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD) pelo fornecimento de espaço e material para a realização desta actividade.

Um agradecimento óbvio aos meus orientador e co-orientador, o Professor Doutor Francisco Peixoto e Professor Doutor Fernando Nunes, respectivamente, não só pelos conhecimentos transmitidos, mas também pela disponibilidade, apoio, paciência (e eles bem sabem que precisaram de alguma) e dedicação que demonstraram para comigo ao longo deste ano lectivo.

Quero também agradecer ao técnico de laboratório, o Sr Carlos pela ajuda, pelas dicas e sobretudo por o material que lá ia emprestando quando este ia fazendo falta.

Uma palavra de agradecimento também aos meus colegas que iam estando presentes e que foram dando uma ajuda crucial, concretamente ao Carlos Augusto que foi claramente uma mais-valia em diversos dias, mas também à Joana Santos que foi sendo um apoio e uma ajuda importante durante uma boa parte da actividade.

Não poderia deixar de fora os meus amigos e colegas, aqueles que me apoiaram, mas sobretudo aqueles que não acreditavam neste trabalho nem no seu valor, tentando tirar o crédito e o mérito a todos os que estiveram envolvidos nesta dissertação.

Uma palavra especial à Juzinha, que foi sendo uma motivação e um apoio diário, valorizando cada passo e apoiando cada decisão, fosse ela mais ou menos importante.

E claro, o verdadeiro agradecimento aos meus pais, sem quem nada disto teria sido possível, aos quais agradeço muito sinceramente por tudo, pois o tudo foi deles.

Não esqueço também o meu irmão mais novo, que lá deu o jeito e o empurrão, à maneira dele.

A todos os que citei um sincero muito obrigado, pois graças a todos tenho hoje o trabalho terminado e, seja muito bom ou menos bom, orgulho-me dele e orgulho-me de todos os que me ajudaram e apoiaram.

Resumo

O selénio foi descoberto em 1817, e nessa altura foi considerado com uma causa de problemas para a saúde do homem, isto durante mais de um século.

Foi em 1950 que este elemento foi considerado como um mineral essencial, e desde então que os trabalhos sobre ele se sucedem, o que o classifica hoje de elemento indispensável na dieta.

O consumo de selénio evita diversas anormalidades em vários órgãos, nomeadamente no fígado, no cérebro, no coração, no músculo estriado e no pâncreas, estando ainda ligado a doenças crónicas, como a asma e a anemia hemolítica. O seu consumo em quantidades ditas óptimas tem efeitos positivos na prevenção de cancro e de doenças cardíacas e ainda na inibição de infecções virais e progresso da SIDA. No entanto, tomado em excesso torna-se tóxico, tornando o cabelo e as unhas mais frágeis, podendo mesmo causar a sua queda. Em doses excessivas causa ainda distúrbios gastrointestinais, erupção cutânea, provoca hálito a alho, cansaço e a formação de ROS (*Reactive Oxygen Species*), que provocam a oxidação do DNA, a quebra da cadeia dupla e morte da célula.

Existindo o selénio sob a forma orgânica e inorgânica, pretendeu-se com este trabalho estudar a biodisponibilidade deste elemento em diferentes órgãos após o consumo de selénio orgânico, proveniente de um cogumelo (*Agaricus bisporos*) e por outro lado, de selénio inorgânico, no caso presente o selenato.

Foram para isso utilizados 24 ratos, divididos em 3 grupos de 8 animais. O primeiro grupo (Grupo C – Controle) viu o selénio inibido da sua dieta; o segundo grupo (Grupo A – Agaricus) teve uma dieta enriquecida com selénio orgânico, ou seja, com o cogumelo; o terceiro grupo (Grupo S – Selenato) consumiu uma dieta enriquecida com selénio inorgânico, neste caso, selenato.

Após os 30 dias da actividade, foi determinada a concentração de selénio em diversos órgãos dos animais (fígado, rim, coração, testículo, cérebro) e ainda no músculo, sangue (soro e coágulo), na urina e nas fezes. Foram ainda avaliadas algumas actividades de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e catalase) e ainda os níveis de glutationa reduzida, pretendendo-se assim avaliar se a biodisponibilidade de selénio presente no cogumelo é superior à do selénio inorgânico, podendo substituir os suplementos de selénio, e verificar se essa biodisponibilidade melhora alguns parâmetros fisiológicos e bioquímicos.

Abstract

The selenium has been discovered in 1817, being considered as a health problem for over a century.

In 1950, this element was considered an essential mineral and since then, studies have been carried out to the point that today, selenium is considered indispensable in diet.

The selenium consumption avoids several anomalies in the internal organs, in particular the liver, the brain, the heart, the striated muscle and in the pancreas, and it can be attached to chronic diseases like asthma and hemolytic anemia. Its consumption in optimal conditions has positive effects in cancer prevention, heart diseases and inhibits viral infections and HIV progression. However, when taken in high quantities it can be toxic and as a consequence, the hair and nails become more fragile and could fall. In excessive dosage, it could cause gastrointestinal disorders, rash, garlic breath, fatigue and formation of *Reactive Oxygen Species* (ROS), which causes the oxidation of ADN which leads to cell disruption causing their death.

The selenium exists in the organic and inorganic form; the intention of this research was to study its bioavailability in different organs after the consumption of the organic selenium from a mushroom specie named *Agaricus bisporos* and, by other side, the study of the inorganic selenium was also performed in the form of selenate.

In order to carry out this research it has been used twenty-four mice, divided by three groups of eight animals each. The first group (Group C - Control), in which the selenium was removed from their diet; the second (Group A - Agaricus), had enriched diet with organic selenium; the third group (Group S – Selenate) had a enriched diet with inorganic selenium, in this case, selenate.

After thirty days, the concentration of selenium in several mice organs (liver, kidney, testicle and brain) was determined. Moreover, the selenium was also determined in the muscle, blood (serum and clot), urine and faeces. The activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) and levels of reduced glutathione were evaluated. This evaluation had the purpose to verify if the bioavailability of selenium is higher in the organic form rather than in the inorganic form, and know if it may replace the selenium supplements, and see if this bioavailability improves some physiological and biochemical parameters.

Résumé

Le sélénium à été découvert en 1817, ayant été à cette époque considéré comme une des causes de certains problèmes pour la santé, ceci pendant plus d'un siècle.

C'est en 1950 que cet élément à été considéré comme un minéral essentiel et depuis, beaucoup de travail sur le sujet ont été réalisé, ce qui le classifie aujourd'hui d'élément indispensable dans notre alimentation.

La consommation de sélénium évite diverses anomalies sur divers organes, notamment le foie, le cerveau, le cœur, le muscle strié e le pancréas, étant aussi lié à certaines maladies chroniques, comme l'asthme e l'anémie hémolytique. Sa consommation en quantités dites optimales à des effets positifs dans la prévention de cancer e de maladies cardiaques, mais aussi dans l'inhibition d'infections virales e du progrès du SIDA. Cependant, pris en doses excessives, il devient toxique, rendant les cheveux et les ongles fragiles, pouvant même causer leurs chutes. En doses excessives, il peut aussi causer des troubles gastro-intestinaux, éruption cutanée, haleine d'ail, fatigue e formation de ROS (*Reactive Oxygen Species*), qui provoquent l'oxydation de l'ADN, ce qui va briser l'hélice et provoquer la mort de la cellule.

Vu que le sélénium existe sous la forme organique et inorganique, on à prétendu avec ce travail étudier la biodisponibilité de cet élément dans différents organes après la consommation de sélénium organique, provenant d'un champignon (*Agaricus bisporos*) et d'un autre coté, de sélénium inorganique, le sélénate.

Pour cela, 24 rats ont été utilisés, diviser en 3 groupes de 8 animaux. Le premier groupe (Groupe C – Contrôle) n'a pas eu de sélénium dans son alimentation; le deuxième groupe (Groupe A – Agaricus) à eu une alimentation enrichie en sélénium organique, provenant donc du champignon; le troisième groupe (Groupe S – Sélénate) à eu une alimentation enrichie en sélénium inorganique, du sélénate.

Après les 30 jours de l'activité, les concentrations en sélénium de divers organes (foie, rein, cœur, testicule, cerveau) mais encore dans le muscle, sang (sérum et caillot), urine et fèces ont été déterminé. Certaines activités d'enzymes antioxydants (superoxyde dismutase et catalase) ont aussi été évalué, et encore les niveaux de glutathion, prétendant ainsi vérifier si la disponibilité du sélénium présent dans le champignon é supérieure à celle du sélénium inorganique, pouvant être un substitut des suppléments de sélénium, et vérifier si cette biodisponibilité améliore certains paramètres physiologiques et biochimique**s.**

Índice Geral

Agradecimentos……..I
Resumo……..II
Índice de Figuras……..…IX
Índice de Tabelas…….……XII

1. Introdução……1

1.1 História do Selénio……1

1.2 Propriedades do Selénio……3

1.3 Fontes de Selénio……..4

1.4 Concentração de Selénio nos Solos……5

1.5 O Selénio na Água……...7

1.6 O Selénio no Ar……8

1.7 Soluções para aumentar o consumo de Selénio……8

1.8 Dose Diária Recomendada e Intoxicação…….....9

1.9 Compostos de Selénio…….11

1.10 O Metabolismo do Selénio……12

1.11 Biosíntese da Selenocisteína……..15

1.12 Antioxidantes Enzimáticos……16

1.12.1 Glutationa Reduzida……18

1.12.2 Glutationa Peroxidase……..19

1.12.3 Glutationa Redutase……23

1.12.4 Catalase…….……...24

1.12.5 Superóxido Dismutase…….25

1.13 O Selénio para lá do organismo…….26

1.14 Biodisponibilidade em diferentes órgãos e fluidos……...…26

1.14.1 Sangue…….27

1.14.2 Cérebro……28

1.14.3 Fígado……..29

1.14.4 Músculo……30

1.14.5 Testículos……..31

1.14.6 Rim……...……32

1.14.7 Urina e Fezes……32

1.14.8 Coração……..……33

2 Objectivos…….34

3 Material e Métodos……...35

3.1 Animais……35

3.2 Comida……37

3.2.1 Grupo C…….37

3.2.2 Grupo A…….38

3.2.3 Grupo S……..…….39

3.3 Protocolo Experimental……..……40

3.3.1 Determinação de Selénio……..…42

3.3.2 Homogeneização para Análise Enzimática…….……44

3.3.2.1 Homogeneização……...44

3.3.3 Quantificação da Proteína…….46

3.3.4 Avaliação das Actividades Enzimáticas…..……..48

3.3.4.1 Avaliação da Actividade da Catalase……48

3.3.4.1.1 Calibração do Eléctrodo de Oxigénio……...49

3.3.4.1.2 Avaliação da Actividade da Catalase……50

3.3.4.2 Avaliação da Actividade da Superóxido Dismutase……..…….50

3.3.4.3 Quantificação da Glutationa Reduzida…..52

4 Resultados…….53

4.1 Crescimento dos Amimais……..53

4.2 Determinação do Selénio nas Rações Utilizadas…….……54

4.3 Quantidade Média Diária Consumida por cada Grupo……..55

4.4 Urina Produzida…….56

4.5 Produção de Fezes……..57

4.6 Massa dos Órgãos Removidos……...58

4.6.1 Massa do Coração……..59

4.6.2 Massa do Rim…….60

4.6.3 Massa do Testículo…….61

4.6.4 Massa do Cérebro……62

4.7 Quantidade Proteína em todos os Órgãos……...……63

4.8 Actividade da Catalase em todos os órgãos…….……64

4.9 Actividade da Superóxido Dismutase em todos os órgãos…….……66

4.10 Concentração da Glutationa Reduzida em todos os órgãos.…….67

4.11 Selénio……..……..68

4.11.1 Selénio no Fígado……69

4.11.2 Selénio no Rim……..70

4.11.3 Selénio no Testículo…….71

4.11.4 Selénio no Músculo……..…….72

4.11.5 Selénio no Coração……..73

4.11.6 Selénio no Cérebro……..……...74

4.11.7 Selénio no Coágulo Sanguíneo……75

4.11.8 Selénio no Soro Sanguíneo……..76

4.11.9 Selénio no Rato……77

4.11.10 Evolução de Selénio na Urina……78

4.11.11 Evolução de Selénio nas Fezes……...79

5 Discussão…….…….…….81

6 Conclusão……..…….86

7 Bibliografia……87

Índice de Figuras

Figura 1 – Níveis de ingestão de selénio (µg/dia) em diferentes países……7

Figura 2 – Metabolismo do Selénio…….12

Figura 3 – Selenocompostos em discussão no trabalho……...13

Figura 4 – Metabolismo das formas de Selénio da dieta…….16

Figura 5 – Mecanismo de oxidação…….21

Figura 6 – Interacções entre o selénio, a vitamina E e os ácidos amino-sulfurosos na inibição dos danos da peroxidação dos lípidos……...22

Figura 7 – Redução de H_2O_2 a H_2O pela GPx…….22

Figura 8 – Interconversão da GSH e GSSG pela acção das enzimas GPx, GO e GR……23

Figura 9 – Papel da CAT e da GPx na remoção de H_2O_2 nos tecidos humanos……...…24

Figura 10 – Rato *Wistar*…….....35

Figura 11 – Gaiola de policarbonato…….....36

Figura 12 – Gaiola metabólica…….40

Figura 13 – Sistema de digestão de amostras Raypa MMB-40…..……...43

Figura 14 – Espectrofluorímetro Jasco FP-777..……..43

Figura 15 – Recta padrão para determinação de Selénio…….43

Figura 16 – Homogeneizador Eurostar power-b IKA……...45

Figura 17 – Ultra-sons Sonics VibraCell……..45

Figura 18 – Centrífuga Sigma 2-16K..…….45

Figura 19 – Ultra-centrífuga Beckman L5-75B…….45

Figura 20 – Espectrofotómetro Spectronic Genesys 2PC……46

Figura 21 – Recta padrão para quantificação de proteínas……...47

Figura 22 – Eléctrodo tipo Clarck para avaliação da CAT……..48

Figura 23 – Eléctrodo de oxigénio para avaliação da actividade da CAT……...49

Figura 24 – Princípio da determinação da actividade da SOD pelo ensaio do NBT……..51

Figura 25 – Recta padrão para determinação de GSH…….52

Figura 26 – Curvas de crescimento dos animais…….……..53

Figura 27 – Quantidade de Selénio nas rações utilizadas…….54

Figura 28 – Consumo diário de comida por cada grupo……...55

Figura 29 – Consumo médio diário em Selénio……56

Figura 30 – Produção média diária de urina……..56

Figura 31 – Produção média diária de fezes……....57

Figura 32 – Massa dos corações……...59

Figura 33 – Massa dos rins……..….60

Figura 34 – Massa dos testículos…….61

Figura 35 – Massa dos cérebros……62

Figura 36 – Quantidade de proteína nos diferentes órgãos……..63

Figura 37 – Actividade da CAT nos diferentes órgãos……64

Figura 38 – Actividade da SOD nos diferentes órgãos……66

Figura 39 – Concentração de GSH nos diferentes órgãos……67

Figura 40 – Concentração de Selénio no fígado……..69

Figura 41 – Concentração de Selénio no rim……70

Figura 42 – Concentração de Selénio no testículo……71

Figura 43 – Concentração de Selénio no músculo……...72

Figura 44 – Concentração de Selénio no coração……73

Figura 45 – Concentração de Selénio no cérebro……74

Figura 46 – Concentração de Selénio no coágulo……75

Figura 47 – Concentração de Selénio no soro sanguíneo……76

Figura 48 – Concentração de Selénio nos diferentes órgãos e fluidos……77

Figura 49 – Concentração de Selénio na urina no final do trabalho……79

Figura 50 – Concentração de Selénio nas fezes no final do trabalho……..80

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Quantidade média de Selénio nalguns alimentos…….…….4

Tabela 2 – Concentração em Selénio nos solos de alguns países……5

Tabela 3 – Composição da comida base…….……..37

Tabela 4 – Padrões para recta padrão para quantificação de proteína.…….47

Tabela 5 – Padrões para recta padrão para determinação da GSH……..52

Tabela 6 – Massa dos órgãos removidos……..58

Tabela 7 – Concentração de Selénio na urina ao longo do tempo……78

Tabela 8 – Concentração de Selénio nas fezes ao longo do tempo……..79

1.Introdução

1.1 História do Selénio

O selénio (Se) foi descoberto em 1817 por Jöns Jakob Berzelius e foi reconhecido como sendo uma causa de problemas de saúde no homem por mais de um século.

Em 1295 Marco Polo registou durante a sua famosa jornada na Veneza da China que os seus cavalos sofreram uma doença necrótica típica quando estes comeram plantas envenenadas, que se sabe hoje serem acumuladores de selénio. Da mesma forma, as consequências de intoxicações crónicas de selénio em humanos foram notificadas em áreas geográficas seleniferas, muito antes de este elemento ser reconhecido como sendo o agente causador.

Na década de 30, um baixo consumo em selénio foi identificado como uma causa de "doença alcalina", reproduzindo os sintomas em animais de laboratório (Birringer, Pilawa & Flohe, 2002).

Os primeiros relatórios sobre carcinogenicidade em humanos apareceram em 1943, sendo a partir daí criada uma imagem negativa sobre o selénio (Dumont, Vanhaecke & Cornelis, 2006).

Foi em 1950 que o selénio foi reconhecido como sendo um nutriente essencial, isto quando foi descoberto que podia ser o principio activo no fígado e que podia substituir a vitamina E na dieta de ratos e de galinhas na prevenção de lesões vasculares, musculares e/ou hepáticas (Combs, 2001).

Já em 1957, Schwarz e Foltz demonstraram que o selénio protegia contra a necrose hepática em ratos, estabelecendo então o selénio como essencial na nutrição (Daniels, 1996).

O interesse no papel deste oligo-elemento na saúde humana ganhou uma maior importância no final dos anos '60 quando os investigadores começaram a olhar para as doenças humanas consoante as respostas dos animais às desordens ligadas à ingestão de selénio (Brown & Arthur, 2001). Evidências sobre a toxicidade do selénio foram reforçadas após a observação de doenças fatais entre cavalos que pastavam em determinadas áreas da China e dos Estados Unidos, tendo sido descoberto que os cereais que cresciam nesses solos continham concentrações excepcionais de selénio (Dumont et al., 2006).

Nos anos ’70 foram finalmente percebidas, graças a cientistas chineses anónimos, as causas de uma deficiência grave em selénio, ou a doença que esta deficiência provoca em humanos: a doença de Keshan, que é uma cardiomiopatia fatal (Birringer et al., 2002).

Em 1973 foi descoberto o importante papel que o selénio tem como componente da glutationa peroxidase, sendo que se descobriu em 1978 que a forma de selénio presente no centro activo ser a selenocisteína (Hawkes, Alkan & Oehler, 2003).

Dada a importância que este oligoelemento foi vindo a adquirir, em 1985, na Finlândia, alterou-se a ingestão de selénio de toda a população para os 100 μg/dia pela adição em todo o país de selénio nos fertilizantes (Alfthan, Aro, Arvilommi & Huttunen, 1991).

Assim, o selénio é hoje considerado um oligo-elemento essencial presente na maioria das proteínas procarióticas e eucarióticas, (Gladyshev, Jeang, Wootton & Hatfield, 1998) e o seu baixo consumo está associado ao aumento de várias doenças, tais como cancro e doenças cardíacas (Tinggi, 2008).

1.2 Propriedades do Selénio

O selénio é um não-metal do grupo VI da tabela periódica essencial para os humanos, (Manzanares et al., 2009) tendo funções de antioxidante, no metabolismo de hormonas na tiróide, nas reacções *redox*, na reprodução e em funções imunitárias, (Thomson, 2004) pois é um elemento essencial para o funcionamento eficiente e eficaz de várias funções do sistema imunitário dos humanos (Van Nhien et al., 2009). Encontra-se no mesmo grupo do enxofre, na tabela periódica, podendo substituir este na formação de aminoácidos sulfurados para formar os análogos em selénio selenometionina (SeMet) e selenocisteína (SeCys) (Daniels, 1996).

O selénio compartilha então propriedades físicas e químicas com o elemento enxofre (S), sendo que esta similaridade permite que o Se substitua o S, promovendo interacções Se-S nos sistemas biológicos. No entanto, as diferenças nas propriedades físico-químicas entre Se e S constituem a base dos seus papéis biológicos específicos.

Pode apresentar-se sob quatro estados de oxidação: selenato ($Se^{(+6)}O_4^{2-}$), selenito ($Se^{(+4)}O_3^{2-}$), selénio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{2-}) (Stadtman, 1980).

Uma alimentação pobre em selénio está ligada a doenças que causam anormalidades em vários órgãos, incluindo o fígado, o cérebro, o coração, músculo estriado e o pâncreas, (Turan, Acan, Ulusu & Tezcan, 2001) estando ainda ligado a doenças crónicas, asma, (Thomson, 2004) e anemia hemolítica em crianças prematuras. (Pleban, Munyani & Beachum, 1982) Contudo, os mecanismos protectores do selénio variam de órgão para órgão (Stajn et al., 1997).

As consequências da anemia incluem performances cognitivas, de comportamento e crescimento físico de crianças, estatuto imunológico, morbidez nas infecções e performance no trabalho (Van Nhien et al., 2009).

As funções imunitárias e a perda de imunocompetências relacionadas com uma deficiência em selénio estão certamente ligadas ao facto de este elemento ser normalmente detectado em quantidades importantes em tecidos imunes, tais como o fígado, no baço e nódulos linfáticos (Rayman, 2000).

Se a ingestão de selénio for em quantidades ditas óptimas, este torna-se importante para a prevenção de cancro e doenças cardíacas, inibição de infecções virais e atrasa o progresso da SIDA em pacientes positivos em HIV. Além disto, o selénio tem um papel importante nas funções imunitárias, na fertilidade de machos, no

desenvolvimento de mamíferos e atrasa ainda os processos ligados à idade (Lescure, Deniziak, Rederstorff & Krol, 2008).

1.3 Fontes de Selénio

A maior fonte de selénio é sem dúvida a alimentação e, em geral, o peixe, os cereais e a carne contém níveis relativamente elevados deste elemento. Além dos cereais serem bastante ricos em selénio, os seus seleno-aminoácidos são directamente depositados nas proteínas dos tecidos (Cary, Allaway & Miller, 1973). Outra fonte importante em selénio é o cogumelo, embora não todos, pois tendem a ser acumuladores de selénio. O *Agaricus bisporos* é um dos cogumelos mais frequentemente estudados pelas especificações que propõe e também por ser o mais frequentemente consumido na Europa e nos Estados Unidos (Dumont et al., 2006). A quantidade de água presente nos cogumelos é cerca de 90%, sendo os 10% restantes ricos em fibras, minerais, proteínas e hidratos de carbono. O *Agaricus bisporos* contém um elevado teor em proteínas (23,9% a 48,3%) e hidratos de carbono (24,5% a 62%) em peso seco (Moura, 2008).

Em contra partida, o leite, os vegetais e a fruta contém níveis relativamente baixos. Na tabela 1 pode ver-se a concentração de selénio nalguns alimentos.

Tabela 1 – Quantidade média de selénio nalguns alimentos

Comida	**Concentração Média Se (µg/100g)**
Leite	1.5
Carne	7.6
Carne de Porco	14.0
Cordeiro	3.8
Fígado	42.0
Rim	145.0
Peixe	16
Fruta	1
Vegetais	2
Cereais	11
Pão	4.5
Noz do Brasil	254

O selénio entra na cadeia alimentar desde os solos através das plantas, daí a sua maior presença no pão, cereais, carne e aves domésticas (Brown et al., 2001).

1.4 Concentração de Selénio nos solos

Os valores de concentração em selénio nos alimentos podem variar de uma região para outra, pois os níveis de selénio nos alimentos variam consoante os seus níveis presentes nos solos, e esta variação de concentração no solo reflecte-se nas variações encontradas na população do planeta (Tinggi, 2008).

Na tabela 2 podemos ver a concentração em selénio nos solos de alguns países (Dumont et al., 2006).

Tabela 2 – Concentração em selénio nos solos de alguns países

País	**Conc. no solo (mg/kg)**
Alemanha	6,6
Bélgica	0,11
Brasil	ND*
China (província Enshi)	10 – 40
China (província Keshan)	0,17
Espanha	0,07 – 0,39
Estados Unidos	0,11 – 18,36
Finlândia	0,15 – 0,72
França	0,18
Holanda	ND*
Itália	ND*
Japão	0,7 – 1,0
Reino Unido	0,18 – 29,70
Suécia	0,39
Suíça	ND*
Turquia	0,03

ND Não definido*

A quantidade de selénio nos solos e a sua fixação nos mesmos é logicamente influenciada por o tipo de solo em questão. Solos ácidos e a complexação,

frequentemente com ferro ou alumínio, reduzem a captação de selénio pelas plantas, como acontece em muitas partes da Europa (Rayman, 2000).

