

**USO DE ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA PARA
CUANTIFICAR LA LIBERACIÓN RUMINAL *IN VITRO* DE SELENIO A
PARTIR DE ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA L.*)**

Lic. qca. Emilio César Brambilla

Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al Título de
MAGISTER SCIENTIAE en PRODUCCIÓN ANIMAL

Área de Producción Animal

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL
PLATA**

Unidad Integrada Balcarce: Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP – Estación
Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA

Balcarce, Argentina

Noviembre 2018

**USO DE ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA PARA
CUANTIFICAR LA LIBERACIÓN RUMINAL *IN VITRO* DE SELENIO A
PARTIR DE ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA L.*)**

Lic. qca. Emilio César Brambilla



M. Sci. Lic. Bioq. Susana B. Cseh

Directora de Tesis 



M. Sci. Ing. Agr. Maria Susana Guaita

Co-Directora de Tesis

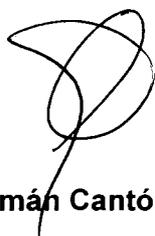
Dra. Prof. Silvina San Martino

Asesora

**USO DE ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA PARA
CUANTIFICAR LA LIBERACIÓN RUMINAL *IN VITRO* DE SELENIO A
PARTIR DE ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA L.*)**

Lic. qca. Emilio César Brambilla

Aprobada por:



Dr. Germán Cantón



Dr Gustavo Eyherabide

M.Sci. Gustavo Bretschneider

AGRADECIMIENTOS

A la M. Sci. Lic. Bioquímica Susana B. Cseh quien a pesar de estar gozando del beneficio jubilatorio me ofreció su incesante e incansable apoyo tanto profesional como personal, para la investigación y desarrollo de esta tesis.

A mi Co-directora M. Sci. Ing. Agrónoma María Susana Guaita por su dedicación y contribuciones en el desarrollo de la investigación.

A la Dra. Silvina San Martino por su asesoramiento estadístico.

Al Lic. Eduardo Fernández por su generosa contribución a mi perfeccionamiento y formación.

Al M.V. Joaquín Armendano por su desinteresada orientación.

A mi familia, especialmente a mis padres y hermanos, quienes aún desde la distancia, estuvieron conmigo en cada momento de todos estos años de estudio ayudando con todo lo que estaba a su alcance.

A mi novia, quien con su paciencia y aliento fue una parte muy importante para iniciar mi camino como investigador del INTA.

A mis Amigos y Compañeros por brindarme siempre un gran apoyo sin esperar nada a cambio.

En fin, a todos ellos les dedico esta tesis y digo simplemente Gracias!!

“El conocimiento nos hace responsables” Anónimo.

ÍNDICE

<u>RESUMEN</u>	XI
<hr/>	
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	1
<hr/>	
<u>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	4
<hr/>	
2.1. <u>PROPIEDADES QUÍMICAS Y FÍSICAS DEL SELENIO</u>	4
2.2. <u>FUENTES NATURALES Y USOS DEL SELENIO</u>	4
2.3. <u>HISTORIA DEL SELENIO EN RELACIÓN A LA PRODUCCIÓN ANIMAL</u>	5
2.4. <u>FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA</u>	6
2.4.1. RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	6
2.4.2. SISTEMA ANTIOXIDANTE	7
2.5. <u>SELENOPROTEÍNAS</u>	8
2.5.1. GLUTATIÓN PEROXIDASA	12
2.5.2. DEIODINASA IODOTIRONINA	13
2.5.3. TIORREDOXÍN-REDUCTASAS	14
2.5.4. OTRAS SELENOPROTEÍNAS	15
2.6. <u>EL SELENIO EN EL SUELO Y EL FORRAJE</u>	16
2.7. <u>METABOLISMO DEL SELENIO EN LOS RUMIANTES</u>	19
2.7.1. ABSORCIÓN	19
2.7.2. TRANSPORTE	21
2.7.3. EXCRECIÓN	21
2.7.4. REQUERIMIENTOS DE LOS BOVINOS	22
2.8. <u>DEGRADABILIDAD RUMINAL</u>	22
2.9. <u>DIGESTIÓN EN RUMIANTES</u>	24
2.10. <u>ENFERMEDADES ASOCIADAS CON LA DEFICIENCIA DE SELENIO</u>	26
2.11. <u>CUANTIFICACIÓN DE SELENIO EN FORRAJES Y FLUIDO RUMINAL</u>	28
2.11.1 DIGESTIÓN Y PRE-REDUCCIÓN DE LAS MUESTRAS	28
2.11.2 PLATAFORMA DE HIDRUROS ACOPLADA A UN ESPECTROFOTÓMETRO DE ABSORCIÓN ATÓMICA	29
2.12. <u>VERIFICACIÓN DE LA PERFORMANCE METODOLÓGICA</u>	29
2.13. <u>LIBERACIÓN DE SELENIO DESDE ALFALFA</u>	30
2.14. <u>HIPÓTESIS</u>	31
2.15. <u>OBJETIVOS</u>	31
<hr/>	
<u>3. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	32
<hr/>	
3.1. <u>RECOLECCIÓN DE FORRAJES</u>	32
3.1.1. MATERIAL	32
3.1.2. PROCEDIMIENTO	32