Solos vulcânicos são particularmente susceptíveis à lixiviação mineral (Tapiero, Townsend & Tew, 2003).

A mobilização deste elemento nos solos é ainda influenciada pelo pH: condições alcalinas favorecem a conversão do selénio inorgânico a selenato ($Se^{(+6)}O_4^{2-}$), que não está fixado nos solos, enquanto condições ácidas favorecem o selenito ($Se^{(+4)}O_3^{2-}$), que absorve as argilas e é fortemente fixado por hidróxidos de ferro (Combs, 2001).

A disponibilidade de selénio para as plantas é também afectada pela humidade do solo: o elemento está mais disponível para as plantas sob condições de baixa precipitação e de baixa lixiviação (Combs, 2001).

Por todo o mundo existem regiões em que os solos são tão pobres em selénio que as síndromes devido às deficiências são endémicas: estas regiões incluem as regiões áridas da Austrália, do nordeste da China, o Nepal e o Tibete. A África Central, particularmente a República Democrática do Congo têm deficiências semelhantes devido à dieta quase inteiramente composta por alimentos locais, com pouca ou nenhuma importação de alimentos externos (Tapiero et al., 2003).

Assim, estima-se que perto de um bilião de pessoas têm deficiências em selénio, e esta deficiência em grande parte da África Subsariana é tido como um factor determinante da propagação rápida da HIV/SIDA nesta região (Lyons, Judson, Ortiz-Monasterio, Genc, Stangoulis & Graham, 2005).

A figura 1 apresenta os valores de ingestão de selénio por parte das populações de alguns países (Rayman, 2005).

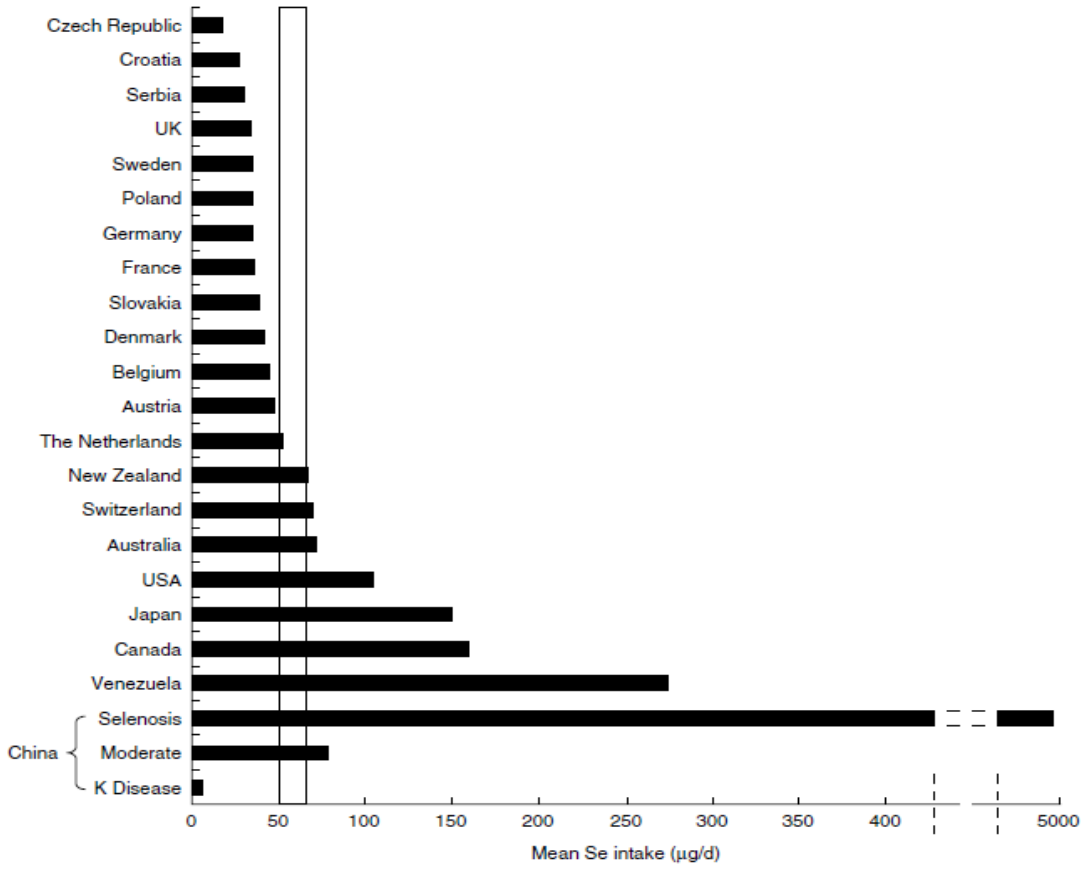

Figura 1 – Níveis de ingestão de selénio (µg/dia; ■) em diferentes países e a escala de ingestão de selénio que se acredita ser necessária para uma actividade óptima da GPx.

1.5 O Selénio na água

No que à água diz respeito, esta tem sido analisada nos Estados Unidos e em vários países chegando-se à conclusão que não fornece quantidades nutricionais significantes em selénio (Bratakos et al., 1988; NRC, 1980a; Robberecht et al., 1983). O selénio encontra-se na água sob a forma de selenito e selenato, principalmente como resultado da lixiviação das rochas seleníferas e dos solos. A precipitação do selenito férrico insolúvel ocorre na presença do ferro a um pH entre 6,3 e 6,8, enquanto a um pH de 8 é oxidado a selenato solúvel (Fan & Kizer, 1990).

A concentração máxima de selénio na água potável, estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), é de 10 ppb, ou seja, aproximadamente 10^{-7}M.

1.6 O Selénio no ar

Além destas fontes, também se encontram quantidades de selénio no ar. A maioria das áreas urbanas têm concentrações ínfimas atmosféricas de selénio que variam de 0.1 a 10 ng por m^3, contribuindo para uma exposição biológica insignificante. O valor de limite ocupacional da concentração do selénio inorgânico é de 0.2 mg/m^3 (Fan & Kizer, 1990).

1.7 Soluções para aumentar o consumo de Selénio

Como o selénio é um mineral escasso no nosso planeta e a concentração média no solo é de apenas 0.05 ppm, é necessário considerar uma forma melhor e mais sustentável de aumentar a concentração de selénio na dieta humana (Haug et al., 2007).

Uma boa forma de aumentar a concentração em selénio nos alimentos é, baseando-se numa experiência finlandesa, a biofortificação de sementes agrícolas seleccionadas, aumentando então a quantidade de selénio, o que pode ser uma estratégia para diminuir os riscos de deficiência deste composto na alimentação (Tinggi, 2008). De forma a salvaguardar a saúde da sua população e diminuir as doenças nos animais causadas por deficiências em selénio no país, é adicionado, desde 1984, selénio sob a forma de selenato (Na_2SeO_4) às sementes. Esta acção permitiu aumentar a quantidade de selénio nos alimentos, passando a registar-se uma variação de 87 μg/L para 121 μg/L no plasma, dependendo do nível de aplicação da fertilização. É ainda importante referir que esta acção não teve efeitos ambientais adversos (Rayman, 2002).

Mas outras estratégias podem ser utilizadas para aumentar o consumo de selénio das populações, que podem passar por um maior consumo de alimentos ricos em selénio (como a Noz do Brasil, cereais, peixe, etc.), a adição de selénio no abastecimento de água ou ainda suplementos individuais (Lyons et al., 2005).

1.8 Dose Diária Recomendada e Intoxicação

A *National Research Council* estabeleceu, em 1989, a dose diária recomendada (RDA – Recommended Dietary Allowance) em selénio, tendo sido fixada em 55 e 70 μg/dia, para mulher e homem, respectivamente, (Finley, 1998) sendo o requisito mínimo estimado em 21 μg/dia (Hawkes et al., 2003). Estes valores são valores médios, pois o valor exacto não é fácil de definir por depender de diversos factores, nomeadamente da espécie animal, da idade, do sexo, da nutrição e outras condições fisiológicas e ainda do composto selenífero usado (Jaffé, 1973).

No entanto, nos países nórdicos, a dose diária recomendada é de 50 μg para os homens e 40 μg para as mulheres e é baseada na saturação da actividade da glutationa peroxidase – 3 (GPx-3) no plasma. Contudo, a saturação da GPx-3 ocorre a níveis relativamente baixos de selénio (40 μg/dia) comparada com a dose de selénio necessária para saturar a GPx-1 nos eritrócitos (60 – 80 μg/dia) ou nas plaquetas (100 – 110 μg/dia) (Bugel et al., 2008).

É evidente que o nível de ingestão na Europa e em algumas partes da China não é adequado para completa expressão da glutationa peroxidase, sendo que esta situação pode ser real para outras partes no mundo, havendo pouca informação (ou mesmo nenhuma) sobre a ingestão de selénio para grande parte de África, América do Sul e centro e sul da Ásia (Rayman, 2005).

Diversos elementos essenciais podem exibir efeitos tóxicos quando ingeridos em quantidades excessivas (Jaffé, 1973). Para o caso do selénio, os níveis tóxicos estão estimados na ordem dos 350 – 700 μg/dia (Tapiero et al., 2003). Este patamar foi estabelecido após se terem descoberto casos de intoxicação com selénio. Por exemplo, em 1960 foi identificada uma situação na província chinesa de Hubei, que resultou de ingestão de elevadas concentrações de selénio. Foi então descoberto que os solos em desta região possuíam perto de 8 mg Se/kg e que as cinzas que eram usadas para fertilizar os solos possuíam 84 g Se/kg (Combs, 2001). Assim, uma morte foi associada a esta situação, pois estima-se que o consumo local em selénio seria de 3200 – 6690 μg/dia, ou seja, 100 vezes o nível recomendado (Combs, 2001).

Portanto, a ingestão de elevadas doses pode causar toxicidade e efeitos adversos na saúde (Tinggi, 2008), e até mesmo a morte são casos conhecidos (Stajn et al., 1997).

Os poucos dados disponíveis em humanos sugerem que a toxicidade crónica a partir das formas orgânica ou inorgânica têm características clínicas semelhantes, mas

diferem na rapidez de começo e na relação com a concentração em selénio no tecido. As características mais frequentemente registadas desta toxicidade são a fragilidade do cabelo e unhas, assim como a sua queda (Yang et al., 1983).

Outros sinais que foram registados incluem distúrbios gastrointestinais, erupção cutânea, hálito a alho (causado pelos compostos seleníferos), cansaço, irritabilidade e anormalidades do sistema nervoso (CDC, 1984; Helzlsouer et al., 1985; Jensen et al, 1984; Yang et al., 1983 ; G.Q. Yang et al., 1989).

A toxicidade em selénio pode ainda ter outros efeitos, como a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS – *Reactive Oxygen Species*), espécies estas que podem induzir a oxidação do DNA, a quebra da sua cadeia dupla e a morte da célula (Umysová et al., 2009).

A toxicidade do selénio nos humanos foi relatada devido a exposição industrial ou outras exposições acidentais. A inalação de fumos de selénio, dióxido de selénio, ou selenido de hidrogénio causa a irritação intensa das mucosas dos olhos e do tracto respiratório superior. Dores de cabeça, vertigem, fadiga, náusea, vómitos, um gosto amargo na boca, e um odor a alho na respiração podem igualmente caracterizar a inalação aguda do selénio (Fan & Kizer, 1990).

Alguns estudos realizados em ratos determinaram o LD_{50} de leveduras de selénio em 37,3 mg/kg, sendo o LD_{50} para o Na_2SeO_3 de 5 mg/kg (Dumont et al., 2006).

1.9 Compostos de Selénio

As formas de selénio presentes na comida incluem a selenometionina (plantas e animais), responsável por metade da dieta em selénio, com uma biodisponibilidade superior a 90%; a selenocisteína (animal), também com uma elevada biodisponibilidade, e as formas inorgânicas, tais como o selenato e o selenito, com uma biodisponibilidade que excede os 50% (Thomson, 2004).

No que toca à absorção das mesmas, sob condições consideradas óptimas, a selenometionina e o selenato apresentam absorções na ordem dos 95 – 98%, e absorções reais de 50 – 80% de selénio proveniente da dieta (Daniels, 1996). Embora o selenato seja quase totalmente absorvido, uma quantidade significativa é perdida pela urina antes de ser incorporada nos tecidos. Já o selenito tem uma absorção mais variável, provavelmente devido às interacções com as substâncias do lúmen intestinal, mas é mais retido, uma vez absorvido, do que o selenato (Thomson & Robinson, 1986). Embora o selenato e o selenito não sejam constituintes maioritários da dieta, eles são frequentemente utilizados para fortificar os alimentos e nos suplementos em selénio, como já foi visto com o exemplo da biofortificação realizada na Finlândia.

De referir que a biodisponibilidade é definida como a proporção de nutriente ingerido que é utilizado para funções fisiológicas normais ou armazenamento. A biodisponibilidade é influenciada por factores endógenos, incluindo o crescimento, a gravidez ou a lactação, a eficiência da digestão, o tempo do trânsito intestinal e a presença de distúrbios gastrointestinais ou doença (Tapiero et al., 2003). A utilização por parte dos tecidos do nutriente absorvido ou a conservação renal são ainda factores a ter em conta (King, 2001). Além disto, a biodisponibilidade e a absorção dependem fortemente da forma química em que o elemento está presente (Diaz Huerta, Fernandez Sanchez & Sanz-Medel, 2006).

A biodisponibilidade em selénio depende da conversão de selénio absorvido na forma biologicamente activa e da retenção nos tecidos (Tapiero et al., 2003).

A forma orgânica é predominantemente encontrada em cereais, peixe, carne, aves domésticas, ovos e produtos derivados do leite (Klein, 2004).

A forma inorgânica (selenito e selenato) é geralmente incluída na dieta através de suplementos (Daniels, 1996).

Os mamíferos podem utilizar tanto as formas orgânica e inorgânica como fontes de selénio (Shiobara, Ogra & Suzuki, 2000).

1.10 Metabolismo do Selénio

O selénio é metabolizado por diversas vias e a via metabólica determina a última disposição deste elemento e, consequentemente, as funções e benefícios deste (Finley, 1998). O seu metabolismo pode ser resumido como apresentado na figura 2 (Klein, 2004).

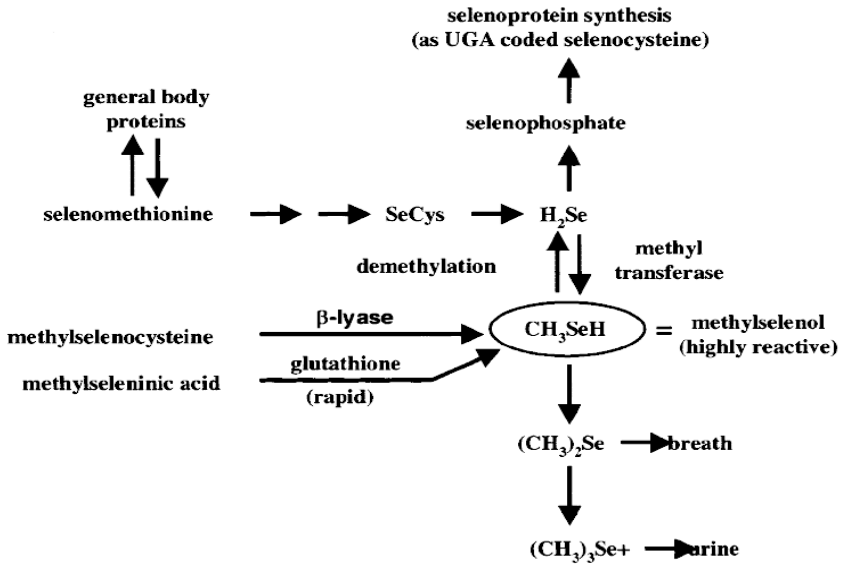

Figura 2 – Metabolismo do selénio

O selénio ingerido por mamíferos é transformado em formas orgânicas, na forma de resíduos de selenocisteína nas selenoproteínas, ou em resíduos de selenometionina nas proteínas em geral. Como resultado disto, o selénio é detectado nos mamíferos, mais frequentemente, sob a forma covalentemente ligada a carbonos (C-SeH ou C-$SeCH_3$) nas proteínas (Shiobara et al., 2000).

O importante papel do selénio nos mamíferos foi então manifestado pela detecção de diversas selenoenzimas, sendo que ainda há numerosas proteínas que contém selénio para ainda serem identificadas (Kyriakopoulos, Rothlein, Pfeifer, Bertelsmann, Kappler & Behne, 2000).

Ao contrário da grande maioria dos oligoelementos, o selénio não está coordenado com as proteínas, mas sim covalentemente anexado como parte do aminoácido selenocisteína (SeCys) (Lescure et al., 2008). Este aminoácido é sintetizado

nas células animais para ser incorporado nas selenoproteínas em quantidades estequiometricas (Burk, Hill & Motley, 2001).

As plantas convertem o selénio principalmente em selenometionina (SeMet) e incorporam-no na proteína, no lugar da metionina (Met). A selenometionina pode contribuir com mais de 50% do selénio total contido nas plantas, enquanto a selenocisteína (SeCys), a metilselenocisteína (methyl-Se-Cys) e a γ-glutamilselenometilcisteína (γ-glutamyl-Se-methyl-Cys) não são significativamente incorporados em proteínas vegetais e estão em níveis relativamente baixos, independentemente da concentração em selénio no solo (Tapiero et al., 2003).

Podemos ver na figura 3 as formas químicas dos selenocompostos referidos até agora (Battin & Brumaghim, 2009).

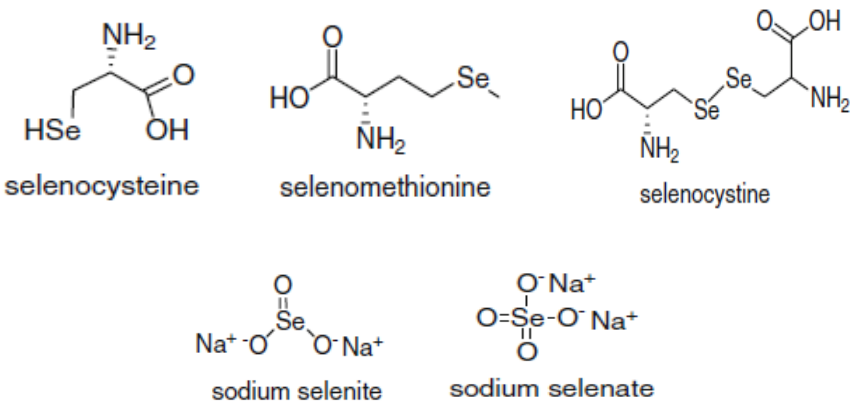

Figura 3 – Compostos em discussão neste trabalho

A selenometionina é mais eficazmente retida do que as formas inorgânicas, (Tapiero et al., 2003) sendo que o selenato é por sua vez mais absorvido que o selenito, mas não é tão eficaz na manutenção do estado do selénio (King, 2001). No entanto, o selenito aumenta a actividade da glutationa-S-transferase (GST), da glutationa peroxidase (GPx), da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) nas mitocôndrias e no citosol (Ansari et al., 2004).

Claro está que estas diferentes formas de selenocompostos apresentam diferenças nos seus papéis. Por exemplo, o selénio na forma de selenometionina (SeMet) é menos eficaz que o selenito na prevenção do cancro, e esta diferença é explicada pela teoria que o metil-selenol é a forma activa de selénio contra o cancro, e o

selenito é mais facilmente metabolizado nesta forma do que em SeMet (Finley, 1998). A ingestão de selenometionina reflecte-se na concentração em selénio no músculo esquelético humano, sendo que esta selenoenzima é também altamente retida nas proteínas do cérebro (Tapiero et al., 2003).

O genoma humano contém 25 genes que codificam as selenoproteínas; entre estes, as GPxs (glutationa peroxidases), tioredoxinas redutases e as deiodinases da hormona da tiróide são as melhores caracterizadas (Schweizer et al., 2005).

A função do selénio é mediada, maioritariamente, pelas selenoproteínas, às quais o selénio, na forma de uma selenocisteína, é introduzido durante a tradução. As selenoproteínas incluem enzimas tais como a glutationa peroxidase (GPx), tioredoxina redutases (TR), proteínas implicadas no transporte do selénio (selenoproteína P) e proteínas com funções desconhecidas, que são envolvidas na manutenção do potencial redox das células (Kryukov et al., 2003).

O selénio funciona como o centro *redox*, por exemplo, quando a selenoenzima tioredoxina reductase reduz os nucleótidos no DNA e ajuda no controlo e estado *redox* intracelular, ou quando a iodotironina deonidase, seleno-dependente, produz hormonas da tiróide activas de precursor inactivo (Rayman, 2000).

1.11 Biosíntese da Selenocisteína

Na natureza, a biosíntese da maioria dos compostos de selénio segue a mesma via que os compostos de enxofre. No entanto, vias mais complexas e altamente específicas na utilização do selénio. Estas vias servem para promover a incorporação selectiva deste elemento nas proteínas (Birringer et al., 2002).

O modo de incorporação da selenocisteína e os passos da sua biosíntese são drasticamente diferentes dos outros vinte aminoácidos (Rayman, 2005).

Grande parte das selenoproteínas actualmente conhecidas, particularmente as dos mamíferos, contém resíduos de selenocisteína nas posições correspondentes aos codões UGA nos respectivos RNA mensageiros (mRNAs) (Allan, Lacourciere & Stadtman, 1999). O selénio pode ser incorporado como selenocisteína no local activo de uma vasta gama de proteínas (Brown et al., 2001).

O codão UGA é um codão de terminação no código genético universal, e pode também codificar o 21º aminoácido, a selenocisteína (SeCys) (Turanov et al., 2009). Todas as selenoproteínas contêm selenocisteína (SeCys) nos seus centros activo (Reeves & Hoffmann, 2009).

O tRNA da selenocisteína que codifica o codão UGA foi encontrado em todos os reinos de vida, sugerindo que o uso do UGA como codão para a selenocisteína é o mais difundido na natureza (Gladyshev et al., 1998).

Ao contrário dos outros vinte aminoácidos, a SeCys é biosintetizada no seu próprio tRNA, o Sec $tRNA^{[Ser]Sec}$, a partir de selenofosfatos como fonte de selénio. A inserção da SeCys é especificamente feita pelo codão UGA no mRNA (Rayman, 2005).

O selénio pode ser incorporado nas selenoproteínas por uma via única que envolve a produção de selenocisteína (SeCys) e a incorporação da selenocisteína (SeCys) na cadeia polipeptidica usando o codão UGA como codão de inserção (Finley, 1998).

No caso da selenometionina, como o $tRNA^{Met}$ não faz a distinção entre a metionina (Met) e a selenometionina (SeMet), em dietas pobres em Met uma grande percentagem de SeMet é incorporada, não especificamente, nas proteínas no lugar da Mat (Tapiero et al., 2003).

Quando a selenocisteína não é acumulada e o selénio é libertado pela SeCys-β-liase para ser reduzido (juntamente com o selénio inorgânico proveniente da dieta) a selenido (H_2Se) nos eritrócitos, fica assim disponível para a síntese de selenocisteína no

fígado. Por outro lado, o selénio inorgânico não pode ser armazenado mas é utilizado directamente para a síntese de selenoproteínas no fígado (Daniels, 1996).

Na figura 4 está representado o metabolismo do selénio sob as formas ingeridas na dieta (Rayman, 2005).

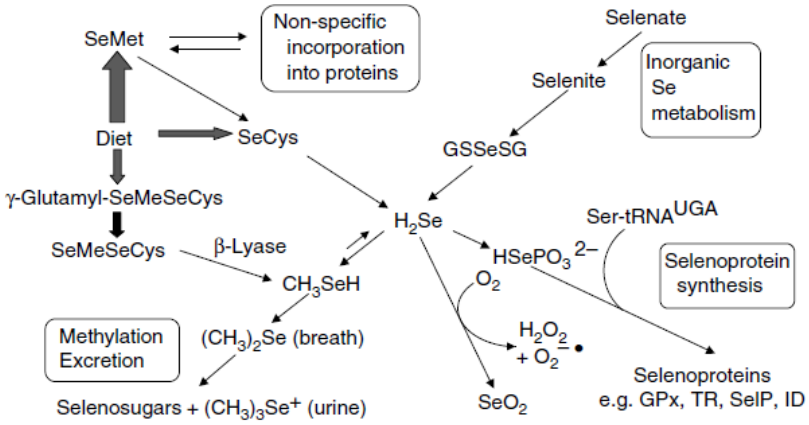

Figura 4 – Metabolismo das formas de selénio da dieta, SeMet, SeCys, SeMeSeCys, SeGSSG, GPx, TR, SeIP, ID

Os animais têm capacidade de sintetizar selenocisteína a partir de selénio inorgânico, no entanto, eles não conseguem sintetizar selenometionina e aparentemente não fazem a distinção entre a metionina e os seus análogos de selénio (Daniels, 1996).

1.12 Antioxidantes enzimáticos

O organismo contém sistemas antioxidantes que requerem uma ingestão adequada de selénio para um funcionamento fisiológico normal (Battin et al., 2009).

A formação de seleno-aminoácidos também é influenciada pelo tipo de selénio ingerido, pois, por exemplo, os animais monogástricos não formam seleno-aminoácidos a partir de selenito (Cary et al., 1973).

O metabolismo celular normal produz oxidantes que são neutralizados nas células por enzimas antioxidantes e outros antioxidantes (Zafar, Siddiqui, Sayeed, Ahmad, Salim & Islam, 2003).

Os antioxidantes enzimáticos são compostos pela superóxido dismutase (SOD), pela catalase (CAT) e pela glutationa peroxidase (GPx), (Gencel, Naziroglu, Celik,

Yalman & Bayram, 2009), sendo que em 1970 se descobriu que o selénio era um componente essencial desta última, (Combs, 2001) por estar presente no seu local activo e ser essencial à sua actividade catalítica (El-Demerdash, 2001). Portanto, o selénio é parte integrante da glutationa peroxidase (Chow & Tappel, 1974).

Estas selenoenzimas protegem as células contra os danos causados pelos radicais livres e pelos hidroperóxidos e lipoperóxidos (Naziroglu, 2003).

Durante o esforço, uma infecção ou ferimento do tecido, as selenoenzimas podem proteger contra os efeitos prejudiciais do peróxido de hidrogénio ou de radicais livres ricos em oxigénio. Esta família de enzimas catalisa a destruição do peróxido de hidrogénio ou dos lípidos, de acordo com as seguintes reacções gerais:

- $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$
- $ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + H_2O + GSSG$

onde GSH e GSSG representam, respectivamente, as formas reduzida e oxidada da glutationa (Arthur et al., 1996).

Todos os organismos vivos sintetizam a série de enzimas antioxidantes responsáveis pela desactivação de ROS, enzimas estas que já foram referenciadas (GPx, CAT, SOD) (Naziroglu, 2003).

O radical superóxido causa a inactivação das enzimas, incluindo a catalase e a glutationa peroxidase, e a oxidação de componentes intracelulares, tais como a glutationa, devido à sua longa meia-vida (Battin et al., 2009).

O consumo e a utilização de oxigénio em processos fisiológicos resulta inevitavelmente na produção de ROS (*Reactive Oxygen Species*). A produção de energia na mitocôndria é dependente do metabolismo de oxigénio, desde que O_2 seja reduzido a H_2O. Durante este complexo processo de transferência de electrões, a incompleta redução de O_2 pode resultar na produção de ROS altamente reactivos e prejudiciais, incluindo o radical superóxido (O_2^-), oxigénio singular, peróxido de hidrogénio e o radical hidroxilo (OH) (Battin et al., 2009).

Sabe-se hoje que as espécies oxigeno-reactivas (ROS – *Reactive Oxygen Species*), tais como o anião superóxido (O_2^-), os radicais hidroxilo (OH^-), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) contribuem para a reperfusão e induzem quebras na cadeia simples do DNA, o que activa a poli (ADP-ribosil) polimerase (PARP), resultando em NAD^+ e no esgotamento de ATP (Ansari et al., 2004).

Estas espécies reactivas são um subproduto inevitável da respiração celular, causando a oxidação dos lípidos, dos ácidos nucleicos e proteínas, e os danos das ROS são uma causa subjacente de doença, incluindo cancro, inflamações e doenças neurodegenerativas (Battin et al., 2009).

O selénio exerce o seu efeito biológico através de várias selenoproteínas, as quais podem estar presentes em mais de 30 sistemas de mamíferos. A avaliação das necessidades em selénio tem sido baseada em doses que maximizam a actividade da selenoenzima glutationa peroxidase (Thomson, 2004).

1.12.1 Glutationa Reduzida

A glutationa é um importante tri-péptido que está largamente distribuído nos tecidos animais, nas plantas e em microrganismos (Saydam et al., 1997).

A glutationa é uma molécula especial que participa numa grande variedade de processos metabólicos, transporte e desintoxicação. As suas características especiais facilitam a sua participação em diversas actividades biológicas, entre as quais, a protecção contra os danos causados por radicais livres (De Vega, Fernandez, Mateo, Bustamante, Herrero & Munguira, 2002).

O ciclo *redox* da glutationa tem um papel importante no mecanismo de defesa oxidante da célula. Os componentes do ciclo, isto é, a glutationa reduzida (GSH), a glutationa peroxidase (GPx) e a glutationa Redutase (GR) participam na protecção da célula dos efeitos tóxicos dos hidroperóxidos endógenos e exógenos (Turan et al., 2001).

A glutationa reduzida (GSH, L-g-glutamil-L-cisteinil-glicina) está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (Meister et al., 1983). A sua capacidade redutora é determinada pelo grupo -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra as lesões resultantes da exposição a agentes como os iões de ferro, oxigénio hiperbárico, ozono, radiação e luz ultravioleta. Além disto, actua como um transportador e um reservatório de cisteína, participando na desintoxicação de agentes químicos e na eliminação de produtos da lipoperoxidação. É

ainda requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (Deneke et al., 1989).

O poder antioxidante da GSH foi demonstrado pelo aumento da sobrevida de 90% de ratos submetidos à hiperoxia e tratados com fornecimento de eritrócitos na traqueia. Este resultado foi atribuído à GSH intra-eritrocitária que protege contra o stress oxidativo ao nível do pulmão, resultante da hiperoxia (Van Asbeck et al., 1985).

A glutationa reduzida protege os lípidos das membranas e outros constituintes celulares contra a lesão oxidativa, através da modificação do peróxido de hidrogénio e dos hidroperóxidos dos ácidos gordos (Viaro et al., 2001).

1.12.2 Glutationa Peroxidase

No que diz respeito à glutationa peroxidase, ela é muito utilizada como indicador da quantidade de selénio, pois existe uma relação linear entre a actividade da glutationa peroxidase no sangue e a concentração de selénio (abaixo dos 100 μg/L), (Daniels, 1996), daí vários investigadores sugerirem que a actividade desta enzima no plasma e/ou eritrócitos pode servir como um bom indicador do estado nutricional em selénio, pois o selénio está covalentemente ligado ao local activo da glutationa peroxidase, (Pleban et al., 1982) e não pode ser removido com EDTA, nem há registos de iões metálicos activadores desta enzima (Pleban et al., 1982). É uma selenoenzima presente no citosol das células onde, além das funções já enunciadas, reduz a fosfolipase A2 clivando os hidroperóxidos lipídicos (Brown et al., 2001).

A glutationa peroxidase é uma proteína tetramérica composta por quatro subunidades aparentemente idênticas, cada uma delas contendo um átomo de selénio (Torres, Farre, Lagarda & Monleon, 2003).

A glutationa peroxidase clássica (GPx-1) foi a primeira selenoproteína a ser identificada, e a forte relação linear demonstrada entre a concentração de selénio nos eritrócitos e a actividade da glutationa peroxidase permitiu a primeira marcação bioquímica eficaz do estado de selénio (Brown et al., 2001). Esta glutationa é uma das mais sensíveis às alterações de estado de selénio, com níveis de mRNA e de proteína a serem drasticamente reduzidos em condições de baixa concentração de selénio.

Juntamente com o estado de selénio, outros factores como o stress oxidativo influenciam a expressão da GPx-1 (Reeves & Hoffmann, 2009).

Suplementos vitamínicos, deficiência em ferro, toxicidade em metais pesados, estado hormonal e a origem étnica são factores que afectam a actividade desta enzima podendo então concluir-se que a actividade da glutationa peroxidase espera-se reduzida se o selénio estiver pouco disponível (Pleban et al., 1982).

Assim, o aumento de doenças associadas à deficiência em selénio pode ser atribuído ao aumento do stress oxidativo e às alterações na sinalização *redox*; as selenoproteínas podem ser subdivididas em grupos baseados na localização das SeCys nas selenoproteínas (Tapiero et al., 2003).

A selenocisteína no local activo da GPx é oxidada no ácido selénico correspondente por hidroperóxidos ou peroxinitrito, que por sua vez é reduzido no álcool correspondente. A forma reduzida da enzima é restaurada pela GSH (Klotz, Kroncke, Buchczyk & Sies, 2003).

Após a GPx-1, outras enzimas glutationa peroxidase foram identificadas, sendo elas a glutationa peroxidase glicosilada do plasma (GPx-2), a glutationa peroxidase gastrointestinal (GPx-3) e a glutationa peroxidase fosfolipidica-hidroperóxido (GPx-4). Excepto para a GPx-4, estas peroxidases são tetrameros, em que cada subunidade contem um resíduo de selenocisteína. Em contraste, a GPx-4 é um monómero que contem um resíduo de selenocisteína e que catalisa a redução de hidroperóxidos de ácidos gordos e de colesterol (Allan et al., 1999). A GPx-1 usa a GSH para reduzir ROS, produzindo GSSG durante o processo, que é convertido de novo a GSH pela enzima glutationa reductase (GR) (Reeves et al., 2009).

O papel da GPx-2 é sobretudo de proteger o epitélio intestinal do stress oxidativo. A GPx-2 apresenta uma especificidade de substratos similar aos da GPx-1, incluindo peróxido de hidrogénio, tert-butilhidroperóxido, hidroperóxidos comuns, mas não a hidroperóxido fosfatidilcolina. A expressão da GPx-2, juntamente com a GPx-4, é muito mais resistente do que a GPx-1 às deficiências em selénio na dieta (Reeves et al., 2009).

As GPx-3 são as únicas GPx secretadas e constituem aproximadamente 20% do selénio encontrado no plasma, sendo que este número pode variar, dependendo do estado em selénio de cada indivíduo. A principal fonte de GPx-3 no plasma é o rim, produzida pelas células do epitélio tubular proximal e nas células parietais da cápsula de Bowman e libertadas no sangue (Reeves et al., 2009).

O papel da GPx-4 é a protecção da oxidação reversa dos peróxidos lipídicos, mas esta selenoenzima também está envolvida no metabolismo de lípidos tais como o ácido araquidónico e ácido linóleico. Tal como a GPx-1 e a GPx-3, foi demonstrado que a GPX-4 tem um papel importante na protecção contra as doenças vasculares (Reeves et al., 2009).

O sistema glutationa peroxidase (GPx) e glutationa reduzida (GSH) trabalham cataliticamente de uma forma que se assemelha a desintoxicação de hidroperóxidos pela GPx em detrimento da GSH, como se pode ver pela figura 3.

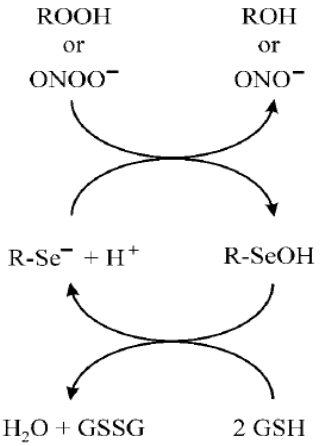

Figura 5 – Mecanismo de oxidação

A principal função da GPx é então de manter a integridade da membrana das células, incluindo a dos eritrócitos, e a prevenção dos danos peroxidativos é feita pela interacção com outros factores, tais como a vitamina E, a catalase e a superóxido dismutase (Thomson, Gibson & Martin, 2004).

O selénio e a vitamina E actuam especificamente e sinergicamente em diferentes etapas da peroxidação dos lípidos e nas vias de redução de peróxidos lipídicos, como se pode verificar pela figura 6 (Chow et al., 1974).

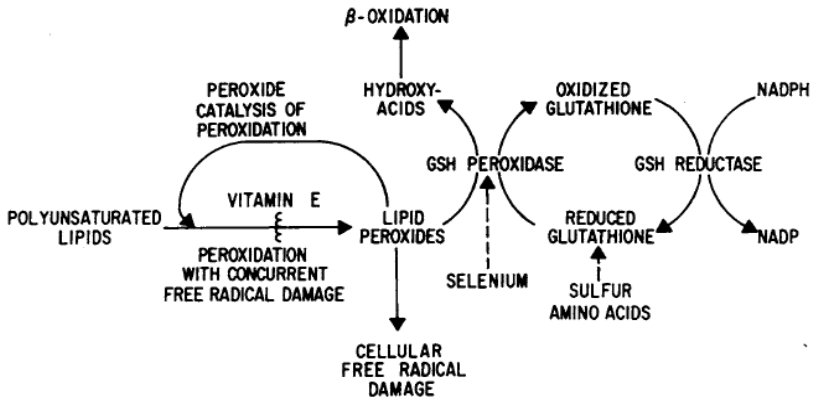

Figura 6 – Interacções entre o selénio, a vitamina E os ácidos amino-sulfurosos na inibição dos danos da peroxidação dos lípidos

Portanto, e resumindo, a glutationa peroxidase tem funções antioxidantes por redução de peróxidos, tais como o H_2O_2, reduzido a H_2O, (Battin et al., 2009) papel também desempenhado parcialmente pela catalase (Zafar et al., 2003). Isto pode ser visto na figura seguinte (Klotz et al., 2003).

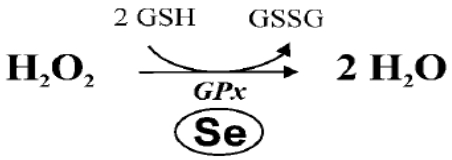

Figura 7 – Redução de H_2O_2 a H_2O pela GPx

Esta reacção utiliza a GSH como dador de electrões (agente redutor) e transforma-se em glutationa na sua forma oxidada (GSSG) (Tavares, 2008).

1.12.3 Glutationa Redutase

A glutationa redutase (GR) é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses (Ross et al., 1991). Esta enzima não age directamente na remoção de espécies radicalares, mas é responsável pela regeneração da glutationa na sua forma reduzida (GSH) utilizando o potencial redutor da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP+), tendo como objectivo impedir a paragem do ciclo metabólico da glutationa (Júnior et al., 2001) (Figura 8).

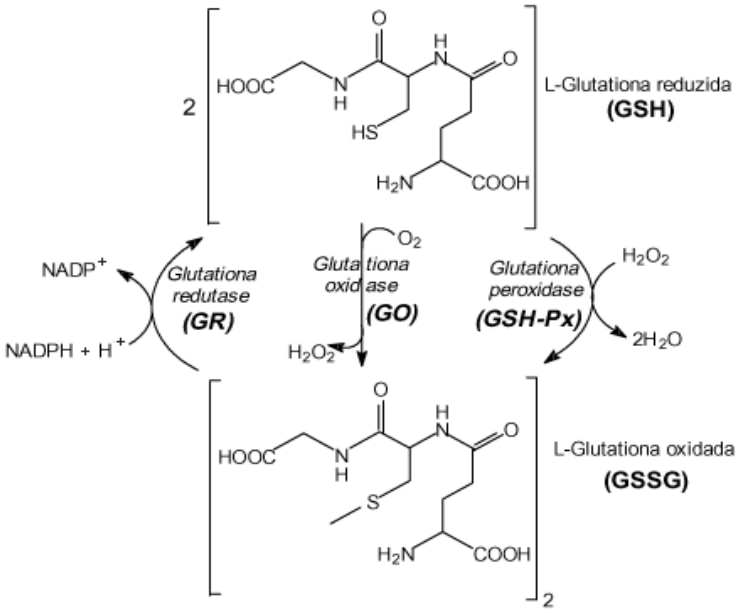

Figura 8 – Interconversão da glutationa nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela acção das enzimas glutationa peroxidase (GPx), glutationa oxidase (GO) e glutationa redutase (GR)

1.12.4 Catalase

A catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPx) são as enzimas com maior peso no que toca à desintoxicação de peróxido de hidrogénio nas células, (Thayer, 1986) podendo verificar-se esse mecanismo na figura 9 (Tapiero et al., 2003).

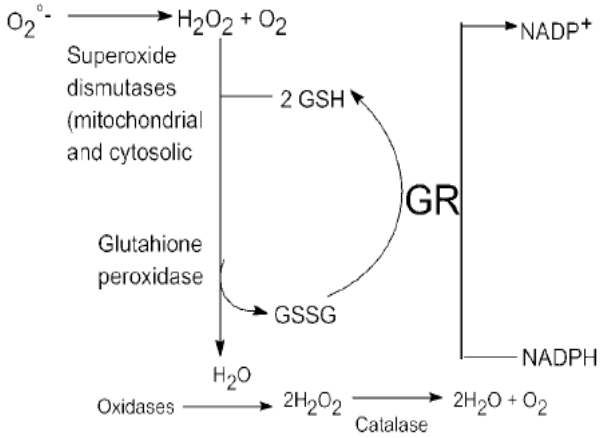

Figura 9 – Papel da catalase e da glutationa peroxidase na remoção de peróxidos de hidrogénio nos tecidos humanos

É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, coração, rim e fígado (Mayes et al., 1990). A sua actividade é dependente de NADPH. A suplementação de catalase exógena previne a oxidação da GSH mediada pelo H_2O_2 em eritrócitos humanos normais e inibe também as lesões oxidativas do DNA de timo de carneiros submetidos à sobrecarga de Fe^{3+} (Aruoma et al., 1989).

A CAT está presente em todas as células, em particular nos peroxissomas, subestruturas celulares que utilizam o oxigénio para remover a toxicidade a substâncias tóxicas através da produção de H_2O_2. A CAT converte H_2O_2 em H_2O e O_2.

A GPx e a CAT têm a mesma acção sobre o H_2O_2, mas a GPx é mais eficiente na presença de concentrações elevadas de ROS, enquanto a CAT tem uma acção mais importante com concentrações mais baixas de H_2O_2 (Tavares, 2008).

1.12.5 Superóxido Dismutase

A superóxido dismutase catalisa a dismutação do anião superóxido (O_2^-) do H_2O_2 no citosol das células e das mitocôndrias, e a degradação do H_2O_2 a H_2O e O_2 é catalisada pela catalase e pela glutationa peroxidase (Shireen, Pace, Mahboob & Khan, 2008).

A SOD constitui a maior defesa contra os radicais O_2^- e está na primeira linha de defesa contra o stress oxidativo. Em todas as células, a SOD mitocondrial é a grande responsável pela redução do O_2^- produzido, embora uma pequena parte se difunda para o citosol (Tavares, 2008). A adição desta enzima também protege o DNA de lesões provocadas pela sobrecarga de Fe^{3+} (Aruoma et al., 1989).

Foram identificadas três isoformas de SOD em humanos e todas elas contêm iões metálicos nos seus centros activos (cobre, zinco e manganês) (Battin et al., 2009).

Esta enzima corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos na sua composição. Nos sistemas eucarióticos existem duas formas de superóxido dismutase: a forma SOD-cobre-zinco, presente sobretudo no citosol, e a forma SOD-manganês localizada maioritariamente na mitocôndria (Ross et al., 1991).

A superóxido dismutase dependente de Cu^{2+} e Zn^{2+} como cofactores é uma enzima que actua na dismutação de radical superóxido que é constantemente formado durante o metabolismo aeróbio (Klotz et al., 2003) em peróxido de hidrogénio e oxigénio, como apresentado na equação seguinte (Júnior et al., 2001).

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow[Cu^{2+},Zn^{2+}]{SOD} H_2O_2 + O_2$$

1.13 O Selénio para lá do organismo

Para lá da utilização pelo corpo humano e para o bem da saúde, o selénio é usado na pesquisa de semicondutores (alumínio, bismuto, e selenido de índio), na manufactura do vidro (selenito de amónia, hemiselenido de arsénico), nos fotocondutores, nos semicondutores, em pilhas fotoeléctricas, em rectificadores (selenido de cádmio); em emissores de electrões (selenido de cálcio); como catalisador em digestões de Kjeldahl, como reagente químico (selenato de potássio), em remédios veterinários para eczemas e infecções fungosas; como agente nos champôs para o uso humano (bissulfeto de selénio); na manufactura de outros compostos do selénio; como um reagente para alcalóides (dióxido de selénio); e como um agente terapêutico veterinário (selenato de sódio, selenito de sódio) (Fan & Kizer, 1990).

1.14 Biodisponibilidade em diferentes órgãos e fluidos

Os órgãos acumulam normalmente grandes concentrações de selénio; os fígados da maioria das espécies contém geralmente quatro vezes mais selénio do que o músculo esquelético e os testículos de bois, carneiros e suínos podem acumular entre dez e dezasseis vezes a quantidade encontrada nos músculos (Combs, 2001).

Após a absorção, os maiores níveis de selénio estão localizados nos eritrócitos, fígado, baço, coração, unhas e esmalte de dentes. Na intoxicação crónica em animais o selénio é depositado principalmente nos rins e fígado, seguido pelo pâncreas, baço e pulmões (Borges, 2008).

A distribuição de espécies de selénio através dos diferentes órgãos foi documentada e a conclusão global que se obteve foi que as maiores concentrações de selénio estão presentes na ordem: rins – fígado – baço – testículos – músculo cardíaco – pulmões – cérebro (Dumont et al., 2006).

Assim, a actividade enzimática atinge um patamar linear, em diversos tecidos, e com diferentes níveis de ingestão de selénio (Alfthan et al., 1991).

1.14.1 Sangue

Em 1628, após nove anos de cuidadosas observações, William Harvey publicou o primeiro tratado científico sobre a circulação contínua do sangue. Desde aquela época foi acumulada uma grande quantidade de informação sobre a fisiologia e bioquímica do sistema circulatório.

Geralmente, menos de metade do sangue consiste em elementos "formados" – eritrócitos, que estão relacionados com o transporte de gases respiratórios, leucócitos, que combatem as infecções, e plaquetas, que têm um papel essencial na coagulação sanguínea. O resto é um líquido colorido a que se dá o nome de plasma. Este plasma é um líquido de cor palha composto por 91% de água e 9% de compostos químicos, sobretudo proteína.

Os eritrócitos (também conhecidos como glóbulos vermelhos) transportam o oxigénio e têm um papel importante no transporte de dióxido de carbono (Jacob, Francone & Lossow, 1990).

O plasma reflecte a concentração a curto prazo, sendo que a concentração nos eritrócitos reflecte a concentração a longo prazo, devido à incorporação de selénio durante a síntese destas células (Thomson, 2004).

Cerca de 75% do selénio total presente no sangue encontra-se no plasma/soro (Dumont et al., 2006).

A concentração mínima de selénio que é esperada no plasma, sob condições de expressão máxima de GPx plasmática é de pelo menos 70 ng Se/ml (Combs, 2001). São conhecidos dois tipos de glutationa peroxidase do plasma: a glutationa peroxidase extra celular (GPx-3) e a selenoproteína P (Burk et al., 2001).

A enzima plasmática (p-GPx) também apresenta uma forma tetramérica com subunidades idênticas e com um átomo de selénio por unidade, contudo, é uma proteína glicosilada e é cineticamente, estruturalmente e antigénicamente distinta da enzima celular (c-GPx) (Torres et al., 2003).

A concentração em selénio no sangue é geralmente considerada uma medida eficaz, tanto da concentração como de ingestão deste composto (Thomson, 2004).

1.14.2 Cérebro

A primeira menção sobre o termo *cérebro* é encontrada nos rolos de papiros egípcios. Actualmente, a palavra encéfalo refere-se "à parte do sistema nervoso que está no crânio". É a maior massa de tecido nervoso do corpo humano e contém bilhões de células nervosas. O peso médio de um encéfalo humano é de 1380 gramas para um homem e 1250 gramas para uma mulher; cresce rapidamente após o quinto ano de vida e pára de crescer após os 20 anos, diminuindo então durante a velhice (Jacob, Francone & Lossow, 1990).

O cérebro é um importante alvo dos efeitos do selénio, (Turan et al., 2001) pois durante a depleção do selénio o cérebro recebe um abastecimento prioritário (Rayman, 2000).

A isquemia cerebral em humanos, na maioria das vezes resultante de uma oclusão transitória ou permanente da artéria cerebral média, é uma das principais causas de várias falhas neurológicas e de morte (Ansari et al., 2004).