3.2. <u>ANÁLISIS QUÍMICO DEL CONTENIDO DE SELENIO EN FORRAJES, FLUIDO RUMINAL Y SOLUCIONES ACUOSAS</u>	33
3.2.1. MATERIAL	34
3.2.2. REACTIVOS	35
3.2.3. CUANTIFICACIÓN DE SELENIO EN FORRAJE:	35
A. <u>SOLUCIONES</u>	35
B. <u>MÉTODO ADICIÓN DEL ESTÁNDAR</u>	35
C. <u>DIGESTIÓN Y PRE-REDUCCIÓN</u>	36
D. <u>CUANTIFICACIÓN POR PLATAFORMA DE HIDRUROS ACOPLADA A UN ESPECTROFOTÓMETRO DE ABSORCIÓN ATÓMICA:</u>	37
3.2.4. CUANTIFICACIÓN DE SELENIO EN FLUIDO RUMINAL Y SOLUCIONES ACUOSAS:	38
A. <u>SOLUCIONES:</u>	38
B. <u>DIGESTIÓN Y PRE-REDUCCIÓN:</u>	39
C. <u>CUANTIFICACIÓN POR PLATAFORMA DE HIDRUROS ACOPLADA AL ESPECTROFOTÓMETRO DE ABSORCIÓN ATÓMICA:</u>	39
3.3. <u>PERFORMANCE DE LA METODOLOGÍA</u>	40
3.3.1. PARÁMETROS ANALIZADOS - CÁLCULOS	40
A. <u>LÍMITE DE DETECCIÓN</u>	40
B. <u>RANGO APLICABLE</u>	41
C. <u>SESGO O BIAS</u>	42
D. <u>PRECISIÓN</u>	42
D.1. REPETIBILIDAD	43
D.2. PRECISIÓN INTERMEDIA	43
E. <u>RECUPERACIÓN</u>	43
F. <u>INCERTIDUMBRE RELATIVA EXPANDIDA</u>	44
3.4. <u>OBTENCIÓN DE FLUIDO RUMINAL:</u>	45
3.4.1. MATERIAL:	45
3.4.2. PROCEDIMIENTO:	46
3.5. <u>ESTUDIO DE LIBERACIÓN RUMINAL DE SELENIO IN VITRO</u>	47
3.5.1. MATERIAL	47
3.5.2. REACTIVOS	48
3.5.3. SOLUCIONES	48
3.5.4. PROCEDIMIENTO	49
3.5.5. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA LIBERACIÓN RUMINAL DE SELENIO.	50
3.6. <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u>	51
<u>4. RESULTADOS</u>	53
4.1. <u>VERIFICACIÓN DE LA PERFORMANCE ANALÍTICA</u>	53
4.2. <u>LIBERACIÓN RUMINAL</u>	54
4.2.1. ANÁLISIS DE FORRAJES	54
4.2.2. LIBERACIÓN RUMINAL IN VITRO DE SELENIO	55
A. <u>CONCENTRACIÓN DE SE EN LOS TRATAMIENTOS 1 Y 2</u>	55

<i>B. <u>ANÁLISIS DE ALFALFA REMANENTE DEL TRATAMIENTO 1 Y DEL TRATAMIENTO 2</u></i>	58
<i>C. <u>ANÁLISIS DE JARRA BLANCO Y JARRA TESTIGO</u></i>	59
<i>D. <u>ANÁLISIS EXPLORATORIO DE TRATAMIENTO 1 Y JARRA TESTIGO</u></i>	60
5. <u>DISCUSIÓN</u>	63
5.1. <u>VERIFICACIÓN METODOLÓGICA</u>	63
5.1.1. LÍMITE DE DETECCIÓN	63
5.1.2. RANGO APLICABLE	63
5.1.3. SESGO	64
5.1.4. PRECISIÓN	65
5.1.5. RECUPERACIÓN	66
5.1.6. INCERTIDUMBRE RELATIVA EXPANDIDA	67
5.1.7. ANÁLISIS INTEGRAL DE LA PERFORMANCE METODOLÓGICA	67
5.2. <u>LIBERACIÓN RUMINAL <i>IN VITRO</i> DE SELENIO</u>	67
5.2.1. CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL DE FORRAJES	67
5.2.2. COMPARACIÓN DE TRATAMIENTO 1 Y TRATAMIENTO 2	68
5.2.3. COMPARACIÓN DESCRIPTIVA ENTRE LA JARRA BLANCO Y LA JARRA TESTIGO	73
5.2.4. COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTO 1 Y JARRA TESTIGO	73
5.2.5. CONCENTRACIÓN DE SELENIO EN ALFALFA	73
6. <u>CONCLUSIONES</u>	75
7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	76

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Diferentes tipos de especies reactivas de oxígeno.</i>	7
<i>Diferentes selenoproteínas y sus características.</i>	9
<i>Concentraciones de selenio en algunas forrajes y mezcla de forrajes.</i>	18
<i>Requerimientos netos de especies inorgánicas de selenio en función de la categoría animal y la calidad del forraje.</i>	25
<i>Resumen de desórdenes específicos relacionados a la deficiencia de Se en animales de producción que responden a suplementación con selenio.</i>	27
<i>Resultados y criterios de aceptación para cada uno de los parámetros analizados para verificar la performance de las técnicas. Datos completos en el apéndice I.</i>	53
<i>Caracterización nutricional de la alfalfa utilizada en el ensayo.</i>	54
<i>Caracterización nutricional del heno de alfalfa con el que se alimentó al animal donante.</i>	54
<i>Caracterización nutricional del heno de gramíneas con el que se alimentó al animal donante.</i>	55
<i>Comparación de los modelos M1 y M2.</i>	56
<i>Análisis de la varianza obtenido a partir del modelo M2.</i>	57
<i>Medias mínimo cuadráticas de la concentración de selenio (ppb) en el tratamiento 1 y 2 a diferentes tiempos de extracción, sus errores estándar y el resultado de las comparaciones múltiples.</i>	58
<i>Concentración en cada submuestra, su respectiva media y desvío estándar de las jarras testigo y blanco en el inicio (0 h). (J0= jarra blanco: agua bidestilada + fluido ruminal; JT= jarra testigo: saliva artificial + fluido ruminal)</i>	59
<i>Diferencias en el contenido medio de selenio entre el fluido ruminal del tratamiento 1 y la jarra testigo para cada tiempo de extracción. Valor de t y valor p correspondiente.</i>	61
<i>Comparación de límites de detección de selenio obtenidos por diferentes autores en muestras biológicas.</i>	63
<i>Rango de concentraciones de selenio en fluido ruminal informado en la bibliografía.</i>	63
<i>Rango de sesgo % en la determinación de Se en muestras biológicas obtenidos por autores consultados.</i>	64
<i>Rango de coeficiente de variación porcentual por repetibilidad encontrado en bibliografía.</i>	65
<i>Rango de recuperaciones porcentuales de selenio obtenidas por diferentes autores.</i>	66
<i>Cálculo del límite de detección de fluido ruminal y forraje.</i>	88
<i>Cálculo del Sesgo % en fluido ruminal.</i>	89
<i>Cálculo del Sesgo % en forrajes.</i>	90
<i>Cálculo de precisión por repetibilidad en fluido ruminal.</i>	90
<i>Cálculo de precisión por precisión intermedia en fluido ruminal.</i>	91
<i>Cálculo de precisión por precisión intermedia en forraje.</i>	91
<i>Cálculo de recuperación % en fluido ruminal.</i>	91
<i>Cálculo de recuperación % en forraje.</i>	93