O cérebro é vulnerável aos danos oxidativos devido ao elevado consumo de oxigénio, à presença de elevados níveis de ácidos gordos poliinsaturados e à natureza não regenerativa dos neurónios (Zafar et al., 2003).

De entre os mecanismos propostos para a toxicidade do selénio alguns estudos sugerem que ele possa exercer uma acção pro-oxidante, pois altas concentrações podem oxidar grupos sulfidrila endógenos e aumentar a formação de radicais livres. A concentração de selénio cerebral não é elevada mas este órgão é o único que mantém um suplemento adequado em caso de deficiência do elemento (Ghisleni, 2006).

1.14.3 Fígado

O fígado é o maior órgão do corpo e está localizado na parte superior da cavidade abdominal, abaixo da cúpula diafragmática. Este órgão destrói eritrócitos velhos e desgastados, removendo bactérias e corpos estranhos do sangue. Funciona na desintoxicação através da troca de resíduos nitrogenados e amónia, em ureia, que é menos tóxica. Os sistemas de enzimas do fígado desactivam drogas e desintoxicam várias substâncias químicas provenientes do meio ambiente, tais como insecticidas, corantes e ingredientes alimentares. As transformações químicas incluem a oxidação (mecanismo principal), a redução, a hidrólise e a conjugação.

As influências do fígado na nutrição incluem o armazenamento de glicogénios de vitaminas A, D, E, K e B12, e certas outras vitaminas hidrosolúveis, e o metabolismo de glícidos, lípidos e proteínas (Jacob, Francone & Lossow, 1990).

O fígado é um dos principais alvos da toxicidade e/ou do stress oxidativo (Turan et al., 2001).

No fígado dos ratos há actividade de duas glutationas peroxidase: uma delas é a selenoenzima (Se-GPx), que é quase indetectável em animais deficientes em selénio, e a outra é a glutationa peroxidase não dependente de selénio, que é devida a algumas glutationa-S-transferases (Burk, Lane, Lawrence & Gregory, 1981).

1.14.4 Músculo

Existem três tipos de tecido muscular: o estriado (voluntário), o liso (involuntário) e o cardíaco. O músculo voluntário possui estriações transversas e pode ser controlado pela vontade (musculoesqueléticos, músculos da língua, faringe, laringe, etc.); o involuntário é liso, sem estriações, e está sob o controlo do sistema nervoso autónomo (paredes musculares dos tractos digestivos, respiratório e urinário, vasos sanguíneos, etc.); o cardíaco, embora estriado, é encontrado exclusivamente no coração e não está sob controlo voluntário (Jacob, Francone & Lossow, 1990).

Estudos recentes mostraram o importante papel do selénio e de algumas selenoproteínas na fisiologia dos músculos e as suas implicações nas doenças musculares (Rederstorff, Krol & Lescure, 2006).

Em animais ruminantes, deficiências em selénio causam doenças no músculo branco, uma condição caracterizada por fraqueza muscular e degeneração do músculo esquelético e cardíaco. Uma miopatia similar à doença do músculo branco foi descrita em humanos com deficiências em selénio (Lauretani, Semba, Bandinelli, Ray, Guralnik & Ferrucci, 2007).

A distrofia muscular nutricional (DMN) ou doença do músculo branco é uma doença miodegenerativa hiperaguda, aguda ou subaguda dos músculos cardíaco e/ou esqueléticos causada pela carência de vitamina E e de selénio. A doença é caracterizada por necrose segmentar com calcificação de segmentos necróticos das fibras musculares. A doença ocorre em animais mantidos em pastos cujos solos são pobres em Se e vitamina E ou que recebem rações deficientes nesses elementos (Amorim et al., 2005).

Uma baixa actividade da glutationa peroxidase é indicativo de uma baixa concentração em selénio nas células, que está por sua vez associado com dores musculares e fraquezas (Rederstorff et al., 2006).

Nas células musculares, 65 – 85% da actividade da SOD é citosólica (Tavares, 2008).

1.14.5 Testículos

Os testículos são pequenas glândulas ovóides, correspondentes aos ovários nas fêmeas, suspensas na região inguinal pelo funículo espermático, circundadas e suportadas pelo escroto (Jacob, Francone & Lossow, 1990).

Várias investigações têm mostrado que o selénio está envolvido em processos do sistema reprodutivo masculino (Behne, Duk & Elger, 1986).

Os testículos (nos ratos) contém níveis máximos de selénio e este composto aumenta consideravelmente durante a puberdade, com o inicio da espermatogénese. O selénio é também necessário para a biosíntese e o desenvolvimento normal dos espermatozóides, (Naziroglu, 2003) assim como para a biosíntese da testosterona (Rayman, 2002).

A ingestão insuficiente de selénio afecta a morfologia testicular, resultando na interrupção da espermatogénese. Isto afecta severamente a concentração, a motilidade e a morfologia do esperma, (Naziroglu, 2003) o que diminui as hipóteses de fertilização (Rayman, 2002).

Quando há deficiência de Se, há uma menor síntese de GPx e, como consequência, a gametogénese do macho fica comprometida, e os espermatozóides apresentam-se com cauda quebrada, deformações de cabeça, deformações da peça intermediária, ou até ruptura estrutural e presença de muitos espermatozóides mortos (necrozooespermia). Apresentam, também, baixa resistência ao teste de resistência (que mede a longevidade do sémen) e baixa eficiência nas taxas de concepção (Lima et al., 2007).

1.14.6 Rim

Os rins são órgãos com o formato de feijões, situados atrás do peritónio parietal, contra os músculos da parede abdominal posterior, um pouco acima da linha da cintura. É neste órgão que a urina é formada. Esta elaboração é feita primariamente em dois estágios: o estágio glomerular (formação da urina primitiva) e o estágio tubular, com os processos sucessivos ou simultâneos de reabsorção (da luz tubular para o sangue) e secreção (do sangue para a luz tubular) (Jacob, Francone & Lossow, 1990).

O pré-tratamento intravenoso com selenito de sódio inibe o aumento dos níveis de creatinina no plasma, o que por sua vez reduz as lesões morfológicas provocadas pela cisplatina nos rins de ratos e murganhos (Baldew et al., 1989).

A administração oral de selenito de sódio cria uma protecção parcial sobre a deterioração da função renal induzida em ratos pela cisplatina, com menor decréscimo na libertação de creatinina (Camargo et al., 2001).

1.14.7 Urina e Fezes

A urina é composta por 96% de água, na qual sais, toxinas, pigmentos, hormonas e produtos de decomposição do metabolismo proteico estão dissolvidos (Jacob, Francone & Lossow, 1990).

A excreção do selénio é feita primariamente pela urina e pelas fezes, sendo que em geral o selénio fecal é o que não foi absorvido na dieta (Daniels, 1996).

As principais vias de excreção de selénio são a urina e as fezes (Bugel et al., 2008).

Embora a excreção do elemento seja proporcional ao estado de selénio, a excreção é também sensível a mudanças a curto prazo na ingestão deste elemento (Burk et al., 1972).

O mecanismo que regula a produção de metabolitos excretórios ainda não foi elucidado, mas a excreção mostrou ser responsável na manutenção da homeostase em selénio no animal (Burk et al., 1972). Os metabolitos excretórios aparecem primariamente na urina, mas quando elevadas quantidade de selénio são excretadas, a respiração também contem metabolitos voláteis (McConnel and Portman, 1952).

Em doses normais, a urina é a via de excreção mais importante e regula a homeostase (Daniels, 1996). Em geral, 50 – 70% do selénio ingerido é excretado pela urina (Daniels, 1996) através dos rins, nas fezes através do tracto gastrointestinal e no ar expirado através dos pulmões (Dumont et al., 2006). O sistema renal tem um papel importante na adaptação do organismo a baixas ingestões de selénio, reduzindo a excreção. A excreção de selénio através da respiração apenas acontece quando a ingestão é extremamente elevada (Dumont et al., 2006).

1.14.8 Coração

O coração é uma câmara oca com quatro cavidades, um órgão muscular entre os pulmões, conhecido como sendo uma bomba muscular que propulsa o sangue através do sistema circulatório (Jacob, Francone & Lossow, 1990).

Teoricamente, o selénio deve ser um agente protector contra doenças do sistema cardiovascular. Isto acontece devido à capacidade da GPx de combater a modificação oxidativa dos lípidos e diminuir a agregação plaquetária. A GPx4 reduz os hidroperóxidos dos fosfolípidios e os ésters do colesterol associados com as lipoproteínas, reduzindo, desta forma, a acumulação das LDL oxidadas na parede das artérias. Além disso, na deficiência de selénio, ocorre inibição da enzima prostaciclina sintetase, responsável pela produção da prostaciclina (vasodilatadora), favorecendo a formação do tromboxano (vasoconstritor e agregante plaquetário), num balanço desfavorável para pacientes coronariopatas (Sarmento et al., 1989).

2. OBJECTIVOS

Neste trabalho foi feito um estudo da biodisponibilidade do selénio presente no cogumelo *Agaricus bisporos*, o conhecido cogumelo branco à venda nos nossos supermercados. O objectivo foi de comparar o consumo deste cogumelo como possível alternativa aos suplementos de selénio, utilizando para isso o selenato, e comparar a sua biodisponibilidade e possíveis alterações nas actividades antioxidantes.

Foram assim criados três grupos de animais (controlo, os que consomem o cogumelo e os que consomem o selenato), sendo posteriormente avaliados, para cada grupo, alguns marcadores bioquímicos e a capacidade antioxidante. Além disto, foi também determinada a quantidade de selénio, para cada grupo, em diferentes órgãos.

Tirar-se-ão assim conclusões que nos permitirão saber se o cogumelo será uma fonte mais eficaz de selénio que as formas inorgânicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

A vasta maioria das pesquisas nutricionais relacionadas com o selénio é realizada em ratos e murganhos, sendo usados em geral selenito, seleno-aminoácidos purificados ou outros compostos de selénio com baixo peso molecular (Hawkes et al., 2003).

Assim, para realizar este trabalho, foram utilizados 24 ratos machos Wistar, da espécie *Rattus norvergicus* (figura 10).

Estes são animais nocturnos, muito sociáveis, curiosos, facilmente adaptáveis e pouco agressivos.

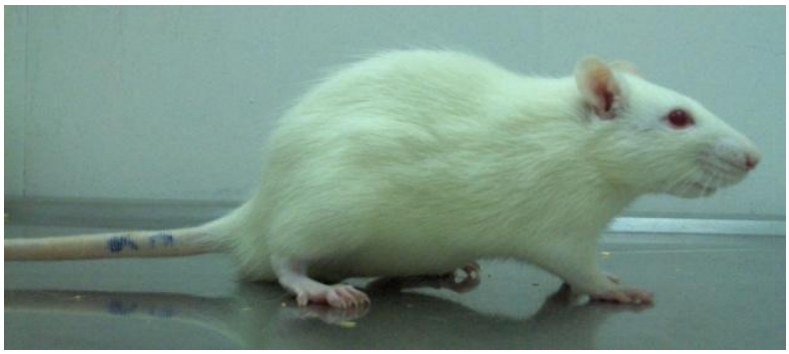

Figura 10 – Rato *Wistar* utilizado nesta actividade

Adultos, pesam entre 250 e 500 gramas, tendo uma frequência respiratória de 70 – 115/min e cardíaca de 240 – 450/min. Têm uma esperança média de vida de 2 a 3 anos; a sua temperatura corporal varia entre 37,5 e 38,5ºC.

Os animais foram colocados em adaptação ao biotério durante uma semana, sendo posteriormente divididos em grupos de 8 ratos por 3 gaiolas. As gaiolas utilizadas são de policarbonato, usando cama de aparas duras de madeira. (figura 11)

Figura 11 – Gaiola de policarbonato

A temperatura foi controlada nos 23 ± 2ºC, a luminosidade em ciclos de 12 horas (12 horas de luz, 12 horas de escuridão) e a humidade relativa mantida nos 55 ± 5%. De forma a enriquecer o ambiente dos animais, foram colocados tubos em PVC em cada gaiola.

A água foi mudada pelo menos duas vezes por semana e as gaiolas limpas com a mesma frequência, de forma a manter o espaço dos animais limpo. Estas mudanças foram feitas com o máximo de silêncio possível e com a menor brusquidão possível de forma a minimizar o stress dos animais.

3.2 Comida

Cada grupo foi alimentado com um tipo de comida diferente. O grupo de controlo (intitulado grupo C) com ração base (tabela 3), o grupo que ingeriu o cogumelo (intitulado grupo A, de *Agaricus*) e o grupo que ingeriu o selenato (intitulado grupo S, de selenato).

Tabela 3 – Composição da comida base

Fórmula	g/kg
Fermento Torula	300,0
DL-Metionina	3,0
Sucrose	591,0
Óleo de milho	50,0
Mix mineral, deficiente em Se (80313)	35,0
Carbonato de Cálcio	11,0
Mix de vitaminas (40060)	10,0

Para obter a comida para os outros dois grupos, adicionou-se a esta base o cogumelo em questão e o selenato, nas quantidades relativas ao consumo diário recomendado.

3.2.1 Grupo C

Para a preparação da comida para o grupo C (grupo de controlo), reduziu-se a comida base, previamente seca em estufa a 40ºC durante 48h, a pó, sendo feitos posteriormente os *pellets* no tamanho adequado aos animais. Não foi adicionado nada a esta ração visto ser pobre em selénio, o objectivo para o grupo de controlo.

3.2.2 Grupo A

Para a preparação da comida para este grupo, que é o grupo que ingeriu o cogumelo, o primeiro passo foi, como no caso anterior, secar a ração base na estufa e reduzi-la a pó. Estando reduzida a pó, adicionou-se então a quantidade de cogumelo necessária, liofilizado e também reduzido a pó, homogeneizando a mistura.

A determinação da quantidade de cogumelo necessária foi calculada da seguinte forma:

Pretende-se que os animais tenham um consumo que, correspondente aos humanos, seja de 100 μg Se/70 kg/dia, ou seja, 1,43 μg Se/kg/dia.

Tendo os ratos um peso médio de 200 g, serão então 0,29 μg Se/0,2 kg/dia.

Visto que este tipo de animais come em média 10% do peso do seu corpo, prevê-se que comam 20 g por dia. Portanto, é necessário que os 0,29 μg de selénio estejam presentes em 20 g de comida, ou seja, 0,0145 μg/g (14,5 μg/kg). Sabendo que serão preparados 6,7 kg de ração, dá-nos então 95,7 μg/6,7 kg.

Sabe-se que os cogumelos utilizados para esta actividade têm uma concentração em selénio de 0,873 mg/kg, ou seja, 873 μg/kg. Sabendo então que são necessários 95,7 μg de selénio, o cálculo efectua-se da seguinte forma:

$$\frac{95{,}7 \times 1000}{873} = 109{,}62 \text{ g}$$

Calculada a quantidade necessária de cogumelo a adicionar, procedeu-se então à devida homogeneização do cogumelo na ração base e procedeu-se à fabricação dos *pellets* do tamanho adequado e pretendido.

3.2.3 Grupo S

O primeiro passo da preparação desta ração é também ele a moagem após secura. Feito isso, para adicionar o selenato, preparou-se uma solução adequada para que o selénio pretendido fosse adicionado. Visto o selenato ser um sal, a estratégia utilizada para adicionar este à ração base foi a preparação de uma solução aquosa com as quantidades pretendidas.

A quantidade de solução a preparar foi determinada da seguinte forma:

Pretende-se que os animais tenham um consumo que, correspondente aos humanos, seja de 100 μg Se/70 kg/dia, ou seja, 1,43 μg Se/kg/dia.

Tendo os ratos um peso médio de 200 g, serão então 0,29 μg Se/0,2 kg/dia.

Visto que este tipo de animais come em média 10% do peso do seu corpo, prevê-se que comam 20 g por dia. Portanto, é necessário que os 0,29 μg de selénio estejam presentes em 20 g de comida, ou seja, 0,0145 μg/g (14,5 μg/kg). Sabendo que serão preparados 6,7 kg de ração, dá-nos então 95,7 μg/6,7 kg.

Sabendo que o selenato tem uma massa molar de 369,09 g/mol, dos quais temos 78,96 g/mol em selénio, e que precisamos de 95,7 μg de selénio, o cálculo é simples:

$$\frac{369{,}09 \times 95{,}7}{78{,}96} = 447{,}3 \text{ μg selenato}$$

De forma a não humedecer demasiado a ração com esta solução, prepararam-se apenas 350 ml de solução, pelo que, foi feita uma solução de 130 mg/L, posteriormente diluída 100 vezes para obter a concentração correcta a adicionar à ração (1,3 mg/L).

Preparada a solução, e estando a ração base devidamente reduzida a pó, procede-se à homogeneização e posterior preparação dos *pellets*.

3.3 Protocolo Experimental

São então criados 3 grupo de 8 animais (grupo A, grupo C e grupo S), cada grupo com a sua ração específica. Os animais são alimentados durante 30 dias, período durante o qual são também colocados em gaiolas metabólicas (figura 12), processo que permite a recolha de urina e fezes de cada animal, individualmente.

Figura 12 – Gaiola metabólica

Os animais são pesados semanalmente, o que permite acompanhar o seu crescimento e possíveis anomalias associadas a este.

Passados os 30 dias, os animais são eutanasiados por deslocamento cervical seguido de decapitação. É então recolhido sangue, para análise de coágulo e de plasma, mas também são recolhidos os órgãos de cada rato: testículos, rins, fígado, coração e cérebro, sendo também retirado músculo. Posto isto, é tudo congelado com azoto líquido e armazenado a –20ºC para posterior análise de selénio e de actividades enzimáticas.

Para a determinação de selénio, foram usados os seguintes órgãos:

- Fígado;
- Rim;
- Testículo;
- Cérebro;
- Músculo;
- Coração;
- Plasma;
- Coágulo;
- Urina;
- Fezes.

Para a realização de extractos enzimáticos e posterior análise de actividades enzimáticas, foram usados os seguintes órgãos:

- Fígado;
- Rim;
- Testículo;
- Músculo.

3.3.1 Determinação de Selénio

Para determinar a quantidade de selénio de cada amostra utilizou-se o método da digestão com ácido nítrico e peróxido de hidrogénio, com algumas alterações, por fluorimetria após reacção com 2,3-diaminonaftaleno (DAN) (Reaner & Veillon, 1983).

Os passos a seguir são os seguintes:

1. Pesar a amostra que se pretende analisar, num tubo de ensaio (entre 1 e 2 gramas);
2. Adicionar 1 ml de HNO_3 65% e 0,5 ml de H_2O_2 30% a cada amostra e homogeneizar com a ajuda do vortex;
3. Tapar com bolas de vidro (berlindes);
4. Deixar digerir durante 24h a temperatura ambiente;
5. Aquecer as amostras a 50ºC durante uma hora;
6. Aquecer as amostras a 100ºC durante uma hora;
7. Aquecer as amostras a 155ºC até a solução dos tubos estar límpida e transparente;
8. Retirar as bolas de vidro e deixar secar os tubos, a 155ºC (esta fase de aquecimento é realizada com sistema de digestão Raypa MMB – 40 [figura 13]);
9. Deixar arrefecer até temperatura ambiente e adicionar 0,5 ml de HCl 5M;
10. Tapar os tubos com tampas de Teflon e aquecer a 100ºC durante 30 minutos (de forma a reduzir o Se VI a Se IV);
11. Deixar arrefecer até temperatura ambiente e adicionar 10 ml de EDTA 10 mM e 2 ml de DAN 0,1% em HCl 0,1M;
12. Aquecer a 60ºC durante 30 minutos;
13. Deixar arrefecer até temperatura ambiente e adicionar 5 ml de ciclohexano;
14. Mexer vigorosamente para permitir a separação;
15. Analisar a fase orgânica fluorometricamente, com o espectrofluorímetro Jasco FP – 777 (figura 14), com um comprimento de onda de excitação de 375 nm e de emissão de 525 nm.

Nota: estes passos também são aplicados a soluções de concentração conhecida, de forma a permitir o traçar de uma recta padrão (figura 15)

Figura 13 e 14 – Sistema de digestão Raypa MMB – 40 e Espectrofluorímetro Jasco FP – 777

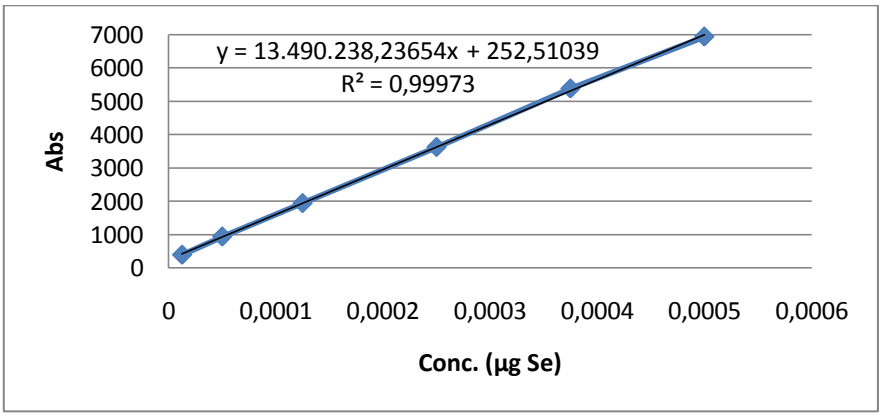

Figura 15 – Exemplo de recta padrão utilizada na determinação de selénio

3.3.2 Homogeneização para Análise Enzimática

Para permitir a avaliação da actividade enzimática de algumas enzimas antioxidantes, nomeadamente da superóxido dismutase e da catalase, deve fazer-se a homogeneização dos tecidos em questão. Este processo serve também para avaliar a quantidade de proteína destes órgãos e determinar a glutationa reduzida.

3.3.2.1 Homogeneização

1. O tecido a homogeneizar é pesado e colocado em tampão fosfato (KH_2PO_4 100 mM e EDTA 1mM, pH=7,4) na proporção de 10 % (p/v), com excepção do músculo, que é preparado na proporção de 20 % (p/V);
2. Procede-se à devida homogeneização utilizando o potter e o respectivo triturador Eurostar power-b IKA ® - werke (figura 16), a uma velocidade de cerca de 300 rpm;
3. Transferir o material homogeneizado para tubos de centrífuga e levar a ultra-sons Sonics VibraCell (figura 17) (15 sec. On; 15 sec. Off; Amp. 75%; 1 min.);
4. Centrifugar a 10000g durante 10 minutos numa centrífuga Sigma 2-16K (figura 18);
5. Aspirar cuidadosamente a gordura acumulada durante a centrifugação e transferir o sobrenadante para tubos de ultra centrífuga;
6. Centrifugar a 40000 rpm durante 30 minutos numa ultra-centrífuga Beckman L5-75B Ultracentrifuge (figura 19);
7. Dividir o material por várias alíquotas e congelar com azoto líquido, guardando-se então o material a -20ºC.

Nota: Todos os passos são realizados em gelo ou a -4ºC.

Figuras 16 e 17 – Homogeneizador Eurostar power-b IKA e ultra-sons Sonics VibraCell

Figuras 18 e 19 – Centrífuga Sigma 2-16K e Ultra-centrífuga Beckman L5-75B Ultracentrifuge

3.3.3 Quantificação da Proteína

Para quantificar a proteína presente em cada extracto enzimático utilizou-se o método de Bradford. Este método é o preferido na maioria dos laboratórios para a quantificação de proteínas. É uma técnica simples, rápida e sensível que consiste na ligação do corante Coomassie Blue G250 às proteínas (Kruger, 1994).

É baseado no facto de o Coomassie Blue G250 existir sob duas formas, a vermelha e a azul. A forma vermelha é convertida na forma azul após a ligação do corante à proteína. O complexo proteína – corante tem um elevado coeficiente de extinção conduzindo assim a uma elevada sensibilidade na quantificação de proteína (Bradford, 1976).

Assim, a quantidade de proteína pode ser determinada pela determinação da quantidade de corante azul na forma iónica (Kruger, 1994).

Esta determinação é feita espectrofotometricamente, utilizando o espectrofotómetro Spectronic Genesys 2PC (figura 20), a 595 nm, traçando-se para tal uma recta padrão (figura 21), que irá servir de base para a determinação da proteína de cada amostra.

Figura 20 – Espectrofotómero Spectronic Genesys 2PC

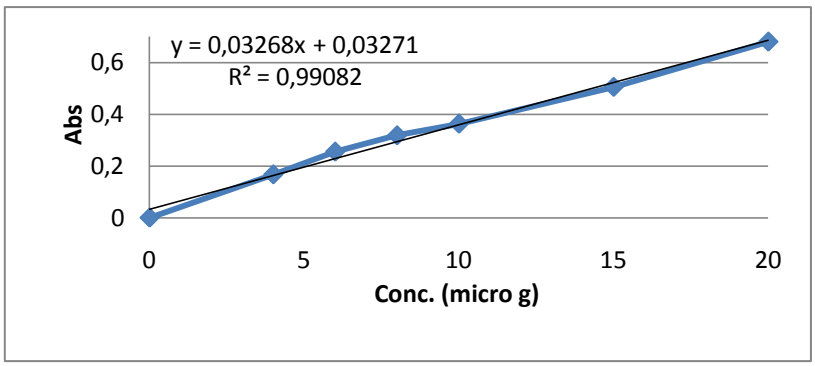

Figura 21 – Recta padrão para método de Bradford

Assim, traça-se a recta padrão de acordo com o apresentado na tabela 4.

Tabela 4 – Padrões para traçar recta padrão

Padrão	Concentração (µg)	BSA 0,01% (µL)	H_2O (µL)	Reagente Bradford (µL)
1	0	0	200	800
2	4	40	160	800
3	6	60	140	800
4	8	80	120	800
5	10	100	100	800
6	15	150	50	800
7	20	200	0	800

A quantificação de proteína de cada amostra é feita com o mesmo comprimento de onda, deitando na cuvete os volumes seguintes:

- 800 µL de reagente de Bradford;
- 20 µL de amostra;
- 180 µL de água.

Nota: Na maioria dos casos será necessário diluir as amostras, pelo que a diluição é feita consoante a amostra em questão. No presente estudo, as amostras de fígado tiveram de ser diluídas 40 vezes, as de rim 30 vezes, as de testículo 20 vezes e as de músculo 50 vezes.

3.3.4 Avaliação das Actividades Enzimáticas

3.3.4.1 Avaliação da Actividade da Catalase

A determinação da actividade da catalase é realizada através do método polarográfico, que se baseia na determinação da velocidade inicial da produção de oxigénio, pela decomposição do peróxido de hidrogénio pela catalase (Del Río et al., 1977).

Equação 1: $2H_2O_2 \xrightarrow{catalase} 2H_2O + O_2$

A actividade da catalase é quantificada utilizando um eléctrodo de oxigénio tipo Clark (figura 22), sendo o primeiro passo é a calibração deste.

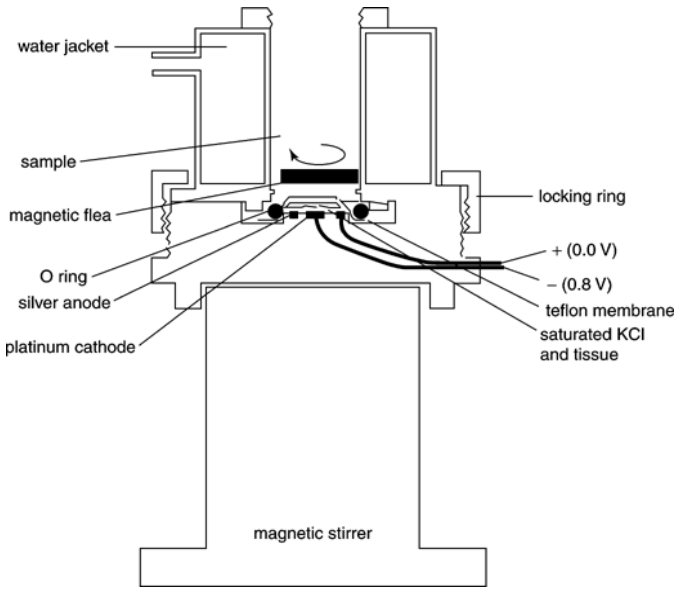

Figura 22 – Eléctrodo tipo Clark utilizado para a avaliação da actividade da catalase

3.3.4.1.1 Calibração do Eléctrodo de Oxigénio

1. Colocar água destilada a agitar durante alguns minutos (de forma a saturá-la);
2. Pôr o *peltier* a 20,1ºC, temperatura utilizada para a calibração;
3. Colocar 1 ml da água devidamente saturada no eléctrodo (figura 23);
4. Deixar estabilizar uns minutos, com os agitadores do eléctrodo em funcionamento;
5. Lançar a calibração e esperar que seja pedido que se faça o zero de oxigénio;
6. Estabelecer o zero de oxigénio colocando no eléctrodo ditionito de sódio;
7. Atingido o zero de oxigénio, o eléctrodo está então calibrado; passar a temperatura do *peltier* para 25ºC, temperatura utilizada para as determinações enzimáticas da catalase.

Figura 23 – Eléctrodo de oxigénio

3.3.4.1.2 Avaliação da Actividade da Catalase (CAT)

1. Adicionar ao eléctrodo, devidamente lavado com água destilada, 975 µL de tampão (tampão fosfato KH_2PO_4 50 mM e EDTA 1mM e pH 7,00, previamente desgaseificado com azoto);
2. Adicionar 10 µL de amostra, devidamente diluída consoante a amostra em questão;
3. Ligar a agitação e deixar incubar dois minutos;
4. Iniciar o registo durante 30 segundos:
5. Adicionar 15 µL de peróxido de hidrogénio;
6. Registar a evolução da actividade enzimática.

3.3.4.2 Avaliação da Actividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Para a determinação da actividade desta enzima é frequentemente utilizado um método indirecto, usando o NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*), pela conveniência e facilidade de utilização. Este método é baseado na redução do NBT por reacção com oxigénio, produzindo um corante azul ($\lambda_{max.}$= 560 nm), que é pouco solúvel em água. O sistema xantina – xantina oxidase produz O_2^- que por sua vez reduz NBT (ou WST-1) para o seu respectivo corante absorvante (figura 24) (Zhou & Prognon, 2006).

O substrato da SOD, $O_2^{\cdot-}$, é gerado pela reacção que promove a transformação da hipoxantina em xantina que, por sua vez se converte em ácido úrico, sendo utilizado como catalisador a xantina oxidase (Payá, 1992). Uma unidade (U) da SOD total e da SOD CuZn é definida como a quantidade de enzima requerida para inibir a razão de auto-oxidação em 50% (Jihen el, Imed, Fatima & Abdelhamid, 2009).

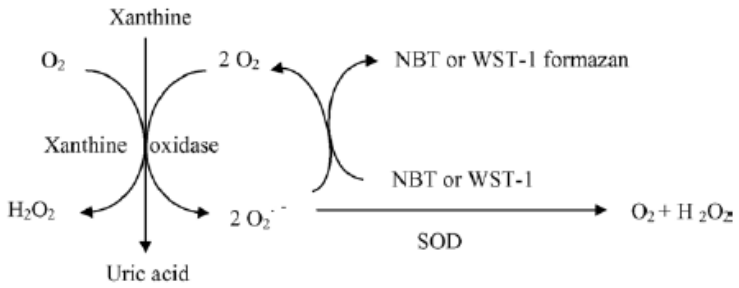

Figura 24 – Principio da determinação da actividade da SOD pelo ensaio do NBT (e WST-1)

1. Ligar o espectrofotómetro Spectronic Genesys 2PC (figura 20) e o computador seleccionando a opção "*cinética*" e um comprimento de onda de 560 nm;
2. Numa cuvete de plástico de 1 ml, deitar 910 µL de tampão (tampão fosfato KH_2PO_4 50 mM e EDTA 1mM e pH 7,00);
3. Adicionar 50 µL de amostra;
4. Adicionar 10 µL de NBT;
5. Adicionar 10 µL de hipoxantina;
6. Agitar a célula para homogeneizar e deixar termostatizar durante 2 minutos;
7. Adicionar 20 µL de xantina oxidase e agitar novamente a célula;
8. Registar a cinética durante 3 minutos.

<u>*Nota*</u>: Para esta avaliação é necessária a realização de um ensaio "*branco*", ou seja, não se deita amostra sendo esse volume substituído por tampão fosfato.

3.3.4.3 Quantificação da Glutationa Reduzida (GSH)

O conteúdo da GSH é determinado pelo método de Jollow e colaboradores (1974), em que a amostra do ensaio contém extracto enzimático, DTNB e tampão fosfato (Ansari et al., 2004).

Forma-se assim um produto com cor, resultante da reacção da GSH com o DTNB, medindo a sua absorvância a 412 nm, (Saydam et al., 1997) utilizando o espectrofotómetro Spectronic Genesys 2PC.

Para tal, deve em primeiro lugar traçar-se uma recta padrão (figura 25), de acordo com a tabela 5, que irá servir de base para determinar a concentração das amostras.

Tabela 5 – Padrões para traçar recta padrão

Padrão	Concentração (mM)	GSH 1 mM (µL)	DTNB 50 mM (µL)	Tampão* (µL)
1	0	0	50	2950
2	0,02	60	50	2890
3	0,04	120	50	2830
4	0,06	180	50	2770
5	0,08	240	50	2710
6	0,1	300	50	2650

**- tampão fosfato KH_2PO_4 50 mM e EDTA 1mM e pH 7,00*

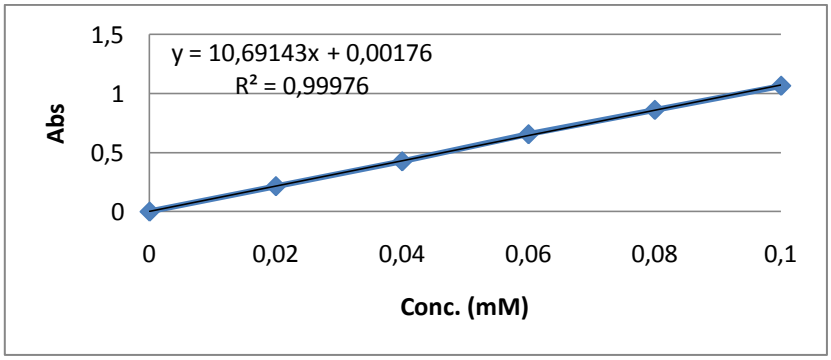

Figura 25 – Exemplo de recta padrão para determinação de GSH

Traçada a recta padrão, lêem-se as amostras, com o mesmo comprimento de onda, deitando na cuvete os seguintes volumes:

- 2850 µL de tampão;
- 100 µL de amostra;
- 50 µL de DTNB

4. RESULTADOS

4.1 Crescimento dos Animais

Todos os animais foram periodicamente pesados, de forma a acompanhar o seu crescimento e detectar possíveis anomalias que pudessem estar relacionadas com esse mesmo crescimento.

O gráfico da figura 26 mostra o crescimento médio de cada grupo, em percentagem, sabendo que no dia 0 (dia em que os animais iniciaram o estudo) o peso teria o seu correspondente de 100%.

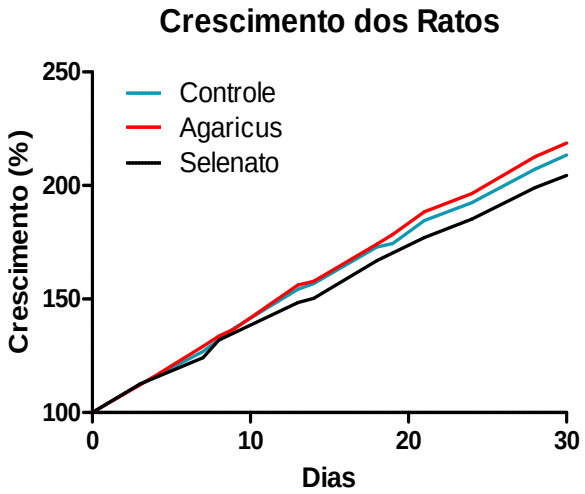

Figura 26 – Curvas de crescimento de cada grupo, ao longo dos 30 dias da experiência

Analisando o gráfico obtido, verifica-se que o grupo que consumiu o cogumelo apresentou um maior crescimento, tendo esse crescimento sido menos importante no grupo que teve como dieta a ração enriquecida com selenato, isto é, com o selénio inorgânico. No entanto, esta ligeira diferença no crescimento dos animais de cada grupo não pode ser associado exclusivamente à dieta, pois os dados são estatisticamente insignificantes.

4.2 Determinação do Selénio nas Rações Utilizadas

O primeiro passo, antes de fazer qualquer tipo de análise aos órgãos ou fluidos dos animais passou por fazer uma análise ao selénio das comidas ingeridas pelos animais, apresentando estes resultados na figura 27.

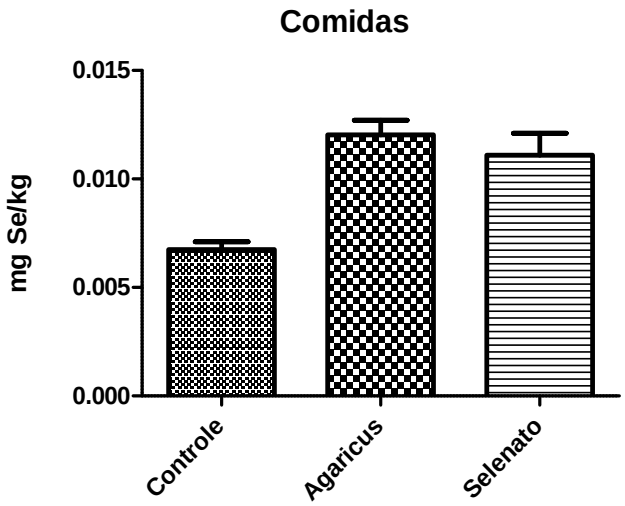

Figura 27 – Quantidade de selénio na ração consumida por cada grupo, apresentando a ração do grupo de controlo uma concentração média em selénio de 0,0067 mg Se/kg de comida, a ração enriquecida com o cogumelo uma concentração média de 0,0120 mg Se/kg de comida e a ração enriquecida com selenato uma concentração média de 0,0110 mg Se/kg.

Os resultados obtidos mostram uma diferença estatisticamente significativa entre a ração ingerida pelo grupo de controlo em relação às rações dos outros dois grupos, tanto da ração enriquecida com o cogumelo *Agaricus bisporos*, como da ração enriquecida com o selénio inorgânico. Se a comparação for feita entre as duas rações enriquecidas com selénio, a diferença apresentada não é estatisticamente significativa.

4.3 Quantidade Média Diária Consumida por cada Grupo

De forma a controlar a dieta dos animais, a comida colocada era periodicamente pesada, de forma a poder analisar e determinar a comida consumida diariamente, em média, por cada animal, isto para cada um dos grupos. Esse consumo médio diário é demonstrado na figura 28.

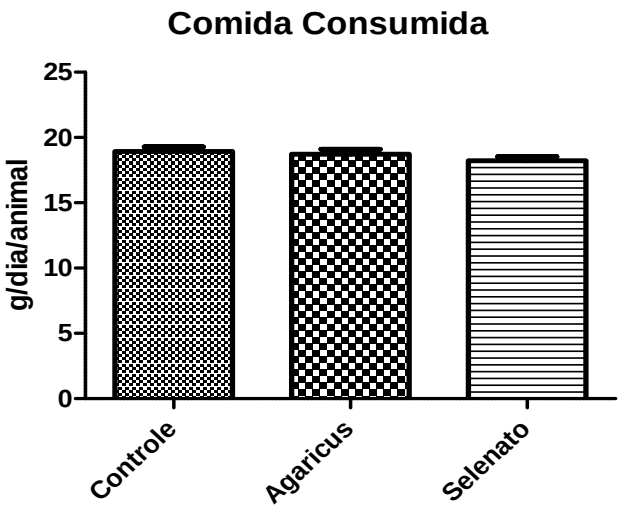

Figura 28 – Consumo diário de comida, em gramas, por animal, de cada grupo. As diferenças verificadas não são estatisticamente significativas, apresentando um valor médio de 18,92g/dia para o grupo de controlo, 18,73g/dia para o grupo Agaricus e 18,22g/dia para o grupo selenato.

Estes dados mostram-nos um consumo médio constante e semelhante para ambos os grupos, ou seja, perto de 19 g, sendo esse consumo aproximadamente 10% do peso do animal, por dia, como se esperava.

Com um pequeno cálculo, sabendo desde já a quantidade de selénio nas comidas e o consumo diário por cada grupo, pode agora determinar-se a quantidade média de selénio que os animais consumiram por dia. Esses dados estão apresentados na figura 29.

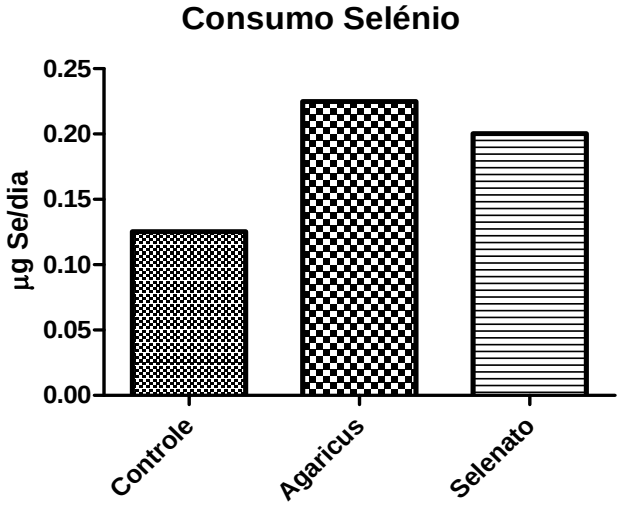

Figura 29 – Consumo diário médio de selénio (Controlo: 0,1254 µg Se/dia; Agaricus: 0,2248 µg Se/dia; Selenato: 0,2004 µg Se/dia)

4.4 Urina Produzida

Além do consumo médio diário de comida, a produção diária (média) de urina foi também ela controlada, colocando para isso os animais em gaiolas metabólicas, por períodos nunca superiores a 24h, de forma a não induzir stress aos animais em estudo.

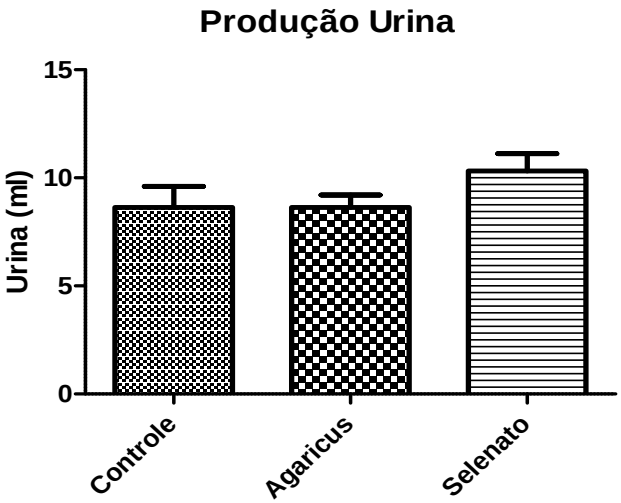

Figura 30 – Produção média diária de urina, por animal, para cada grupo. Os valores médios de produção foram de 8,63ml/dia para o grupo de controlo, 8,63ml/dia para o grupo Agaricus e 10,33ml/dia para o grupo selenato.

Verifica-se que a dieta em selénio, seja ele orgânico ou inorgânico, não traz alterações significativas à excreção de urina, não sendo os valores obtidos estatisticamente significativos. No entanto, verifica-se que o grupo do selenato teve excreções urinárias em média superiores aos outros dois grupos em estudo, tendo estes uma excreção urinária semelhante entre eles.

4.5 Produção de Fezes

A produção de fezes também foi controlada graças às mesmas gaiolas metabólicas, pois estas permitem recolher urina e fezes sem estas se misturarem. A figura 31 mostra a produção (média) diária de fezes de cada animal de cada grupo.

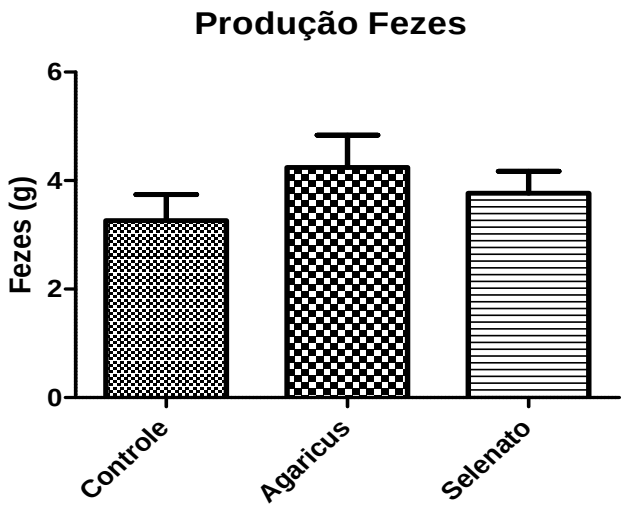

Figura 31 – Produção média diária de fezes, por animal, para cada grupo, sendo que os resultados obtidos não são estatisticamente significativos, tendo o grupo de controlo uma produção média diária de 3,26g/animal, o grupo Agaricus de 4,24g/animal, enquanto o grupo do selenato teve uma produção média diária de 3,77g/animal.

Como acontece com a urina, estes resultados não permitem tirar uma conclusão sobre a ligação da dieta com a produção de fezes, isto é, o consumo de selénio, seja ele orgânico ou inorgânico, não tem uma influência que se considere significativa na produção de fezes. Porém, ao contrário do que acontece com a urina, em relação às fezes as maiores excreções não couberam ao grupo que consumiu selénio inorgânico, mas sim ao grupo que consumiu selénio orgânico.

4.6 Massa dos Órgãos Removidos

Após serem eutanasiados, os órgãos removidos de cada animal foram devidamente pesados. Na tabela 6 estão os pesos médios de alguns órgãos analisados em cada rato. Estes valores estão organizados para cada órgão e para cada grupo.

Tabela 6 – Peso médio (g) dos órgãos de cada grupo

Grupo / Órgão	Grupo A	Grupo C	Grupo S
Coração	0,9303	0,9114	0,8592
Rim	1,1763	1,1814	1,1050
Testículo	1,3516	1,5005	1,3725
Cérebro	1,6637	1,4414	1,5408

Verificam-se algumas variações de massa dos órgãos removidos, embora não sejam variações sempre ligadas ao mesmo grupo. Para além disto, dentro do mesmo órgão, as variações não são suficientemente significativas para serem associadas ao tipo de dieta consumida.

Nas figuras 32, 33, 34 e 35 estão registados estes dados, desta feita graficamente.

4.6.1 Massa do Coração

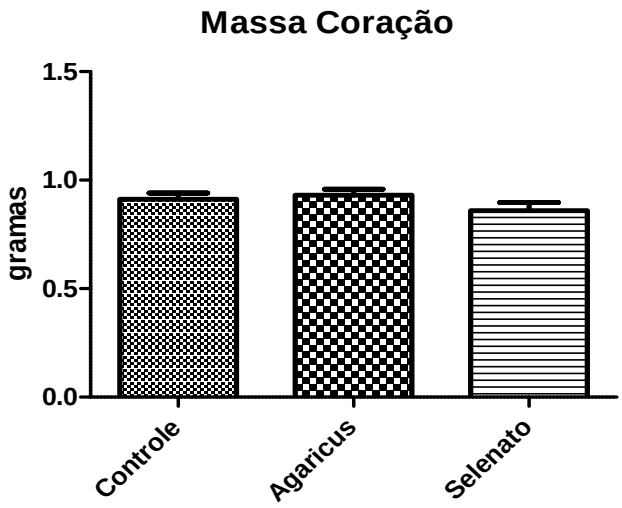

Figura 32 – Massa dos corações de cada grupo (Controlo: 0,91g; Agaricus: 0,93g; Selenato: 0,86g)

Com estes resultados, chega-se à conclusão que o selénio não influencia o crescimento do coração do animal. O facto de consumir ou não selénio, seja ele orgânico ou inorgânico, não irá ter uma influência no crescimento deste órgão, embora se verifique uma diferença de + 0,07g no grupo Agaricus em relação ao grupo selenato. A diferença é menos importante quando comparados os grupos de controlo e Agaricus, diferença esta de + 0,02g para o grupo de animais que ingeriu a ração enriquecida com o cogumelo.