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Mapa de distribución de deficiencias de selenio en bovinos. La distinción entre una deficiencia severa (rojo) o una leve (amarillo) está dada por el porcentaje de animales deficientes correspondientes a cada provincia: Deficiencia < 50%: menos del 50% de las muestras analizadas de esta provincia presentaba niveles bajos de Se. Deficiencia > 50%: más del 50% de las muestras analizadas de esta provincia presentaba niveles bajos de Se.</i>	2
<i>Figura 2. Diagrama de especiación de selenio en suelo (adaptación de NRC 1983).</i>	5
<i>Figura 3. Esquema de funciones de algunos seleno-componentes más importantes y las enfermedades producidas en caso de deficiencia.</i>	16
<i>Figura 4. Porcentaje de presencia de especies de selenio en función del pH del suelo (reproducción de Barceloux, 1999).</i>	17
<i>Figura 5. Vías metabólicas de diferentes seleno-moléculas (Finley, 2006).</i>	20
<i>Figura 6. Etapas del crecimiento microbiano in vitro (Van Soest, 1994).</i>	23
<i>Figura 7. Especiación del selenio realizada en rumen.</i>	24
<i>Figura 8. Esquema del recorrido del haz de luz en la plataforma de hidruros acoplada a un espectrofotómetro de absorción atómica.</i>	29
<i>Figura 9. Alfalfa al momento de la cosecha.</i>	33
<i>Figura 10. Pastura consociada y elementos de cosecha.</i>	33
<i>Figura 11. Interferencia del cobre sobre la señal respuesta en la cuantificación de selenio.</i>	34
<i>Figura 12. Plataforma de hidruros FIAS 100 (derecha) acoplada al espectrofotómetro de absorción atómica AAnalyst 700 (izquierda).</i>	34
<i>Figura 13. Ejemplo de gráfico de análisis de un analito por adición del estándar.</i>	36
<i>Figura 14. Esquema de reacción de pre-reducción del selenio en estado +6 ($HSeO_4^-$) a selenio en estado +4 (H_2SeO_3).</i>	37
<i>Figura 15. Ejemplo de curva de calibración por método de adición del estándar con absorbancia vs. concentración de selenio adicionada, utilizada en el cálculo de concentración de selenio en forraje.</i>	38
<i>Figura 16. Ejemplo de curva de calibrado de absorbancia promedio vs. concentración de selenio en los estándares.</i>	40
<i>Figura 17. Contribuciones de la metodología a la incertidumbre (adaptación de Brambilla, 2012).</i>	45
<i>Figura 18. Fardo de alfalfa, parte de la ración.</i>	46
<i>Figura 19. Muestra del heno de gramíneas.</i>	46
<i>Figura 20. Jarras de digestión Ankom.</i>	47
<i>Figura 21. Bolsas filtrantes Ankom.</i>	48
<i>Figura 22. Sellado térmico de bolsas filtrantes Ankom.</i>	49
<i>Figura 23. Incubadores Daisy Ankom.</i>	50
<i>Figura 24. Liberación de selenio en el tratamiento 1 y 2 (T1= tratamiento 1: fluido ruminal + saliva artificial + alfalfa; T2= tratamiento 2: saliva artificial + alfalfa), en las tres repeticiones.</i>	56
<i>Figura 25. Medias y desvíos estándares de la liberación de selenio en cada horario, en los dos tratamientos (T1= tratamiento 1: fluido ruminal + saliva artificial + alfalfa; T2= tratamiento 2: saliva artificial + alfalfa), y medias de la liberación de selenio en cada horario con los resultados de las comparaciones múltiples correspondientes. Las medias que comparten la misma letra no difieren significativamente ($\alpha = 0,05$).</i>	58
<i>Figura 26. Concentración de Se en la jarra blanco y jarra testigo en función del tiempo. (J0= jarra blanco: agua bidestilada + fluido ruminal; JT= jarra testigo: saliva artificial + fluido ruminal)</i>	60

<i>Figura 27. Liberación de selenio en la jarra testigo y el tratamiento 1 en función del tiempo. (T1= tratamiento 1: fluido ruminal + saliva artificial + alfalfa; JT= jarra testigo: saliva artificial + fluido ruminal)</i> -----	61
<i>Figura 28. Producción de gas "in vitro" de 3 alimentos diferentes expresada en mL de gas/g de materia orgánica vs. horas de incubación (Cone et al, 1996).</i> -----	68
<i>Figura 29. Gráficos "a" de actividad bacteriana por Cone, et al (1996) y "b" liberación media de selenio obtenida en este ensayo.</i> -----	69
<i>Figura 30. Cinética de liberación ruminal in situ de potasio (%) en función del tiempo de incubación (Correa, 2006).</i> -----	71
<i>Figura 31. Cinética de liberación ruminal in situ de calcio (%) en función del tiempo de incubación (Correa, 2006).</i> -----	71

RESUMEN

El selenio (Se) es un oligoelemento declarado esencial desde 1973 y que puede ser deficitario en suelos, plantas y rumiantes, en varias regiones de la Argentina incluyendo la provincia de Buenos Aires. La principal desventaja para su asimilación en rumiantes es debida al metabolismo de los microorganismos ruminales, los cuales reducen el Se a su forma insoluble. Siendo relativamente nuevo el interés de su influencia en la fisiología animal, son escasas las investigaciones respecto a su metabolismo ruminal. Por esto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la liberación ruminal de Se en incubaciones de alfalfa en fluido ruminal en condiciones *in vitro*. Así, fue necesario poner a punto las determinaciones para cuantificar Se, en forraje y en fluido ruminal, mediante una plataforma de hidruros acoplada a un espectrofotómetro de absorción atómica para poder caracterizarlo. Para la verificación de la metodología se analizaron los parámetros: límite de detección, rango de trabajo, *bias* o sesgo, precisión por repetibilidad y precisión intermedia, recuperación e incertidumbre relativa expandida, siguiendo los lineamientos de la *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*. En cuanto a la liberación ruminal de Se se evaluaron dos tratamientos diferentes *in vitro*: con fluido ruminal (T1) y sin fluido ruminal (T2). Los resultados obtenidos acerca de la verificación de la performance metodológica para la determinación de Se en forrajes y fluido ruminal, indican que ambas técnicas son aptas para el uso en los fines requeridos. La liberación ruminal *in vitro* resultó con una varianza diferente según el tratamiento, presentándose mayor variabilidad en el T1. Se observó que la liberación *in vitro* de Se desde alfalfa tuvo su máximo entre las horas 1 y 2 luego de iniciado el ensayo, para luego descender hasta la hora 5 a partir de la cual se mantuvo relativamente estable. Al analizar descriptivamente el residuo remanente de las incubaciones de los tratamientos, se encontró la mayor concentración final de Se en el tratamiento T1, por lo cual se infiere que los microorganismos ruminales pueden haberlo asimilado y fijado a las fibras no digestibles remanentes. Se concluyó que la liberación de Se desde alfalfa es paulatina en el tiempo y que la variación en las primeras 5 horas podría vincularse al intercambio que los microbios ruminales realizan con el medio.