4.6.2 Massa do Rim

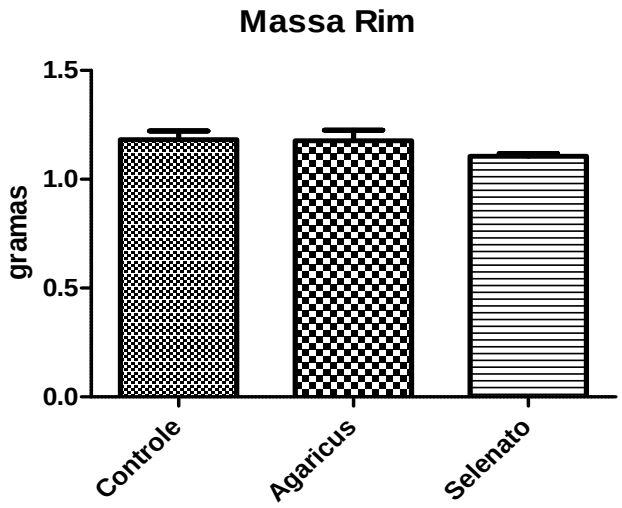

Figura 33 – Massa de um rim (Controlo: 1,18 g; Agaricus: 1,18 g; Selenato: 1,11 g)

Analisando estes resultados, verifica-se que o selénio não tem uma contribuição que se possa considerar relevante no crescimento dos rins, não podendo nesta situação ser considerado um facto preponderante na formação destes. No presente caso, os grupos de controlo e Agaricus apresentam um peso médio dos rins semelhante, sendo este valor ligeiramente inferior para o caso do grupo selenato.

4.6.3 Massa do Testículo

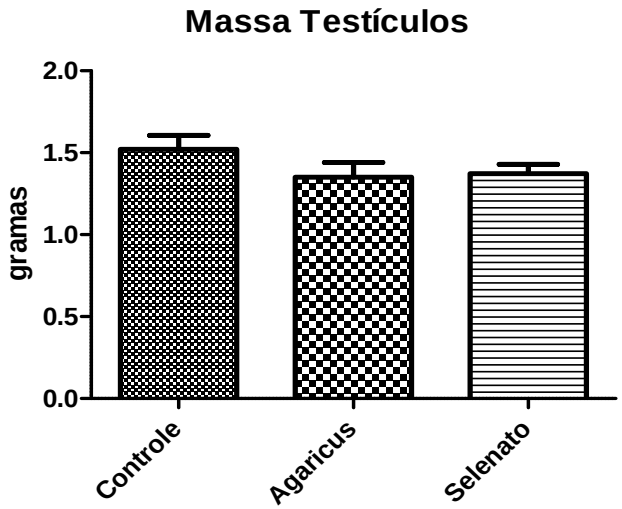

Figura 34 – Massa média dos testículos (Controlo: 1,52 g; Agaricus: 1,35 g; Selenato: 1,37 g).

Embora nesta situação o grupo de controlo apresente um valor médio superior ao de ambos os grupos em estudo, não é suficiente para considerar que o selénio diminui o crescimento dos testículos. A falta de significância estatística destes valores não permite chegar a essa conclusão. Note-se no entanto a proximidade dos valores obtidos para os grupos que consumiram selénio.

4.6.4 Massa do Cérebro

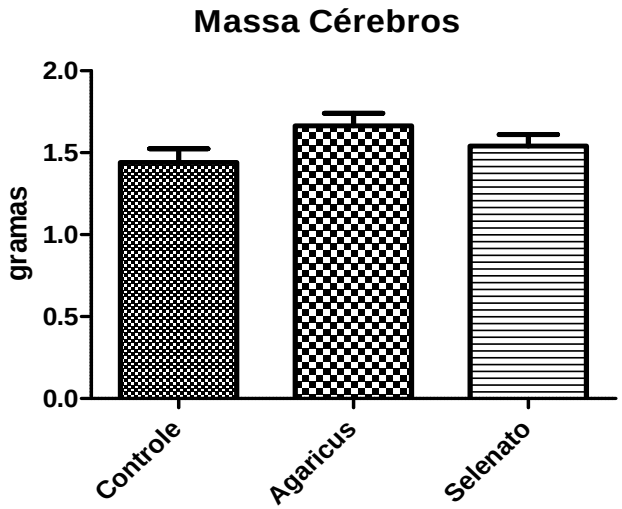

Figura 35 – Massa média dos cérebros (Controlo: 1,44 g; Agaricus: 1,66 g; Selenato: 1,54 g).

O facto de neste caso o grupo Agaricus apresentar um valor ligeiramente inferior aos outros dois grupos, e por sua vez o grupo do selenato apresentar um valor superior ao do grupo de controlo, não permite concluir que o selénio favorece o crescimento da massa cerebral, pois os valores obtidos não são estatisticamente significativos.

4.7 Quantidade Proteína em todos os Órgãos em Análise

A quantidade de proteína em cada órgão removido foi determinada, de forma a verificar se o selénio interfere na concentração de proteína presente. Os resultados obtidos apresentam-se na figura 36, estando os resultados em miligramas (mg) de proteína por grama (g) de órgão em questão.

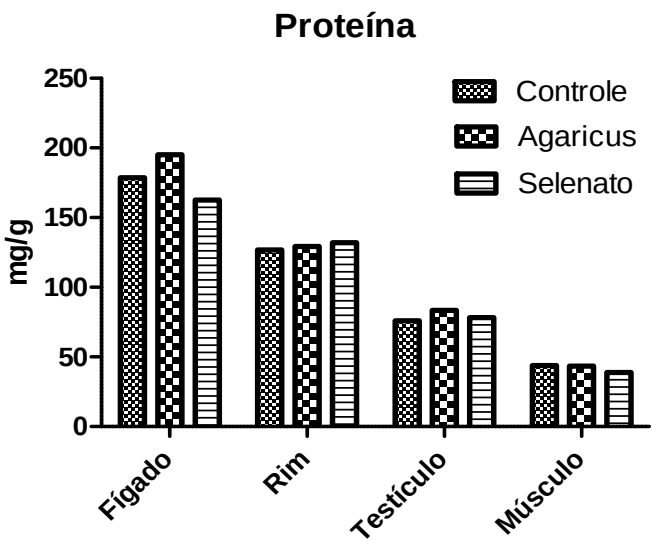

Figura 36 – Quantificação da proteína no fígado (Controlo: 178,73 mg/g; Agaricus: 195,11 mg/g; Selenato: 162,54 mg/g), no rim (Controlo: 126,70 mg/g; Agaricus: 129,30 mg/g; Selenato: 131,99 mg/g) no testículo (Controlo: 75,86 mg/g; Agaricus: 83,33 mg/g; Selenato: 78,32 mg/g) e no músculo (Controlo: 43,82 mg/g; Agaricus: 43,44 mg/g; Selenato: 38,83 mg/g)

O grupo que apresenta níveis mais elevados de proteína no fígado é o Agaricus, ou seja, o que consumiu o cogumelo, sendo o grupo que consumiu selenato aquele que apresenta níveis mais baixo. Para o caso do rim, os grupo que consumiram selénio apresentam níveis mais elevados de proteína que o grupo de controlo, sendo o grupo que consumiu selenato o que apresenta os níveis mais elevados. Já no testículo, verifica-se que os níveis de proteína são superiores no grupo que consumiu selénio orgânico, seguido do grupo que consumiu selénio inorgânico, sendo portanto o grupo de controlo o que apresenta níveis mais baixo. O músculo do grupo de controlo é o que apresenta maiores quantidades de proteína, sendo o grupo do selenato o que apresenta os níveis menores.

Comparando os órgãos entre eles, verifica-se graças à figura anterior que o órgão mais rico em proteína é o fígado, seguido do rim, do testículo e finalmente do músculo. No entanto, todas as verificações anteriores não podem ser associadas ao consumo, ou não, de selénio, pois os resultados obtidos não são estatisticamente significativos. Embora haja algumas alterações, estas não podem ser associadas à dieta.

4.8 Actividade da Catalase em todos os Órgãos em Estudo

Foi determinada a actividade da catalase, em cada órgão removido, apresentando os valores médios para cada grupo e para cada órgão na figura 37. Os resultados são apresentados em µmolH_2O_2/min./mg (µmol de peróxido de hidrogénio por minuto e por miligrama de órgão em questão).

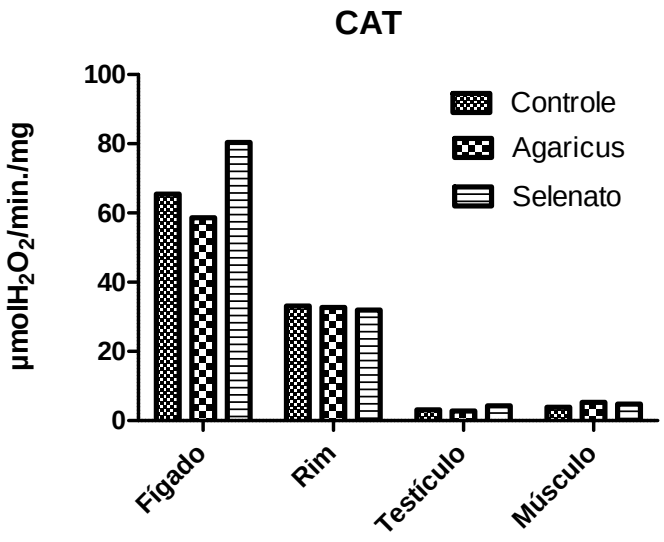

Figura 37 – Actividade da CAT no fígado (Controlo: 65,49; Agaricus: 58,63; Selenato: 80,38), no rim (Controlo: 33,12; Agaricus: 32,70; Selenato: 31,92), no testículo (Controlo: 3,10; Agaricus: 2,81; Selenato: 4,27) e no músculo (Controlo: 3,85; Agaricus: 5,29; Selenato: 4,81)

O fígado apresenta elevados níveis de actividade desta enzima no grupo do selenato, sendo inclusivamente o grupo que apresenta uma maior actividade. Neste órgão, o grupo Agaricus é o que apresenta uma menor actividade enzimática. No rim, os níveis de actividade são muito próximos entre os três grupos estudados. No entanto, o grupo de controlo apresenta níveis ligeiramente superiores aos outros dois, enquanto o do selenato é o que apresenta os níveis mais baixos. No que toca ao testículo, o grupo de animais que consumiu a ração enriquecida com selénio inorgânico apresenta níveis de actividade de catalase relativamente superiores aos outros dois grupos em estudo, sendo os níveis de actividade enzimática mais baixos no testículo dos animais que consumiram ração enriquecida com *Agaricus bisporos*.

Os níveis de actividade desta enzima, no músculo, são mais elevados no grupo que teve o cogumelo na sua ração, tendo o de controlo níveis de actividade mais baixo de entre os três grupos em estudo.

Como se pode verificar, o fígado é o local que apresenta uma maior actividade da catalase, seguido pelo rim, enquanto o testículo e o músculo apresentam uma actividade significativamente inferior a estes dois órgãos. O fígado apresenta valores de actividade de catalase até 20 vezes superior ao caso dos testículos e do músculo, chegando a ser quase 2,5 vezes superior à registada no rim.

Estas diferenças verificadas, tanto entre os grupos como entre os órgãos, não podem ser associadas ao consumo de selénio, isto é, dado que os resultados obtidos não são estatisticamente significativos, não se pode afirmar que o responsável por estas diferenças de actividade da catalase seja o selénio.

4.9 Actividade da Superóxido Dismutase em todos os Órgãos em Estudo

A actividade da superóxido dismutase foi também determinada, para cada grupo e para cada órgão, estando os resultados obtidos na figura 38. Os resultados estão apresentados em Z/mg (unidade de actividade por miligrama de órgão em questão).

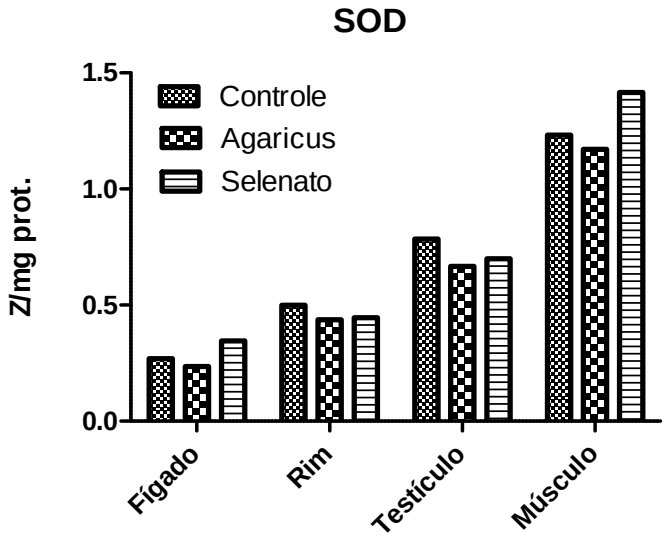

Figura 38 – Actividade da SOD no fígado (Controlo: 0,27 Z/mg; Agaricus: 0,24 Z/mg; Selenato: 0,35 Z/mg), no rim (Controlo: 0,50 Z/mg; Agaricus: 0,44 Z/mg; Selenato: 0,45 Z/mg), no testículo (Controlo: 0,78 Z/mg; Agaricus: 0,68 Z/mg; Selenato: 0,70 Z/mg) e no músculo (Controlo: 1,23 Z/mg; Agaricus: 1,17 Z/mg; Selenato: 1,42 Z/mg)

No fígado, verifica-se que o grupo selenato apresenta níveis mais elevados de actividade de superóxido dismutase, enquanto o Agaricus é o que apresenta níveis mais baixos.

O grupo de controlo do rim é o que apresenta uma maior actividade de superóxido dismutase, sendo novamente o grupo que consumiu selénio orgânico o que apresenta níveis mais baixos de actividade desta enzima. No caso do testículo, uma vez mais, o grupo que consumiu o cogumelo é o que apresenta níveis mais baixo de actividade, e como no caso do rim, aquele que apresenta os níveis mais elevados é o grupo de controlo. Finalmente no músculo, uma vez mais o grupo que apresenta os níveis mais baixos é o grupo do *Agaricus bisporos*, sendo os níveis mais elevados, como sucedido no fígado, a cargo do grupo que consumiu selenato.

O gráfico "geral" obtido é simétrico aos obtidos para a quantificação da proteína e para a actividade da catalase. De facto, neste caso, o fígado deixa de ser o elemento

com mais actividade passando a ser o que tem menos, ao passo que, o músculo deixou de ser o menos significante, passando a ser o que apresenta uma actividade mais importante, no caso desta enzima.

A falta de significância estatística dos resultados obtidos não permite no entanto afirmar que o responsável por esta diferença seja o selénio, ou a falta dele.

4.10 Concentração da Glutationa Reduzida em todos os Órgãos em Estudo

A figura 39 resume a concentração de GSH em cada órgão, e de cada grupo, estando os resultados apresentados em mM/g (milimolar por grama de órgão).

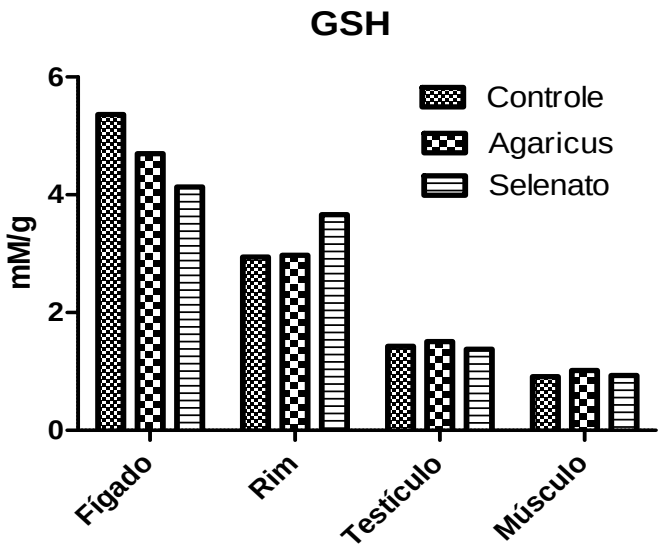

Figura 39 – Concentração de GSH no fígado (Controlo: 5,36 mM/g; Agaricus: 4,70 mM/g; Selenato: 4,13 mM/g), no rim (Controlo: 2,94 mM/g; Agaricus: 2,98 mM/g; Selenato: 3,66 mM/g), no testículo (Controlo: 1,47 mM/g; Agaricus: 1,51 mM/g; Selenato: 1,38 mM/g) e no músculo (Controlo: 0,91 mM/g; Agaricus: 1,02 mM/g; Selenato: 0,93 mM/g)

No fígado, o grupo de controlo apresenta concentrações mais elevadas em glutationa reduzida que os grupos que consumiram selénio. O grupo que apresenta concentrações mais baixas é o grupo que consumiu selénio inorgânico, isto é, selenato. Neste órgão, e comparando o grupo de controlo com o grupo do selenato, pode-se afirmar que o consumo de selénio inorgânico tem uma influência nas concentração de GSH, ou seja, o consumo de selenato diminui os níveis de glutatião no fígado. No caso do rim, contrariamente ao que acontece no fígado, o grupo de controlo é o que apresenta menores concentrações de GSH, ao passo que o grupo do selenato é o que apresenta maiores concentrações de glutationa reduzida.

Analisado o testículo, verifica-se que os níveis de GSH em ambos os grupos são relativamente próximos, embora no grupo Agaricus esses níveis sejam ligeiramente superiores aos outros dois e no do selenato sejam inferiores. Este equilíbrio nos níveis de GSH em cada grupo também se verifica no caso do músculo. Assim como no testículo, o grupo Agaricus é o que apresenta níveis ligeiramente superiores, mas neste caso, o grupo que apresenta concentrações mais baixas é o de controlo.

Assim como sucedido para o caso da actividade da catalase, que era mais importante no fígado, a GSH mostra estar em maiores concentrações neste órgão, tendo uma concentração inferior no rim, e apresentando os seus níveis mais baixos no testículo e no músculo.

Exceptuando a conclusão feita no caso do fígado, os restantes resultados não permitem afirmar que o selénio tem uma influência na presença de glutationa reduzida no organismo.

4.11 Selénio

Além de ter sido determinado nas comidas utilizadas para esta actividade experimental, o selénio presente em cada órgão, assim como na urina e nas fezes, no coágulo e soro sanguíneo, foi também ele analisado, de forma a comparar a biodisponibilidade deste oligoelemento em cada órgão e tentar estabelecer alguma ligação entre o tipo de selénio consumido (orgânico ou inorgânico) e a biodisponibilidade, assim como a possível excreção de uma das formas, ou ambas, pela via urinária ou fecal.

4.11.1 Selénio no Fígado

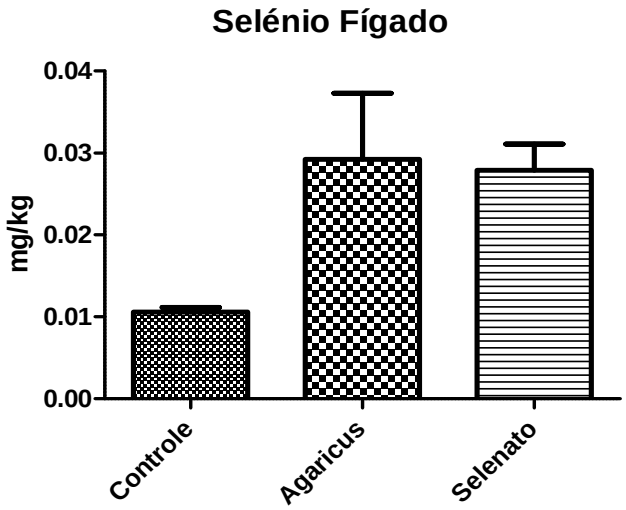

Figura 40 – Concentração média de Selénio no fígado (Controlo: 0,0106 mg/kg; Agaricus: 0,0292 mg/kg; Selenato: 0,0279 mg/kg).

Graças a estes resultados, conclui-se que o consumo de cogumelo orgânico, neste caso o consumo de ração enriquecida com cogumelo *Agaricus bisporos*, aumenta a biodisponibilidade de selénio no fígado. No entanto, os resultados não são suficientes para tirar as mesmas conclusões em relação ao consumo de selenato, mesmo tendo este grupo uma maior concentração de selénio nos seus fígados.

4.11.2 Selénio no Rim

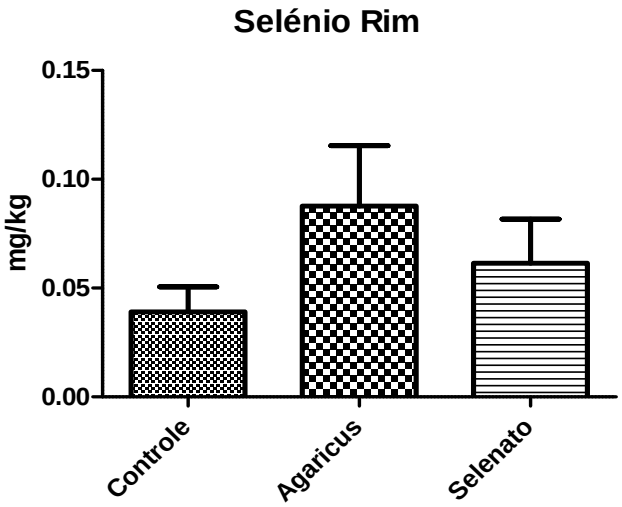

Figura 41 – Concentração média de selénio no rim (Controlo: 0,0391 mg/kg; Agaricus: 0,0878 mg/kg; Selenato: 0,0615 mg/kg).

Verifica-se que no rim, como aconteceu no fígado, o grupo que apresenta maiores concentrações de selénio é o grupo que consumiu ração enriquecida com *Agaricus bisporos*, enquanto o grupo de controlo é aquele que apresenta níveis mais baixos deste elemento. Estes resultados não permitem no entanto afirmar que o consumo do cogumelo favorece a fixação de selénio nos rins, isto porque os resultados obtidos não são estatisticamente significativos.

4.11.3 Selénio no Testículo

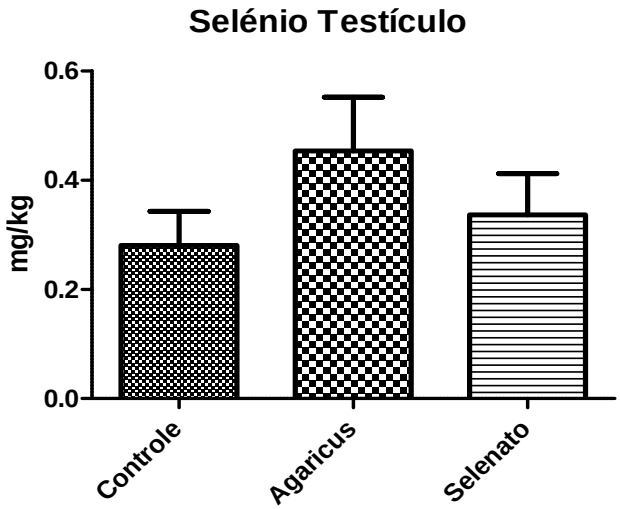

Figura 42 – Concentração média de selénio no testículo (Controlo: 0,2801 mg/kg; Agaricus: 0,4532 mg/kg; Selenato: 0,3360 mg/kg).

Os resultados obtidos para a análise de selénio no testículo dos diferentes grupos não permitem afirmar que o consumo de cogumelo é mais eficiente no que toca à biodisponibilidade de selénio neste órgão, quando comparado com o consumo de selenato. No entanto, a tendência dos dois órgãos anteriores mantém-se, sendo o grupo que consumiu a ração enriquecida com cogumelo aquele que apresenta maiores concentrações de selénio, e o grupo de controlo é, naturalmente, aquele que apresenta níveis mais baixos de selénio.

4.11.4 Selénio no Músculo

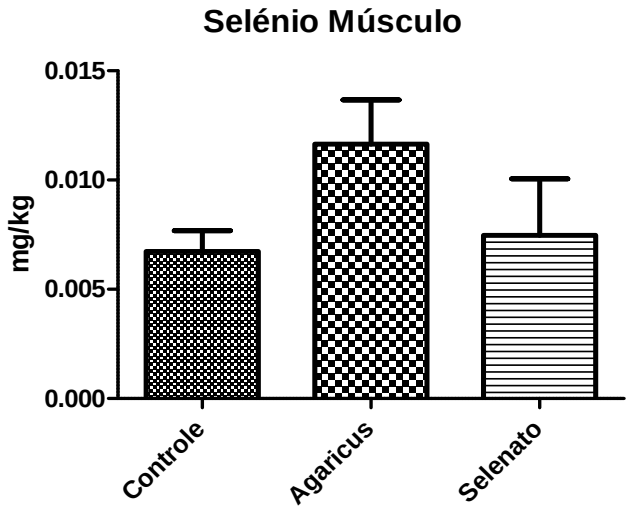

Figura 43 – Concentração média de selénio presente no músculo (Controlo: 0,0067 mg/kg; Agaricus: 0,0116; Selenato: 0,0075 mg/kg)

Analisando o músculo de cada um dos grupos em estudo, verifica-se que, uma vez mais, o grupo Agaricus é aquele que apresenta níveis mais elevados de selénio, cabendo uma vez mais ao grupo de controlo ser o que apresenta as mais baixas concentrações do elemento em estudo. As diferenças obtidas não têm significância estatística, pelo que não é possível afirmar que a diferença obtida entre os diferentes grupos se deva ao consumo de selénio.

4.11.5 Selénio no Coração

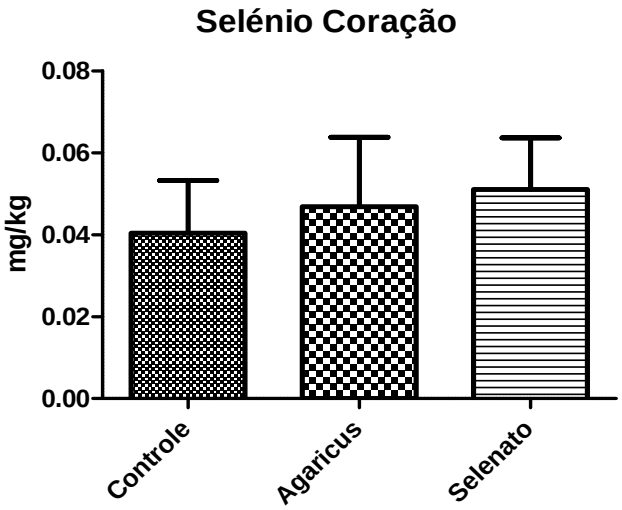

Figura 44 – Concentração média de selénio no coração (Controlo: 0,0403 mg/kg; Agaricus: 0,0469 mg/kg; Selenato: 0,0510 mg/kg).

O estudo do coração mostra uma diferença em relação aos órgãos anteriores: nesta situação, é o grupo do selenato que apresenta maiores concentrações de selénio, sendo obviamente o grupo de controlo o que apresenta as menores concentrações. No entanto, os valores obtidos não apresentam diferenças consideradas significativas para que se possa afirmar que essas variações se devem ao consumo do selénio.

4.11.6 Selénio no Cérebro

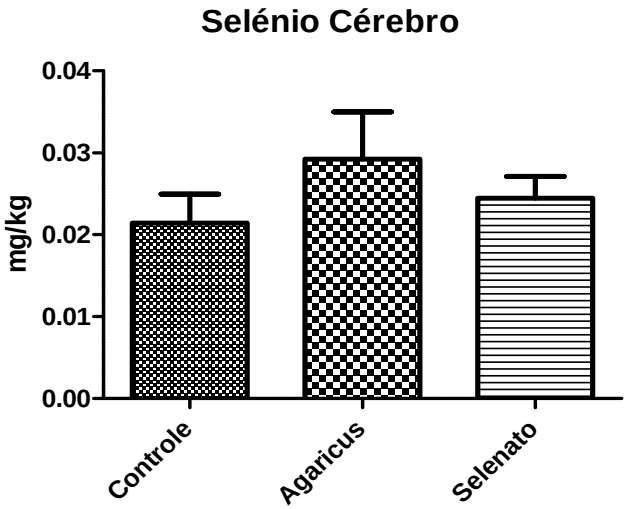

Figura 45 – Concentração média de selénio no cérebro (Controlo: 0,0214 mg/kg; Agaricus: 0,0292 mg/kg; Selenato: 0,0244 mg/kg).

Relativamente aos cérebros, a tendência observada nos órgãos analisados anteriormente volta a verificar-se, isto é, o grupo Agaricus é aquele que apresenta os níveis de selénio mais elevados em comparação com os outros dois, enquanto o grupo de controlo continua a ser o mais pobre neste oligoelemento. As diferenças não são no entanto significativamente diferentes para se poder afirmar que se devem ao consumo ou ao não consumo de selénio.

4.11.7 Selénio no Coágulo Sanguíneo

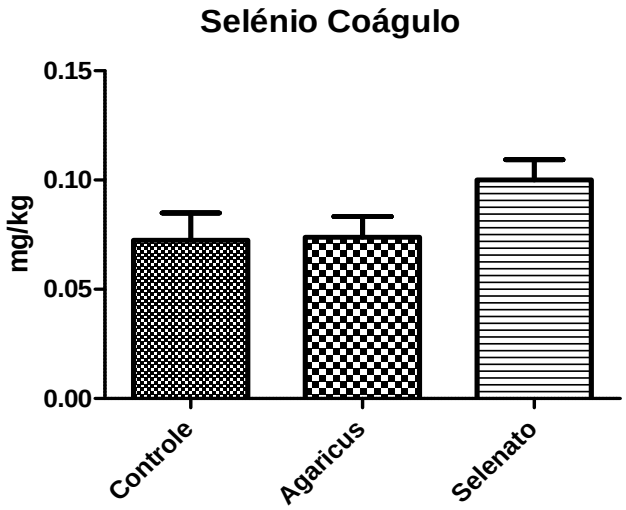

Figura 46 – Concentração média de selénio no coágulo (Controlo: 0,0724 mg/kg; Agaricus: 0,0738 mg/kg; Selenato: 0,1000 mg/kg)

Vendo os resultados obtidos para a análise do coágulo, verifica-se que tal como coração, o grupo que consumiu selénio inorgânico é aquele que tem maiores concentrações de selénio, voltando o grupo de controlo a ser o mais pobre. As diferenças obtidas entre cada grupo não permitem no entanto concluir que as maiores concentrações obtidas para o grupo selenato se devem à dieta enriquecida deste elemento inorgânico.

4.11.8 Selénio no Soro Sanguíneo

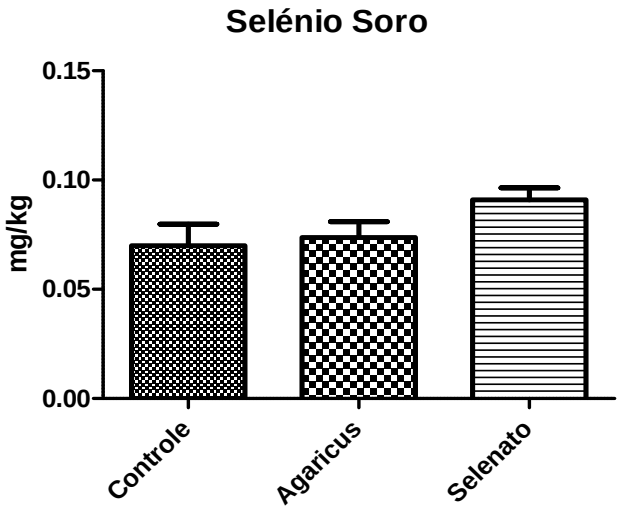

Figura 47 – Níveis de selénio no soro (Controlo: 0,0700 mg/kg; Agaricus: 0,0737 mg/kg; Selenato: 0,0909 mg/kg)

As diferenças obtidas nestes resultados, nomeadamente do grupo do selenato comparativamente ao grupo de controlo e ao grupo Agaricus, não podem ser associadas à dieta dos animais, isto porque os resultados obtidos não são estatisticamente significativos.

4.11.9 Selénio no Rato

A figura 48 mostra-nos os resultados obtidos, juntos no mesmo gráfico, permitindo uma fácil visualização dos locais de maior acumulação de selénio no rato.

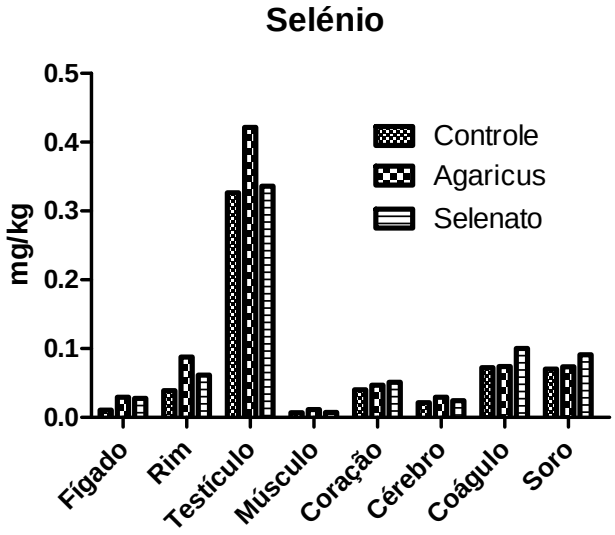

Figura 48 – Concentração de selénio em todos os órgãos e fluidos analisados

O testículo é, incontestavelmente, o órgão que mais selénio acumula, havendo também concentrações importantes deste elemento no sangue (tanto coágulo como soro), com valores próximos dos obtidos para o rim. O músculo apresenta-se relativamente pobre em selénio, enquanto o coração e o cérebro têm níveis relativamente próximos um do outro.

4.11.10 Evolução de Selénio na Urina

Os animais foram ciclicamente e periodicamente colocados em gaiolas metabólicas, permitindo assim a recolha de urina e fezes. Assim, é possível estabelecer um controlo periódico da excreção de selénio, tanto pela via urinária como pela via fecal. Os valores médios de cada grupo, ao longo do tempo, aparecem explicitados na tabela 7.

Tabela 7 – Concentração média de selénio na urina de cada grupo, ao longo da actividade experimental

Grupo	Dia 0	Dia 15	Dia 30
Controlo	0,02520	0,00717	0,02773
Agaricus	0,03287	0,02015	0,02634
Selenato	0,02912	0,01568	0,02690

Os resultados obtidos mostram um pico inicial de concentração em selénio, o que nos indica que a comida com que foram alimentados os animais, até à data do início da actividade, era relativamente rica em selénio. A partir do dia de início da experiência, a quantidade de selénio excretada na urina foi diminuindo, voltando a aumentar até ao final do trabalho. Para o grupo de controlo, comparando os resultados do dia 0 com os do dia 15, e estes últimos com os do dia 30, os resultados são estatisticamente significativos, não tendo significância quando comparados os dias 0 e 30. Isto também acontece no grupo do selenato, mas no caso do grupo Agaricus, os resultados não são estatisticamente significativos entre eles.

As excreções de selénio ao fim dos 30 dias da actividade experimental encontram-se na figura 49.

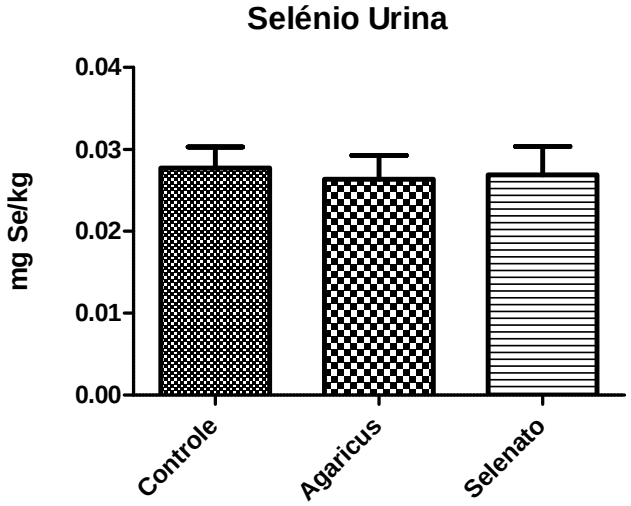

Figura 49 – Excreções de selénio na urina ao fim de 30 dias (Controlo: 0,0277 mg/kg; Agaricus: 0,0263 mg/kg; Selenato: 0,0269 mg/kg)

Estes resultados não são estatisticamente significativos, no entanto, verifica-se que mesmo decorridos os 30 dias após o início da actividade experimental, o grupo de controlo continua a excretar selénio pela via urinária, sendo inclusivamente esse o grupo que apresenta maiores níveis desse elemento na urina.

4.11.11 Evolução de Selénio nas Fezes

Da mesma forma que a urina, os mesmos dados foram recolhidos e analisados para as fezes, estando presente na tabela 8 os dados relativos às concentrações de selénio nas fezes ao longo da actividade experimental.

Tabela 8 – Concentrações médias de selénio nas fezes em cada um dos grupos nos 30 dias de trabalho

Grupos	Dia 0	Dia 15	Dia 30
Controlo	0,15356	0,04855	0,06904
Agaricus	0,15565	0,08148	0,09005
Selenato	0,12352	0,04134	0,05151

Como aconteceu com a urina, no dia de início da actividade, as fezes recolhidas continham elevados níveis de selénio, níveis esses que diminuíram até ao 15º dia, voltando então a aumentar, embora de forma mais ligeira do que no caso das urinas, até ao final da actividade experimental.

Em todos os grupos analisados, os resultados obtidos foram estatisticamente significativos comparando o dia 0 como dia 15, e o dia 0 com o dia 30. Comparando os valores obtidos para os dias 15 e 30, a diferença deixa de ter significância estatística.

Os níveis médios de selénio nas fezes, findos os 30 dias da actividade, encontram-se representados na figura 50.

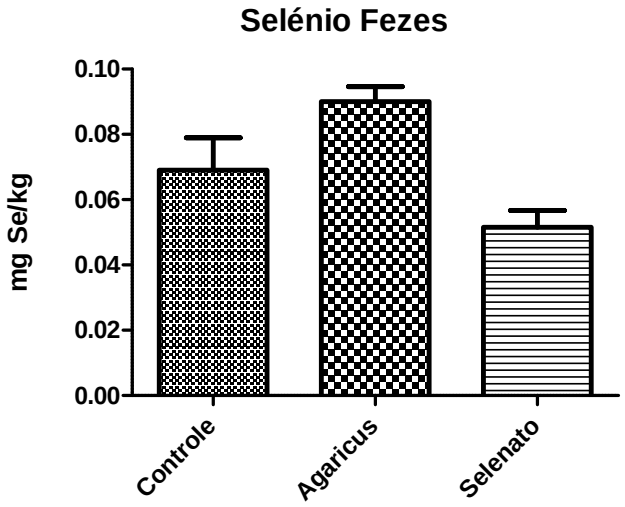

Figura 50 – Concentração de selénio nas fezes ao fim de 30 dias (Controlo: 0,0690 mg/kg; Agaricus: 0,0901 mg/kg; Selenato: 0,0515 mg/kg)

Da mesma forma como o que aconteceu com a urina, o grupo de controlo apresenta níveis importantes de excreção de selénio pela via fecal, tendo mesmo excreções mais elevadas que o grupo que consumiu selénio inorgânico. Note-se que os resultados não são estatisticamente significativos.

5.Discussão

As pesquisas levadas a cabo nos últimos anos, sobre o selénio, têm demonstrado o importante papel deste elemento e dos seus metabolitos no combate às doenças humanas, como o cancro e doenças cardíacas (Tinggi, 2008).

Existe alguma informação sobre os efeitos do estilo de vida nas necessidades de selénio, tais como o aumento do stress oxidativo, e por consequente das necessidades em antioxidantes, devido ao tabaco (Thomas, 1995). Outros estudos ainda comparam o destino metabólico do selénio inorgânico (selenito e selenato) ou da selenometionina (SeMet) obtidos através da comida ou de suplementos (Finley, 1999; Hawkes, 2003). Estes estudos mostraram que, para além da forma química do selénio ingerido e do estado de selénio no indivíduo, outros factores tais como a idade, o consumo de álcool, o hábito de fumar e terapias hormonais também podem afectar o metabolismo do selénio e o seu estado (Luty-Frackiewicz, 2002; Arnaud et al., 2007).

Os conhecimentos sobre a absorção do selénio presente na comida ou suplementos não permitem prever a sua utilização, isto porque a biodisponibilidade depende da conversão do selénio absorvido sob a forma biologicamente activa e da retenção nos tecidos (King, 2001).

Ao analisar o ganho de peso de cada grupo de animais, verifica-se que o que consumiu o cogumelo foi o que mais massa adquiriu, tendo o grupo que consumiu selenato sido aquele que menos peso ganhou, não sendo no entanto a diferença significativa. Burk e colaboradores (1972) verificaram que o grupo que consumiu selénio inorgânico aumentou mais de peso do que o grupo de controlo (Burk et al., 1972).

De acordo com Brown e Arthur (2001), o nível de selénio nos tecidos é influenciado pelo tipo de dieta, porém verificamos que tanto o grupo Agaricus como o grupo selenato apresentam quantidades de selénio mais importantes nos seus tecidos, quando comparados com o grupo de controlo. Ainda que as diferenças não sejam significativas entre os dois grupos tratados com selénio, verificamos que o grupo Agaricus é o que apresenta em geral níveis de selénio mais elevados, excepção feita para o caso do coração e do sangue (soro e coágulo), tecidos estes que se apresentaram mais ricos em selénio no grupo selenato.

No presente trabalho, verificou-se que os testículos e o coágulo apresentam níveis mais elevados em selénio do que os rins, o fígado e o plasma, tendo o músculo os

níveis mais baixo, resultados estes semelhantes aos obtidos por Beilstein (1986). O maior aumento registou-se, em ambos os tecidos, no grupo que consumiu o cogumelo. Behne e colaboradores (1986) verificaram que a quantidade de selénio aumenta nos testículos, fígado e músculo, com o tempo, quando os animais são submetidos a uma dieta que contem selénio (Behne et al., 1986). Verificaram nomeadamente que os ratos que atingem a maturidade têm tendência em acumular mais selénio, sobretudo nos testículos.

Shiobara e colaboradores (2000) verificaram que, nos animais, o selénio proveniente da dieta pode ser armazenado sob a forma de selénio endógeno em determinados órgãos, tais como o cérebro e os testículos (Shiobara et al., 2000). De facto, os resultados por nós obtidos apontam nesse sentido, registando-se para o caso do cérebro e dos testículos um aumento natural de selénio, em comparação com o grupo de controlo, sendo este aumento mais importante para os animais que consumiram o cogumelo. Esta tendência mantém-se para os outros órgãos em estudo, pois o fígado, o rim, mas também o músculo apresentam um aumento dos níveis de selénio nos grupos que consumiram selénio, sendo esse aumento mais importante no grupo que consumiu a ração enriquecida com cogumelo.

A falta de significância estatística para as diferenças de concentração obtidas para o selénio no músculo foi também relatada por Cary e colaboradores (1973). Níveis de selénio, nas dietas, inferiores a 0,1 ppm, independentemente da forma de selénio presente (selenito, selenometionina ou grãos seleníferos), não fornecem diferenças significativas de selénio nos tecidos dos animais (Cary et al., 1973), e, como se pode verificar pelos resultados obtidos, as diferenças de concentração de selénio nos tecidos musculares dos animais não são estatisticamente significativas, havendo, no entanto, uma maior concentração de selénio nos grupos que tiveram esse elemento nas suas dietas. As diferenças obtidas entre os grupos que consumiram selénio e o grupo de controlo podem ser explicadas, segundo Daniels (1996) pelo imediato armazenamento através da incorporação inespecífica no músculo esquelético.

Relativamente ao coração, ao soro e ao coágulo sanguíneo, também se verificou um aumento da concentração em selénio, mas para estas situações, o aumento foi mais importante para o grupo que consumiu selénio inorgânico.

Os níveis de selénio no coração foram superiores aos obtidos no músculo, estando em concordância com o trabalho de Casey e colaboradores (1982), sendo que os

níveis de selénio obtidos no cérebro são relativamente baixos, concordando com os resultados descritos noutros trabalhos (Combs, 1984; Oster et al., 1988).

Em estudos realizados na Finlândia, Levander e colaboradores (1983, 1985) usaram selenato para determinar a biodisponibilidade de diferentes formas de selénio (Levander et al., 1983; Levander et al., 1985). Nesses estudos foi concluído que o selenato não aumenta significativamente o nível de selénio no sangue quando comparados os resultados obtidos com selénio orgânico, o que está de acordo com os nossos resultados. De facto, o grupo que consumiu selenato apresentou os níveis de selénio ligeiramente superiores aos do grupo que consumiu o cogumelo, que por sua vez tem níveis superiores ao grupo de controlo. Isto verificou-se tanto no soro como no coágulo. No entanto, a diferença registada não é estatisticamente significativa

Estes resultados estão por isso de acordo com os resultados descritos por outros autores, como Burk e colaboradores (2001), segundo os quais este elemento pode estar presente ligado a proteínas e livres no plasma e outros tecidos. Verifica-se de facto uma presença, mais ou menos importante, de selénio em todos os órgãos, tecidos e fluidos analisados, o que sugere que este elemento se acumula em diversos locais e pode também encontrar-se a circular livremente pelo organismo, ou ligado a proteínas. Quando comparados estes dados com as quantidades de proteína no órgãos analisados (fígado, rim, testículo, músculo), verifica-se que os animais que consumiram a ração enriquecida com *Agaricus bisporos* apresentam concentrações mais importantes de proteína nesses mesmos órgãos, com excepção do rim, em que o grupo que consumiu selenato apresenta uma quantidade ligeiramente superior de proteína. Ou seja, verifica-se uma boa correlação entre a quantidade de proteína e a concentração de selénio, obtendo-se níveis de selénio mais elevados naqueles órgãos que apresentam níveis de proteína superiores, de acordo com o que foi também verificado por Burk e colaboradores (1972).

Tal como no estudo realizado por Thomson e colaboradores (1982), as actividades enzimáticas mantiveram-se em níveis elevados após os 30 dias, em ambos os grupos. Verificou-se que após os 30 dias em que este grupo deixou de consumir selénio, as actividades enzimáticas se mantiveram a níveis próximos dos obtidos para os outros grupos, sendo até inclusivamente superiores nalguns casos, como por exemplo os casos da SOD no rim e no testículo, ou ainda da CAT, também no rim.

Viljoen e Tappel (1998) verificaram um aumento de actividade da SOD no fígado e no rim de animais que consumiram selénio, estando os nossos resultados

parcialmente de acordo com os obtidos por estes autores. Os dados obtidos neste trabalho mostram de facto um aumento de actividade dessa enzima no fígado dos animais que consumiram selénio inorgânico, mas no caso do rim tal não se verifica. Neste último, o grupo de controlo apresentou uma maior actividade. No músculo também se verificou uma maior actividade da SOD no grupo selenato quando comparado com o grupo de controlo e o grupo Agaricus. No caso do testículo, assim como sucedeu com o rim, o grupo de controlo foi o que apresentou uma maior actividade de superóxido dismutase, sendo, também nestes dois órgãos, no grupo Agaricus que se verifica uma menor actividade.

Visto a SOD ser uma das primeiras enzimas de defesa contra danos nas células provocados pelos radicais livres, o aumento da sua actividade pode dever-se a uma resposta protectora a elevados níveis desses radicais livres (Alscher et al., 1997), sendo o aumento da sua actividade uma consequência dos mecanismos de defesa intracelular em que participa (Galhano et al., 2010). A sua diminuição no rim pode ser devida a uma baixa expressão do gene da SOD em consequência do stresse oxidativo (Wang et al., 2001).

A catalase revelou ter actividades diferentes nos vários tecidos estudados, consoante o grupo. No caso do fígado e do testículo, o grupo selenato apresentou os níveis mais elevados de actividade de catalase, enquanto no rim, o grupo que apresentou maior actividade enzimática foi o de controlo. No músculo, foi o grupo Agaricus que apresentou valores de actividade de catalase superiores aos dois outros grupos.

A partir do momento que a taxa de H_2O_2 se eleva, podendo esta molécula constituir de substrato para formar HO^-, acredita-se que a catalase tenha um papel importante como mecanismo de defesa antioxidante celular, limitando a acumulação de H_2O_2 (Ho et al., 2004).

Sendo a GSH um componente do ciclo *redox* da glutationa, as alterações dos seus níveis de concentração são dependentes dos níveis de selénio, esteja ele em excesso ou em deficiência. Assim, no caso de músculo, testículo e rim, há uma maior concentração natural em GSH nos animais que consumiram selénio. No caso do grupo Agaricus o músculo e o testículo foram os que apresentaram maior conteúdo em GSH, enquanto que no grupo do selenato, o maior conteúdo em GSH foi observado no rim. Este aumento no rim pode estar associado a uma redução mais eficiente dos radicais livres e um aumento da capacidade antioxidante das células (Groussard et al., 2003).

No entanto, no caso do fígado, verifica-se uma maior concentração em GSH no grupo de controlo. Isto pode dever-se a um excesso de iões de selénio nos grupos Agaricus e selenato, que interagem com a GSH intracelular e reduzem a sua concentração (Dickson and Tappel, 1969; Ganther, 1986). Esta diminuição pode estar associada a danos celulares e a uma diminuição da eficiência do sistema imunitário, que poderá ser compensada com a suplementação de vitamina C e E (Shang et al., 2003).