Palabras clave: selenio, plataforma de hidruros, liberación ruminal *in vitro*, alfalfa.

ABSTRACT

Selenium is a trace element declared essential since 1973 and may be deficient in soils, plants and ruminants in several regions of Argentina, including Buenos Aires province. The main disadvantage for its assimilation in ruminants is due to the metabolism of ruminal microorganisms, which reduce selenium to its insoluble form. Being relatively new its physiological interest, there are few investigations regarding its ruminal metabolism. Therefore, the objective of this work was to characterize the release of selenium in alfalfa incubations under *in vitro* conditions. Thus, it was necessary to set up the determinations of selenium, in forage and ruminal fluid, through a hydride platform coupled to an atomic absorption spectrophotometer. For the methodological verification, the parameters analyzed were: limit of detection, range of work, bias, precision by repeatability and intermediate precision, recovery and expanded relative uncertainty, following the guidelines of the Association of Official Analytical Chemists. Regarding the ruminal release of selenium, two different treatments were evaluated *in vitro*: with ruminal fluid (T1) and without ruminal fluid (T2). The results on the verification of methodological performance for the determination of selenium in forages and ruminal fluid, indicate that both techniques are suitable for the required purposes. The *in vitro* ruminal release presented heterogeneous variance according to treatment, showing greater variability in T1. The *in vitro* release of Se from alfalfa reached its maximum at hours 1 and 2 after the beginning of the trial, and then it descended until the hour 5, after which it remained relatively stable. When analyzing descriptively the residue of alfalfa from the incubations of the treatments, the highest final concentration of Se was found in the treatment T1, so it is inferred that the ruminal microorganisms could be assimilated it and fixed it to the remaining non-digestible fibers. It was concluded that the release of Se from alfalfa is gradual over time and that the variation in the first 5 hours could be linked to the exchange that ruminal microbes made with the medium.

Key words: selenium, hydride platform, *in vitro* ruminal release, alfalfa.

1. INTRODUCCIÓN

Una adecuada nutrición de bovinos requiere una dieta con proporciones balanceadas de proteínas, hidratos de carbono, grasas, vitaminas y minerales. El rol de los minerales en la producción animal es conocido desde épocas remotas, pero el conocimiento de cuáles son y cómo actúan es relativamente reciente, remontándose los primeros trabajos a la tercera década del siglo pasado.

Entre las enfermedades metabólicas, las deficiencias de minerales en el ganado tienen un impacto económico negativo a nivel mundial. Los minerales de importancia para los rumiantes pueden dividirse en macrominerales, que son aquellos cuya presencia en el animal es del orden de los gramos, y en oligoelementos, elementos traza o microminerales, los cuales están presentes en el orden de los miligramos. Se consideran macrominerales críticos para los rumiantes en pastoreo al calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg), sodio (Na), potasio (K), azufre (S). Los microminerales son el cobre (Cu), cinc (Zn), hierro (Fe), Se, iodo (I), cromo (Cr), manganeso (Mn), molibdeno (Mo).

El Se es un oligoelemento esencial ya que forma parte de muchas Se-proteínas (Se-P) involucradas en el metabolismo antioxidante, respuesta inmune, funciones reproductivas, metabolismo de la hormona tiroidea y equilibrio de óxido-reducción del organismo.

El Laboratorio de Bioquímica Clínica Veterinaria del INTA Balcarce participa en un Programa Nacional de Salud Animal (PNSA) desde el año 2006. A través del mismo ha realizado un relevamiento del estatus mineral en bovinos para carne de diferentes establecimientos en 16 provincias de la Argentina. A partir del análisis de la concentración de Se en los rodeos de cría, muestreados entre los años 2006 y 2012 (n = 3425), fue llamativo hallar deficiencias de diferente magnitud (severas y leves; Figura 1) en el país, en todos los establecimientos considerados (Cseh *et al.*, 2013).

En la Figura 1 se presenta, para cada provincia incorporada al estudio, la magnitud de la deficiencia de Se en función del porcentaje del rodeo muestreado que resultó tener valores bajos en la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx), empleada para estimar la concentración de Se en sangre (Berrett, Hebert, 1979). El mapeo de la deficiencia de selenio, sumado a la casuística obtenida por el Laboratorio de Bioquímica Clínica del Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado de la EEA del INTA Balcarce (Comunicación personal), permiten inferir que la carencia de este elemento es particularmente importante en la respuesta sanitario/productiva de los rodeos de cría de nuestro país.



Figura 1. Mapa de distribución de deficiencias de selenio en bovinos. La distinción entre una deficiencia severa (rojo) o una leve (amarillo) está dada por el porcentaje de animales deficientes correspondientes a cada provincia: Deficiencia < 50%: menos del 50% de las muestras analizadas de esta provincia presentaba niveles bajos de Se. Deficiencia > 50%: más del 50% de las muestras analizadas de esta provincia presentaba niveles bajos de Se.

Actualmente se conocen más de 30 Selenio proteínas (Se-P) que tienen al Se como cofactor para su actividad biológica. Entre estas se encuentran 6 diferentes glutatión peroxidases, vinculadas al metabolismo antioxidante; 3 deiodinasas-iodotironina, vinculadas a la funcionalidad de la hormona tiroidea y 3 tioredoxin-reductasa, vinculadas a la regulación de reacciones de óxido-reducción (*redox*) de las células.

El alimento es la principal fuente Se para los animales. La absorción de Se es un proceso variable que depende, entre otras cosas, de la especie animal. Los no rumiantes y pre-rumiantes lo absorben con una eficiencia del orden del 77 al 85 % del Se ingerido. En cambio, los rumiantes tienen una menor y variable eficiencia de absorción, del orden del 29 al 59 %. Esta disminución está dada por el accionar de los microorganismos ruminales, ya que pueden absorber el Se y hacerlo parte constitutiva de sus proteínas, lo que lo vuelve insoluble e indisponible para el animal. De esta

manera, se considera que los rumiantes son más vulnerables a trastornos originados por deficiencia del elemento. La bibliografía consultada reporta que al aumentar el tiempo de permanencia del alimento en el rumen (menor calidad) mejora la utilización y absorción del mineral. En contraparte, al mejorar la calidad de la ración consumida por los rumiantes, aumentan los requerimientos del mineral (Underwood, Suttle, 2003; Dijkstra et al., 2005; Noguera, Ochoa, 2007; Suttle, 2010).