Quando comparados os resultados obtidos neste trabalho com os obtidos em outros estudos (Robinson et al., 1978; Alfthan et al., 1991; Thomson et al., 1978) relativamente ao selénio excretado pela via urinária, chega-se à mesma conclusão: os níveis de selénio são, embora muito ligeiramente, superiores nos grupos que consumiram selénio inorgânico, sendo a excreção de selénio orgânico inferior. A concentração em selénio, após os 30 dias, é superior no grupo de controlo, sendo mais baixa no grupo Agaricus. Tal como no trabalho realizado por Alfthan e colaboradores, (1991) os resultados obtidos neste trabalho não têm relevância estatística, sendo muito próximos uns dos outros.

Nas fezes, após os 30 dias de experiência, verifica-se que as fezes excretadas pelo grupo que consumiu a ração enriquecida com *Agaricus bisporos* são mais ricas em selénio, sendo as fezes dos animais que consumiram selénio inorgânico as mais pobres neste elemento. No entanto, as diferenças obtidas não são estatisticamente significativas.

6 Conclusão

Em geral, o selénio orgânico apresenta uma maior biodisponibilidade que o selénio inorgânico, sendo mais eficazmente armazenado nos tecidos. No entanto, no que toca às actividades enzimáticas, a forma de selénio ingerido não parece ter uma influência relevante.

De forma a poder tirar conclusões quanto à biodisponibilidade do selénio em função da forma ingerida, seria conveniente aumentar o tempo de ensaio. No caso de se pretender manter uma actividade de 30 dias, seria indicado alimentar os animais, ainda antes de iniciar a actividade, com a ração de controlo, permitindo assim iniciar o trabalho com os níveis de selénio no organismo dos animais os mais baixos possíveis.

7 Bibliografia

Alfthan, G., Aro, A., Arvilommi, H., & Huttunen, J. K. (1991). Selenium metabolism and platelet glutathione peroxidase activity in healthy Finnish men: effects of selenium yeast, selenite, and selenate. *Am J Clin Nutr, 53*(1), 120-125.

Allan, C. B., Lacourciere, G. M., & Stadtman, T. C. (1999). Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Annual Review of Nutrition*, *19*, 1-16.

Alscher, R.G., Donahue, J.L., Cramer, C.L. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells. *Physiol Plant*. 100, 224-233.

Amorim, S.L., Oliveira, A.C., Franklin, R.C., Simões, S.V., Medeiros, R., Clementino, I.J. (2005). Distrofia Muscular Nutricional em Ovinos na Paraíba. *Pesq Vet Bras*, 25(2):120-124.

Ansari, M. A., Ahmad, A. S., Ahmad, M., Salim, S., Yousuf, S., Ishrat, T., & Islam, F. (2004). Selenium protects cerebral ischemia in rat brain mitochondria. *Biol Trace Elem Res*, *101*(1), 73-86.

Arnaud, J., Akbaraly, N.T., Hininger, I., Roussel, A.M., Berr, C. (2007). Factors associated with longitudinal plasma selenium decline in the elderly: The EVA study. *J Nutr Biochem*. 18:482-7

Arthur, J.R., Bermano, G., Mitchell, J.H, Hesketh, J.E. (1996). Regultation of selenoprotein gene expression and thyroid hormone metabolism. *Biochem Soc Trans*, 24:384-388.

Aruoma, O.I., Halliwell, B., Gajewski, E., Dizdaroglu, M. (1989). Damage to the basis in DNA induced by hudrogen peroxide and ferric ion chelates. *J Biol Chem*, 264:20.509-12.

Baldew, G., Van, C., Los, G., Goeij, J., McVie, J. (1989). Selenium-induced protection against cis-diamminedichloroplatinum (II) nephrotoxicity in mice and rats. *Cancer Res*, 49(12):3020-3.

Battin, E. E., & Brumaghim, J. L. (2009). Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochem Biophys*, *55*(1), 1-23.

Behne, D., Duk, M., & Elger, W. (1986). Selenium Content and Glutathione-Peroxidase Activity in the Testis of the Maturing Rat. *Journal of Nutrition*, *116*(8), 1442-1447.

Beilstein, M.A., Whanger, P.D. (1986). Chemical Forms of Selenium in Rat Tissues after Administration of Selenite or Selenomethionine. *Journal of Nutrition*. 1711-17.

Birringer, M., Pilawa, S., & Flohe, L. (2002). Trends in selenium biochemistry. *Nat Prod Rep*, *19*(6), 693-718.

Borges, L.P. (2008). Efeitos da administração do Disseleneto de Difenila sobre o Dano Hepático induzido por 2-Nitropropano, cádmio e tetracloreto de carbono. Santa Maria, Brasil.

Boveris, A., Chance, B. (1973). The mitochodrial generation of hydrogen peroxid - general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*, v134, p.707-716.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, *72*, 248-254.

Bratakos M.S., Zafiropoulos T.F., Siskos P.A., Ioannou P.V. (1988). Total Selenium Concentration in Tap and Bottled Drinking Water and Coastal Waters of Greece. *Sci Total Environ* 76:49-54.

Brown, K. M., & Arthur, J. R. (2001). Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr*, *4*(2B), 593-599.

Bugel, S., Larsen, E. H., Sloth, J. J., Flytlie, K., Overvad, K., Steenberg, L. C., & Moesgaard, S. (2008). Absorption, excretion, and retention of selenium from a high selenium yeast in men with a high intake of selenium. *Food Nutr Res*, *52*.

Burk, R.F., Brown, D.G., Seely, R.J., Scaief, C.C. (1972). Influence of dietary and injected selenium on whole-body retention, route of excretion, and tissue retention of $^{75}SeO_3^{2-}$ in the rat. *J Nutr*, 102:1049-1055.

Burk, R. F., Hill, K. E., & Motley, A. K. (2001). Plasma selenium in specific and non-specific forms. *Biofactors*, *14*(1-4), 107-114.

Burk, R. F., Lane, J. M., Lawrence, R. A., & Gregory, P. E. (1981). Effect of selenium deficiency on liver and blood glutathione peroxidase activity in guinea pigs. *J Nutr*, *111*(4), 690-693.

Camargo, S.M.R., Francescato, H.D.C., Lavrador, M.A.S., Bianchi, M.L.P. (2001). Oral administration of sodium selenite minimizes cisplatin toxicity on proximal tubulues of rats. *Biol Trace Elem Res*. 83(3):251-62.

Cary, E. E., Allaway, W. H., & Miller, M. (1973). Utilization of Different Forms of Dietary Selenium. *Journal of Animal Science*, *36*(2), 285-292.

Casey, C.E., Guthrie, B.E., Friend, G.M., Robinson, M.F. (1982). Selenium in human tissues from New Zealand. *Arch Environ Health*. 37, 133-135.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (1984). Selenium intoxication-New York. *Morbid Mortal Wkly Rep*, 33:157-158.

Chow, C. K., & Tappel, A. L. (1974). Response of glutathione peroxidase to dietary selenium in rats. *J Nutr*, *104*(4), 444-451.

Combs, G.F. Jr., Combs, S.B. (1984). The nutricional biochemestry of selenium. *Annu Rev Nutr*. 4, 257-280.

Combs, G. F., Jr. (2001). Selenium in global food systems. *Br J Nutr*, *85*(5), 517-547.

Daniels, L. A. (1996). Selenium metabolism and bioavailability. *Biol Trace Elem Res*, *54*(3), 185-199.

Del Rio, L.A.,Ortega, M.G., Lopez, A.L., George, J.L. (1977). *Anal. Biochem.* 80,409-415.

Deneke, S.M., Fanburg, B.L. (1989). Regultation of cellular glutathione. *Am J Physiol*. 25:L163-73.

De Vega, L., Fernandez, R. P., Mateo, M. C. M., Bustamante, J. B., Herrero, A. M., & Munguira, E. B. (2002). Glutathione determination and a study of the activity of glutathione-peroxidase, glutathione-transferase, and glutathione-reductase in renal transplants. *Renal Failure*, *24*(4), 421-432.

Diaz Huerta, V., Fernandez Sanchez, M. L., & Sanz-Medel, A. (2006). An attempt to differentiate HPLC-ICP-MS selenium speciation in natural and selenised Agaricus mushrooms using different species extraction procedures. *Anal Bioanal Chem*, *384*(4), 902-907.

Dickson, R.C., Tappel, A.L. (1969). Reduction of selenocystine by cisteine or glutathione. *Arch Biochem Biophys*. 130, 547-550.

Dumont, E., Vanhaecke, F., & Cornelis, R. (2006). Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *385*(7), 1304-1323.

El-Demerdash, F. M. (2001). Effects of selenium and mercury on the enzymatic activities and lipid peroxidation in brain, liver, and blood of rats. *J Environ Sci Health B*, *36*(4), 489-499.

Fan A.M., Kizer K.W. (1990). Selenium-Nutritional, toxicologic and clinical aspects. *West J Med* 153:160-167.

Finley, J. W. (1998). The absorption and tissue distribution of selenium from high-selenium broccoli are different from selenium from sodium selenite, sodium selenate, and selenomethionine as determined in selenium-deficient rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(9), 3702-3707.

Finley, J.W. (1999). The Retention and Distribution by Healthy Young Men of Stable Isotopes os Selenium Consumed as Selenite, Selenate of Hydroponically-Grown Broccola Are Dependent on The Isotopic Form. *J Nutr*. 129: 865-71

Freiman, L.O., Sabaa Srur, A.U.O. (1999). Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelinas extraídas dos resíduos de abacaxizeiro. *Ciênc Tecnol Aliment*, 19(2).

Galhano, V., Peixoto, F., Gomes-Laranjo, J. (2010). Bentazon triggers the promotion of oxidative damage in the Portuguese ricefield cyanobacterium Anabaena cylindrical: response of the antioxidant system. *Wiley Periodicals*.

Ganther, H.E. (1986). Pathways of selenium metabolism including respiratory excretory products. *J Am Coll Toxicol*. 5, 1-5

Gencel, O., Naziroglu, M., Celik, O., Yalman, K., & Bayram, D. (2009). Selenium and Vitamin E Modulates Radiation-Induced Liver Toxicity in Pregnant and Nonpregnant Rat: Effects of Colemanite and Hematite Shielding. *Biol Trace Elem Res*.

Ghisleni, G.C. (2006). *Alterações Comportamentais e Neuroquímicas Causadas por Compostos Orgânicos de Selênio*. Universidade Federal de Santa Maria.

Gladyshev, V. N., Jeang, K. T., Wootton, J. C., & Hatfield, D. L. (1998). A new human selenium-containing protein. Purification, characterization, and cDNA sequence. *J Biol Chem*, *273*(15), 8910-8915.

Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*, v177, p. 751-766.

Groussard, C., Machefer, G., Rannou, F., Faure, H., Zouhal, H., Segent, O. (2003). Physical fitness and plasma non-enzymatic antioxidant status at rest and after a wingate teste. *Can J Appl Physiol*. 28(1): 79-92.

Haug A., Graham R., Christophersen O., Lyons G. (2007). How to use the world's scare selenium resources efficiently to increase the selenium concentration in food. *Microbial Ecology in Heath and Disease* 19:209-228.

Hawkes, W. C., Alkan, F. Z., & Oehler, L. (2003). Absorption, distribution and excretion of selenium from beef and rice in healthy North American men. *Journal of Nutrition*, *133*(11), 3434-3442.

Helzlsouer, K., Jacobs, R., Morris, S. (1985). Acute selenium intoxication in the United States. *Fed Proc*, 44:1670.

Ho, Y., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A., Ho, D. (2004). Mice lacking catalase develop nomally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(31): 32804-32812.

Jacob, S.W., Francone, C.A., Lossow, W.J. (1990). *Anatomia e Fisiologia Humana*. (5ª edição). Brasil: Editora Guanabara.

Jensen, R., Closson, W., Rothenberg, R. (1984). Selenium intoxication-New York. *Morbid Mortal Wkly Rep*, 33:157-158.

Jihen el, H., Imed, M., Fatima, H., & Abdelhamid, K. (2009). Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver of the rat: effects on the oxidative stress. *Ecotoxicol Environ Saf*, *72*(5), 1559-1564.

Jollow, D.J., Mitchell, J.R., Zampagline, N., et al. (1974). Bromobenzene induced liver necrosis: protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene as the hepatic metabolite. *Pharmacology*. 11, 151-169.

Júnior, L.R., Höer, N.F., Vellasco, A.P. (2001). Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos electroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quím Nova, v24, nº1*. São Paulo.

King, J. C. (2001). Effect of reproduction on the bioavailability of calcium, zinc and selenium. *J Nutr, 131*(4 Suppl), 1355S-1358S.

Klein, E. A. (2004). Selenium: epidemiology and basic science. *J Urol, 171*(2 Pt 2), S50-53; discussion S53.

Klotz, L. O., Kroncke, K. D., Buchczyk, D. P., & Sies, H. (2003). Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *Journal of Nutrition, 133*(5), 1448s-1451s.

Kruger, N. J. (1994). The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol, 32*, 9-15.

Kryukov, G.V., Castellano, S., Novoselov, S.V., Lobanov, A.V., Zehtab, O., Guigo, R., Gladyshev, V.N. (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300(5624):1439-1443.

Kyriakopoulos, A., Rothlein, D., Pfeifer, H., Bertelsmann, H., Kappler, S., & Behne, D. (2000). Detection of small selenium-containing proteins in tissues of the rat. *J Trace Elem Med Biol, 14*(3), 179-183.

Lauretani, F., Semba, R. D., Bandinelli, S., Ray, A. L., Guralnik, J. M., & Ferrucci, L. (2007). Association of low plasma selenium concentrations with poor muscle strength in older community-dwelling adults: the InCHIANTI Study. *Am J Clin Nutr, 86*(2), 347-352.

Lescure, A., Deniziak, M., Rederstorff, M., & Krol, A. (2008). Molecular basis for the role of selenium in muscle development and function. *Chem Biodivers, 5*(3), 408-413.

Levander, O.A., Alfthan, G., Arvilommi, H. (1983). Bioavailability of selenium to Finnish men as assessed by platelet glutathione peroxidase activity and other blood parameters. *Am J Clin Nutr*. 37: 887-97

Levander, O.A., Alfthan, G., Arvilommi, H. (1985). Bioavailability of selenium to Finnish men as assessed by various blood parameters. *Nutr Res*. Suppl 1: 153-5.

Lima, L.G., Domingues, J.L. (2007). Uso do Selênio na Produção de Bovinos. *Revista Electrônica Nutritime*, v4,n4,p.462-474.

Luty-Frackiewicz, A., Jethon, Z., Januszewska, L. (2002). Effect of smoking and alcohol consumption on the serum selenium level of Lower Silesian populations. *Sci Tot Environ*. 285: 89-95

Lyons, G. H., Judson, G. J., Ortiz-Monasterio, I., Genc, Y., Stangoulis, J. C. R., & Graham, R. D. (2005). Selenium in Australia: Selenium status and biofortification of wheat for better health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 19*(1), 75-82.

Manzanares, W., Biestro, A., Galusso, F., Torre, M. H., Manay, N., Pittini, G., Facchin, G., & Hardy, G. (2009). Serum selenium and glutathione peroxidase-3 activity: biomarkers of systemic inflammation in the critically ill? *Intensive Care Med*, *35*(5), 882-889.

Meister, A., Anderson, M.E. (1983). Glutahione. *Annu Rev Biochem*, 12:131-135.

McConnell, K.P., Portman, O.W. (1952). Excretion of dimethyl selenide by the rat. *J Biol Chem*, 195:277-282.

Moura, P. (2008). Determinação de elementos essenciais e tóxicos em cogumelos comestíveis por análise por activação de nêutrons.

Naziroglu, M. (2003). Enhanced testicular antioxidant capacity in streptozotocin-induced diabetic rats: protective role of vitamins C and E and selenium. *Biol Trace Elem Res*, *94*(1), 61-72.

NRC (National Research Council). (1980a). *Drinking Water and Health, Volume 3*. Washington, DC: National Academy Press.

Oster, O., Schmiedel, G., Prellwitz, W. (1988). The organ distribution of selenium in German adults. *Biol Trace Elem Res*. 15, 23-45.

Payá, M., Halliwel, B., Hoult, J.R. (1992). Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem Pharm*, 44:205-214.

Peixoto, F.P., Santos, D.L., Vilela, S., Fontaínhas-Fernandes, A. (2009). Caracterização da mitocôndria isolada de fígado de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e alterações da bioenergética mitocondrial causadas pela exposição herbicida oxifluorfena. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 61(2).

Pleban, P. A., Munyani, A., & Beachum, J. (1982). Determination of selenium concentration and glutathione peroxidase activity in plasma and erythrocytes. *Clin Chem*, *28*(2), 311-316.

Rayman, M. P. (2000). The importance of selenium to human health. *Lancet*, *356*(9225), 233-241.

Rayman, M. P. (2002). The argument for increasing selenium intake. *Proceedings of the Nutrition Society*, *61*(2), 203-215.

Rayman, M. P. (2005). Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc*, *64*(4), 527-542.

Reaner, D. C., & Veillon, C. (1983). Elimination of perchloric acid in digestion of biological fluids for fluorometric determination of selenium. *Anal Chem*, *55*(9), 1605-1606.

Rederstorff, M., Krol, A., & Lescure, A. (2006). Understanding the importance of selenium and selenoproteins in muscle function. *Cell Mol Life Sci*, *63*(1), 52-59.

Reeves, M. A., & Hoffmann, P. R. (2009). The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci*, *66*(15), 2457-2478.

Robberecht H., Van Grieken R., Van Sprundel M., Vanden Berghe D., Deelstra H. (1983). Selenium in environmental and drinking waters of Belgium. *Sci Total Environ* 26:163-172.

Robinson, M.F., Rea, H.M., Friend, G.M., Stewart, R.D.H., Snow, P.C., Thomson, C.D. (1978). On supplementing the selenium intake of New Zealanders. 2. Prolonged metabolic experiments with daily supplements of selenomethionine, selenite and fish. *Br J Nutr*. 39, 589-600

Ross, D., Moldeus, P. (1991). Antioxidant defense systems and oxidative stress. Vigo Pelfrey: Membrane lipid oxidation, 1st ed. Boca Raton, CRC Press, 151:70.

Sarmento, R. (1989). Revisões Sistemáticas em Terapia Intensiva - Suplementação de Selênio. Cap.101,p.903-911.

Saydam, N., Kirb, A., Demir, O., Hazan, E., Oto, O., Saydam, O., & Guner, G. (1997). Determination of glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase levels in human lung cancer tissues. *Cancer Lett*, *119*(1), 13-19.

Schweizer, U., Streckfuβ, F., Pelt, P., Carlson, B.A., Hatfield, L.H., Köhrle, J., Schomburg, L. (2005). Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply. *Biochem J*, 386,221-226.

Shang, F., Lu, M., Dudek, E., Reddan, J., Taylor, A. (2003). Vitamin C and vitamin E restore the resistance of GSH-depleted lens cells to H2O2. *Free Radic Biol Med*. 34(5): 521-530.

Shiobara, Y., Ogra, Y., & Suzuki, K. T. (2000). Exchange of endogenous selenium for dietary selenium as 82Se-enriched selenite in brain, liver, kidneys and testes. *Life Sci*, *67*(25), 3041-3049.

Shireen, K. F., Pace, R. D., Mahboob, M., & Khan, A. T. (2008). Effects of dietary vitamin E, C and soybean oil supplementation on antioxidant enzyme activities in liver and muscles of rats. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(10), 3290-3294.

Stadtman, T. C. (1980). Selenium-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem*, *49*, 93-110.

Stajn, A., Zikic, R. V., Ognjanovic, B., Saicic, Z. S., Pavlovic, S. Z., Kostic, M. M., & Petrovic, V. M. (1997). Effect of cadmium and selenium on the antioxidant defense system in rat kidneys. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, *117*(2), 167-172.

Tapiero, H., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2003). The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother*, *57*(3-4), 134-144.

Tavares, A.A. (2008). *Efeito de uma sessão de exercício militar severo e prolongado em marcadores plasmáticos de stress e lesão oxidativa.* Tese de Doutoramento, Faculdade de Desporto da Universidade do Porto.

Thayer, W. S. (1986). Role of catalase in metabolism of hydrogen peroxide by the perfused rat heart. *FEBS Lett*, *202*(1), 137-140.

Thomas, M.J. (1995). The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working? *Crit Rev Food Sci Nutr.* 35,21-39.

Thomson, C.D., Burton, C.E., Robinson, M.F. (1978). On supplementing the selenium intake of New Zealanders. 1. Short experiments with large doses of selenite or selenomethionine. *Br J Nutr*. 39, 579-587.

Thomson C.D., Robinson, M.F., Campbell, B.S., Heather M.R. (1982). Effect of prolonged supplementation with daily supplements of selenomethionine and sodium selenite on glutathione peroxidase activity in blood of New Zealand residents. *Am J Clin Nutr*. 36:24-31

Thomson, C.D., Robinson, M.F. (1986). Urinary and fecal excretions and absorption of a large supplement of selenium: Superiority of selenate over selenite. *Am J Clin Nutr*, 44:659-663.

Thomson, C. D. (2004). Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *Eur J Clin Nutr*, *58*(3), 391-402.

Thomson, C. E., Gibson, J. N., & Martin, D. (2004). Interventions for the treatment of Morton's neuroma. *Cochrane Database Syst Rev*(3), CD003118.

Tinggi, U. (2008). Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med*, *13*(2), 102-108.

Torres, A., Farre, R., Lagarda, M. J., & Monleon, J. (2003). Determination of glutathione peroxidase activity in human milk. *Nahrung-Food*, *47*(6), 430-433.

Turan, B., Acan, N. L., Ulusu, N. N., & Tezcan, E. F. (2001). A comparative study on effect of dietary selenium and vitamin E on some antioxidant enzyme activities of liver and brain tissues. *Biol Trace Elem Res*, *81*(2), 141-152.

Turanov, A.A., Lobanov, A.V., Fomenko, D.E., Morrison, H.G., Sogin, M.L., Klobutcher, L.A., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N. (2009). Genetic Code Supports Targeted Insertion of Two Amino Acids by One Codon. *Science*, vol.323.

Umysová, D., Vítová, M., Doušková, I., Bišová, K., Hlavová, M., Жížková, M., Machát, J., Doucha, J., Zachleder, V. (2009). Bioaccumulation and toxicity of selenium compounds in the green alga Scenedesmus quadricauda. *BMC Plant Biology*, 9:58.

Van Asbeck, B.S., Hoidal, J., Vercellotti, G.M. (1985). Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: role of red cell glutathione. *Science*, 277:756-9.

Van Nhien, N., Yabutani, T., Khan, N. C., Khanh le, N. B., Ninh, N. X., Chung le, T. K., Motonaka, J., & Nakaya, Y. (2009). Association of low serum selenium with anemia among adolescent girls living in rural Vietnam. *Nutrition*, *25*(1), 6-10.

Viaro, R., Viaro, M.S., Fleck, J. (2001). Importância bioquímica do selénio para o organismo humano. *Disciplinarium Scientia, Série: Ciên Biol Saúde*. v2,n1,p.17-21.

Viljoen, J.A., Tappel, L.A. (1988). Interactions of selenium and cadmium with metallothionein-line and other cytosolic proteins of rat kidney and liver. *J Inorg Biochem*. 34:277-290.

Wang, Y., Walsh, S. (2001). Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. *Placenta*. 22:206-212.

Yang, G.Q., Wang, S.Z., Zhou, R.H., Sun, S.Z. (1983). Endemic selenium intoxication of humans in China. *Am J Clin Nutr*, 37:872-881.

Yang, G.Q., Yin, S., Zhou, R.H., Gu, L., Yan, B., Liu, Y., Liu, Y. (1989). Studies of safe maximal daily dietary Se-intake in a seleniferous area in China. II. Realtion between Se-intake and the manifestation of clinical signs and certain biochemical alterations in blood and urine. *J Trace Elem Electrolytes Hlth Dis*, 3:123-130.

Zafar, K. S., Siddiqui, A., Sayeed, I., Ahmad, M., Salim, S., & Islam, F. (2003). Dose-dependent protective effect of selenium in rat model of Parkinson's disease: neurobehavioral and neurochemical evidences. *J Neurochem*, *84*(3), 438-446.

Zhou, J. Y., & Prognon, P. (2006). Raw material enzymatic activity determination: a specific case for validation and comparison of analytical methods--the example of superoxide dismutase (SOD). *J Pharm Biomed Anal*, *40*(5), 1143-1148.