Dado que la liberación ruminal del Se contenido en el alimento afecta su disponibilidad, es relevante caracterizar este proceso, del que hay escasa información en la bibliografía. Es así que en este trabajo se planteó caracterizar la liberación *in vitro* del Se desde alfalfa (*Medicago sativa L.*) hacia el fluido ruminal (FR). Debido a que es una de las principales especies forrajeras utilizada en el país (Pagliaricci et al., 2002), la alfalfa fue elegida como sustrato para las incubaciones *in vitro*.

Para dicha caracterización fue fundamental contar con técnicas de determinación de Se en forraje y FR que cumplieran con los requerimientos metodológicos y de desempeño propuestos por la AOAC en su apéndice F (ª2016). Por tal razón, se pusieron a punto metodologías utilizando una plataforma generadora de hidruros acoplada a un espectrofotómetro de absorción atómica (PH-EAA) para la cuantificación de Se.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Propiedades químicas y físicas del selenio

El Se es un no-metal perteneciente al grupo VI de la tabla periódica. Posee propiedades químicas similares al S, lo cual le permite ciertas sustituciones en moléculas biológicamente activas (Combs, Combs, 1986; Barceloux, 1999).

Se presenta naturalmente en 4 estados de oxidación: estado 0, en el Se elemental y selenio-diglutatión; -2 en el seleniuro de sodio (Na_2Se) y seleniuro de hidrogeno (H_2Se); +4 en el selenito de sodio (Na_2SeO_3), óxido selenioso (SeO_2) y ácido selenioso (H_2SeO_3); y +6 en el selenato de sodio (Na_2SeO_4) y ácido selénico (H_2SeO_4). El H_2Se es un gas incoloro, inodoro y altamente tóxico. El selenato es el estado de oxidación más estable en álcalis y soluciones oxidantes. En cambio, el selenito es más estable en soluciones ácidas y en condiciones reductoras. El Se elemental, por calentamiento puede transformarse en óxido selenioso (SeO_2) gaseoso (Combs, Combs, 1986; Barceloux, 1999).

El Se^{-2} y el Se^0 son insolubles en agua, mientras que las formas inorgánicas alcalinas de selenitos y selenato (óxidos de selenito y selenato) son solubles, y estos últimos estados de valencia son los que poseen más biodisponibilidad. Los estados inorgánicos de selenitos y selenatos predominan en aguas naturales, mientras que las formas orgánicas Se-metionina (Se-Met) y Se-cisteína (Se-Cis) son la mayor porción del mineral en vegetales y cereales (Barceloux, 1999).

2.2. Fuentes Naturales y usos del selenio

El Se es movilizado desde sus formas relativamente insolubles, como rocas y suelo, por erosión y/o actividad microbiana, lo que oxida al seleniuro (Se^{-2}) a formas solubles en agua como iones selenito (Se IV) y selenato (Se VI). En la Figura 2 se esquematiza el movimiento de las especies de Se en el suelo en función de la aireación y el pH. Una vez convertido, el Se es rápidamente tomado por las plantas. La solubilidad es un criterio determinante en su biodisponibilidad para las plantas. De hecho, toda vegetación que crezca en suelos con elevado contenido de especies solubles de Se, en general tendrá concentraciones del elemento superiores a lo normal, y viceversa (Raisbeck, 2000).

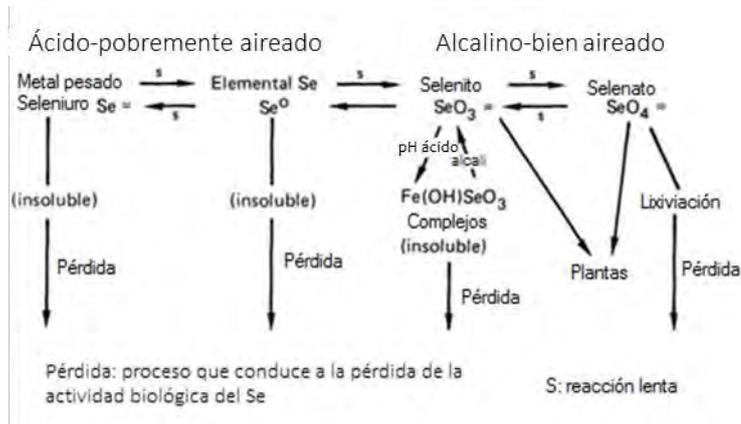


Figura 2. Diagrama de especiación de selenio en suelo (adaptación de NRC 1983).

El Se tiene muchos usos comerciales. Principalmente, las aplicaciones del mineral incluyen manufactura de cerámicas, vidrios, células fotoeléctricas, pigmentos, rectificaciones de motores, como también usos en fotografía, producción farmacéutica y vulcanización de neumáticos. El SeO_2 es la forma más usada industrialmente. El hexafluoruro de Se es un aislante gaseoso utilizado en transformadores eléctricos y el dietilditiocarbamato de Se es un eficaz fungicida (Raisbeck, 2000).

2.3. Historia del selenio en relación a la producción animal

En sus inicios, el interés biológico relativo al Se estuvo confinado a sus efectos tóxicos sobre animales. El conocimiento de las alteraciones producidas por el Se es antiguo y de una gran distribución en extensas áreas del mundo. Marco Polo fue, probablemente, el primero en hacer referencia en sus escritos a la toxicidad del Se al describir una enfermedad que llamó “pudrición de pezuña” en caballos que transitaban las montañas Nan Shan y Tien Shan de Turquestán, donde existían suelos ricos en Se (Barceloux, 1999).

En 1937 en Estados Unidos, Moxon informó sobre enfermedades que ocurrían “naturalmente” en bovinos como el “temblequeo ciego” o “vértigo ciego” y la “enfermedad alcalina”, las que podían atribuirse a un envenenamiento con Se. Estos descubrimientos estimularon investigaciones para evaluar concentraciones de Se en suelos, plantas y tejidos animales, determinar dosis tóxicas mínimas y medidas de tratamiento efectivas (Underwood, Suttle, 2003; Suttle, 2010).

En 1957, Schwarz et al. mostraron que el Se era un micronutriente esencial, ya que su presencia en pequeñas cantidades en una levadura utilizada en nutrición animal podía prevenir la necrosis hepática en ratas. Simultánea e independientemente, otros

estudios mostraron que también el Se era efectivo en la prevención de la diátesis exudativa en pollos bebés (Combs, Combs, 1986; Suttle, 2010).

En los dos años siguientes, se encontró que una degeneración muscular que ocurría en corderos y terneros en regiones de Estados Unidos y Nueva Zelanda, respondía a la terapia con Se. Subsecuentemente, se comprobó que el crecimiento en ausencia del mineral podía perjudicar el desarrollo, salud y fertilidad del ganado. En 1973, en Estados Unidos, se relacionó al Se con un rol bioquímico específico, a partir del descubrimiento de que la GPx, crucial para el metabolismo antioxidante, contaba con Se en su estructura. En 1977, se realizó la incubación de la GPx con cianuro de potasio a pH alcalino, lo cual generó la liberación del Se de la enzima, y la inhibición de la actividad enzimática. Con esto se demostró que el Se es parte de la enzima (Combs, Combs, 1984; Suttle, 2010).

Fue en 1979, y después de años de investigaciones en las que se mostraban los efectos benéficos de la suplementación con Se, que la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos publicó regulaciones que legalizaban las dietas con suplementación de Se para ganado lechero. La misma administración, en 1989, publicó una regulación que permitió que las dietas para rumiantes sean suplementadas hasta con 0,3 ppm del mineral (Weiss, 1997).

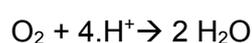
2.4. Funcionalidad biológica

El Se es primariamente conocido por su actividad antioxidante a través de su efecto sobre especies químicas, generalmente nocivas, como los radicales libres. También se lo ha identificado por sus propiedades antiinflamatorias, quimio-protectoras y antivirales (Shamberger, 1983).

2.4.1. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno

Los radicales libres son átomos o moléculas que poseen uno o más electrones desapareados, lo cual los convierte en especies altamente inestables y reactivas. Se generan como productos secundarios de la metabolización del oxígeno en la combustión normal de la glucosa. Por esto, se las denomina especies reactivas de oxígeno (ERO) (Surai, 2006).

En condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno (aproximadamente el 95%) hasta agua, mediante una reducción tetravalente, sin generar productos nocivos:



El porcentaje restante (aproximadamente el 5%) lo hacen mediante una reducción univalente, que genera como producto las EROs (Cabrera, Sánchez, 2000; Boggero, Castro, 2005; Surai, 2006;).

Las EROs pueden dividirse en dos grupos, como puede verse en la Tabla 1:

Tabla 1. Diferentes tipos de especies reactivas de oxígeno.

Radicales	No radicales
Alcóxilo (RO*)	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)
Hidroperóxido (HOO*)	Ácido hipocloroso (HClO)
Oxidrilo (OH*)	Ozono (O ₃)
Peróxilo (ROO*)	Oxígeno singulete (¹ O ₂)
Superóxido (O ₂ *)	Peroxinitrito (ONOO ⁻)
Óxido Nitroso (NO*)	Anión nitroxilo (NO ⁻)
Dióxido de nitrógeno (NO ₂ *)	Ácido nitroso (HNO ₂)

(Cabrera, Sánchez, 2000)

Su reactividad les permite reaccionar con moléculas biológicamente activas como ADN, proteínas, lípidos o carbohidratos, afectando el correcto funcionamiento celular. Los fosfolípidos, componentes de la membrana celular y de las membranas de las organelas celulares, son el principal blanco o *target* de las EROs, ya que poseen dobles enlaces insaturados carbono-carbono susceptibles al daño de estas especies prooxidantes (Combs, Combs, 1986; Van Metre, Callan, 2001; Boggero, Castro, 2005; Surai, 2006).

Mas allá de ser productos de la actividad metabólica normal de las células, las EROs son parte de la estrategia del sistema inmune para destruir microorganismos invasores, ya que células inmunes las generan como parte de una respuesta inmune innata (Boggero, Castro, 2005).

2.4.2. Sistema antioxidante

Es de destacar que existe una “producción basal” de EROs, para lo cual el organismo posee un sistema defensivo antioxidante multi-componente. Este sistema puede clasificarse en dos grandes grupos (Surai, 2006):

- a) Grupo enzimático: catalizan las reacciones de neutralización y las reacciones que deprimen la formación de nuevos radicales libres, entre las que se encuentran:

- i. Superóxido-dismutasa (SOD) Cu-Zn-dependiente: que combina iones hidrógeno con el radical superóxido liberando peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. El peróxido de hidrógeno (todavía reactivo) será transformado en solución acuosa por las otras enzimas del sistema.
- ii. GPx Se-dependiente: usa glutatión reducido, un tripéptido presente en el citoplasma celular, para donar electrones al peróxido de hidrógeno y peróxido de acil grasos, transformándolos en agua y alcoholes orgánicos, respectivamente.
- iii. Catalasa (CAT) Fe-Mn-dependiente: en mamíferos se encuentra en los peroxisomas celulares, una pequeña membrana unida a organelas, donde reacciones oxidativas se concentran y aíslan desde el citoplasma circundante (Holben, Smith, 1999; Cabrera, Sánchez, 2000; Van Metre, Callan, 2001; Boggero, Castro, 2005).

b) Grupo no enzimático: que se divide en dos subgrupos:

- i. Antioxidantes hidrofílicos: entre los que se encuentra la vitamina C, ácido úrico, bilirrubina y albúmina.
- ii. Antioxidantes lipofílicos: entre los que se encuentra la vitamina E (alfatocoferol), carotenoides y las ubiquinonas.

De especial importancia en este segundo grupo es la vitamina E. Dicha vitamina posee un anillo en su molécula que le confiere liposolubilidad y la capacidad de ubicarse a nivel de la membrana celular. Desde ahí participa en el metabolismo antioxidante, ya que puede donar un hidrógeno y un electrón a radicales libres, e interrumpir la reacción en cadena de peroxidación lipídica que afecta a fosfolípidos de membrana (Van Metre, Callan, 2001).

En numerosas publicaciones se menciona la importante interacción antioxidante entre GPx y la vitamina E, ya que la primera, por su hidrosolubilidad, actúa principalmente a nivel del citoplasma celular, mientras que la vitamina actúa a nivel de la membrana celular (Mac Donald et al., 1976; Combs, Combs, 1984; Smith et al., 1984; Van Metre, Callan, 2001; Boggero, Castro, 2005; Suttle, 2010).

2.5. Selenoproteínas

A diferencia de otros metales (Cu, Zn y Mn) que interactúan en proteínas como cofactores, el Se se encuentra incorporado en las cadenas de polipéptidos como parte de aminoácidos, en general con cisteína como Se-Cis o como residuos de Se-Cis. Las proteínas que contienen Se-Cis como parte integral de sus cadenas polipeptídicas son

definidas como Se-P, y esta es la responsable de su actividad biológica. Su importancia metabólica está basada en el hecho que, en contraste al enlace tiol (compuesto que contiene el grupo funcional formado por un átomo de S y un átomo de hidrógeno, -SH) de una enzima que contiene cisteína, el selenol (compuesto con un grupo funcional formado por -SeH) de una enzima con Se-Cis, se encuentra fuertemente ionizado a pH fisiológico y, en estas condiciones, este último es más reactivo que el grupo tiol (Behne, Kyriakopoulos, 2001; Pappas et al., 2008).

Estudios realizados con Se radioactivo indican que habría más de treinta proteínas que contienen Se fuertemente fijado a ellas. La influencia benéfica del Se para la salud, es debida a estas Se-P, las cuales se resumen en la Tabla 2 (Silva et al., 2000).

Tabla 2. Diferentes selenoproteínas y sus características.

Selenoproteínas	Abreviatura	Distribución celular/tejido/especie	Función
Glutación peroxidasa Citosólica	GPx1	Citosol, glóbulo rojo	Protección antioxidante
Glutación peroxidasa plasmática	GPx2	Espacio extracelular y plasma, riñones, pulmones	Mantenimiento del estado <i>redox</i> celular
Glutación peroxidasa hidroperóxido fosfolipídica	GPx3	Membrana celular y otros tejidos	Detoxificación de hidroperóxidos lipídicos
Glutación peroxidasa intestinal	GPx4	Tracto gastrointestinal	Protección antioxidante
Glutación peroxidasa epididimal	GPx5	Expresión restringida al epidídimo (donde maduran los espermatozoides)	Protección antioxidante durante espermatogénesis y maduración espermática

Glutación peroxidasa olfativa	GPx6	Epitelio olfatorio, tejidos embrionarios	Protección antioxidante
Glutación peroxidasa fosfolipídica sin contenido de Se-Cis	GPx7	Muchos tejidos	Desconocido, posible rol aliviando estrés oxidativo en cáncer de mama
Tiorredoxín reductasa tipo I	TRx1	Citosol, riñones, hígado, corazón	Parte del sistema tiroideo. Defensa antioxidante, regulación <i>redox</i> y señalización celular.
Tiorredoxín reductasa tipo II	TRx2	Mitocondria, hígado y riñones	Parte del sistema tiroideo. Defensa antioxidante, regulación <i>redox</i> y señalización celular.
Tiorredoxín reductasa tipo III	TRx3	Testículos	Parte del sistema tiroideo. Defensa antioxidante, regulación <i>redox</i> y señalización celular.
Deiodinasa iodotironina tipo I	DI1	Muchos tejidos como hígado, riñones y tiroides	Conversión tiroxina (T4) a triiodotironina (T3) y reversa
Deiodinasa iodotironina tipo II	DI2	Hígado, riñones, tiroides, tejido adiposo	Conversión T4 a T3
Deiodinasa iodotironina tipo III	DI3	Placenta, cerebro, piel	Conversión T3 a T4
Selenofosfat-sintetasa	Se-PSin	Testículos, muchos otros tejidos	Síntesis de selenofosfato
Selenoproteína de 15 kDa	Se-P15	Retículo endoplasmático, células T	Rol en apoptosis celular y mediación

			de efectos quimio protectores del Se
Selenoproteína K	Se-PK	Cardiomiocitos	Posible acción antioxidante
Selenoproteína M	Se-PM	Cerebro y otros tejidos	Lejanamente relacionada a Se-P15. Puede estar involucrada en la etiología del cáncer
Selenoproteína N	Se-PN	Retículo endoplasmático	Vinculada con el síndrome de la columna rígida
Selenoproteína O	Se-PO	Amplia distribución	Desconocido
Selenoproteína P	Se-PP	Plasma	Vinculada al transporte de Se y defensa antioxidante
Selenoproteína R	Se-PR	Citosol, núcleos	Reducción de metionina oxidada, residuo de proteínas dañadas
Selenoproteína S	Se-PS	Retículo endoplasmático	Balance <i>redox</i> celular. Posible influencia en respuesta inflamatoria
Selenoproteína T	Se-PT	Ubicuo	Rol en regulación de homeostasis cálcica y secreción neuroendocrina
Selenoproteína V	Se-PV	Testículos	Posible rol en regulación <i>redox</i>
Selenoproteína W	Se-PW	Corazón y músculos esqueléticos	Protección antioxidante

Pappas et al., 2008; Suttle, 2010.

Entre todas las Se-P existen unas pocas que han sido correctamente caracterizadas: 4 de las GPx, 3 deiodinasas-iodotironinas (DI) y 3 tioredoxin-reductasa (TR), de las cuales a continuación se hará una breve descripción.

2.5.1. Glutación peroxidasa

A pesar de que cada una de las cuatro GPx que se mencionaran son distintas, en general, tienen por función catalizar la reducción de peróxidos que pueden causar daño celular, neutralizándolos a especies inocuas como agua y alcohol (Behne, Kyriakopoulos, 2001):

GPx1: Primera enzima caracterizada como Se-dependiente. Esta enzima cataliza la reducción del peróxido inorgánico y varios peróxidos orgánicos solubles utilizando como sustrato un tripéptido denominado glutación. La GPx1 se aisló, por primera vez, de eritrocito bovino y de rata. Es una enzima que consiste en cuatro subunidades idénticas de Se-Cis de alrededor de 22 kDa. Se ha demostrado que los animales pueden sobrevivir sin el gen que codifica para GPx1, sugiriendo que esta enzima por sí misma no es esencial. Constituye una reserva de capacidad antioxidante que puede ser muy útil en condiciones de máximo estrés oxidativo. Esta enzima fue la primer Se-P en ser utilizada como indicador funcional en el análisis nutricional del mineral, ya que existe una alta correlación ($r=0,97$) con la concentración sanguínea de Se. Cuando hay deficiencia de Se, la actividad de la GPx1 cae (Ceballos et al., 1999; Holben, Smith, 1999; Arteel, Helmut, 2001; Behne, Kyriakopoulos, 2001; Underwood, Suttle, 2003).

GPx2: Glicoproteína que se encuentra principalmente en plasma y es distinta de la citoplasmática GPx1, tanto en su estructura como por su lugar de acción. Fue aislada del plasma humano por Maddipati et al. (1987). Estudios realizados por hibridación indican que los lugares de mayor producción de esta enzima son los riñones y los pulmones. Es una enzima glicosilada, lo que indica que es una proteína secretoria liberada al plasma, que actuaría en la defensa de los tejidos frente a los peróxidos circulantes, pero su actividad antioxidante constituye solo el 10 % de la actividad de la GPx1. Es tetramérica con subunidades de aproximadamente 23 kDa. También puede utilizarse como indicador funcional para evaluar estatus de Se. Su significancia biológica aún no está del todo clara debido a que, en plasma, la concentración de glutación es demasiado baja para servirle de sustrato para la actividad de la enzima (Holben, Smith, 1999; Silva et al., 2000; Behne, Kyriakopoulos, 2001).

GPx3: Fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa, fue la segunda Se-enzima en ser identificada en mamíferos. Aislada por primera vez del citosol de hepatocitos de cerdo, es diferente de las otras tres GPx mencionadas, ya que es liposoluble, es un monómero de aproximadamente 19,7 kDa y está estrechamente asociada con las membranas intracelulares. La actividad de esta enzima es más vulnerable ante deficiencias de Se que las de las otras GPx, lo que estaría indicando una mayor actividad antioxidante. La GPx3 puede directamente reducir fosfolípidos y colesterol hidroperóxidos. Así, fue considerada un factor primario en el sistema de protección contra destrucción oxidativa de biomembranas. Tiene una alta especificidad sobre hidroperóxidos. Otro rol significativo con el que se la vincula, que es solo cumplido por esta enzima, es en la espermatogénesis (Silva et al., 2000).

GPx4: Glutatión peroxidasa gastrointestinal que fue caracterizada en 1993. La GPx4 podría tener su principal acción protegiendo a los mamíferos de los hidroperóxidos lipídicos ingeridos con la dieta como también de los producidos por los enterocitos. Esta enzima es muy similar a la GPx1, ya que ambas son Se-enzimas citosólicas y consiste en 4 subunidades conteniendo Se-Cis ligeramente debajo de los 22 kDa (Silva et al., 2000; Behne, Kyriakopoulos, 2001).

2.5.2. Deiodinasa iodotironina

Actualmente se conocen 3 tipos de esta enzima. Es una enzima microsomal trasmembrana cuyo mayor rol fisiológico es la activación y desactivación de la hormona tiroidea que regula muchos procesos metabólicos y es indispensable para el correcto desarrollo del cerebro del feto. Esto se realiza desde la catalización de la monodeiodinización de la iodotironina en la posición 5' del aro fenólico. Esta deiodonización en 5' de la tiroxina (T4) resulta en la formación de la 3,3',5-triiodotironina (T3) que es una hormona biológicamente activa, mientras que por medio de la deiodonización en 5 se produce la 3,3',5'-triiodotironina, un isómero biológicamente inactivo (T3 reversa). La deiodonización en la posición 5' de la T3 y en 5 de la T3 reversa llevan a la formación de la 3,3'-diiodotironina (T2). El Se parece jugar un rol esencial en este proceso dada su particular habilidad de actuar como fuerte catalizador y excitador de la reacción. La deficiencia del mineral puede generar un 15 a 20 % de disminución en T3 y T4 (Holben, Smith, 1999; Silva et al., 2000; Behne, Kyriakopoulos, 2001).

Los tres tipos de Se-deiodinasas son:

- Deiodinasa tipo 1 (DI1): Proteína de 27 kDa que está localizada principalmente en tiroides, hígado, riñones y glándula pituitaria. El rol biológico de la DI1 es el de proveer

de T3 al plasma, de inactivar T4 y T3 y eliminar la T3 reversa de la circulación. En situaciones deficitarias en Se, la disminución de la actividad de esta enzima genera incrementos de la T4 plasmática mientras disminuye la T3 (Holben, Smith, 1999; Behne, Kyriakopoulos, 2001).

- Deiodinasa tipo 2 (DI2): Proteína de aproximadamente 30 kDa que se expresa predominantemente en sistema nervioso central, placenta, glándula pituitaria y tejido adiposo marrón. Sólo cataliza la 5'-monodeiodonización y convierte T4 en T3 y T3 reversa en T2. Su principal rol biológico está en la producción intracelular de T3 desde la T4 que circula en plasma (Behne, Kyriakopoulos, 2001).

- Deiodinasa tipo 3 (DI3): Proteína de 32 kDa que se expresa principalmente en el sistema nervioso central, placenta y piel. La DI3 cataliza la inactivación de la hormona tiroidea por producción de T3 reversa desde T4 y T2 desde T3. Su gran utilidad está en la capacidad de proteger al cerebro mamífero de la exposición a grandes concentraciones de T3 (Behne, Kyriakopoulos, 2001).

2.5.3. Tiorredoxín-reductasas

Aisladas por primera vez de linfocitos T humanos e identificadas como Se-P en 1996. Las Tiorredoxín-reductasas (TRxs) de mamíferos son una familia de flavo-enzimas homodiméricas presentes en varios tejidos. Estas poseen un residuo de Se-Cis que es indispensable para su actividad enzimática. Las TRxs reciben su nombre por su capacidad de realizar la reducción, NADPH dependiente, de tiorredoxín oxidado, que es fundamental en la regulación *redox* celular. La significancia de las TRxs para mamíferos ha quedado demostrada en un experimento donde se eliminó el gen codificante para la enzima, lo cual resultó en una mortalidad embrionaria temprana (Holben, Smith, 1999; Behne, Kyriakopoulos, 2001).

Estas TRxs tienen otros roles como el reciclado de vitamina C y E, la absorción de Ca, y el mantenimiento de la tonicidad muscular. Además, las TRxs de mamíferos son capaces de usar otros sustratos, incluyendo hidroperóxidos, dehidroascórbico y varias enzimas y proteínas. También son dadoras de hidrógenos para la ribonucleótido reductasa, esencial para la síntesis de ADN. Esta amplitud de especificidad de sustrato expandió el rol del Se a un sistema antioxidante mayor (Holben, Smith, 1999; Behne, Kyriakopoulos, 2001; Suttle, 2010).

En la actualidad se han identificado 3 tipos de TRxs:

- Tiorredoxín-reductasa tipo 1 (TRx1): Homodímero con dos subunidades idénticas de 56 kDa. Fue la primer TRx en la que se identificaron residuos de Se-Cis.

- Tiorredoxín-reductasa tipo 2 (TRx2): Proteína de unos 56 kDa asociada a las mitocondrias. Difiere de la TRx1 por un N terminal, identificado como una secuencia mitocondrial líder. Su rol en la mitocondria aún no es conocido pero se supone que está vinculada a la protección contra el estrés oxidativo.
- Tiorredoxín-reductasa tipo 3 (TRx3): Proteína de 65 kDa de masa, la de mayor masa molecular comparada con las otras dos isoenzimas. Fue purificada por primera vez desde testículos de ratón (Behne, Kyriakopoulos, 2001).

2.5.4. Otras Selenoproteínas

Selenoproteína P (Se-PP): Identificada como una Se-P plasmática en los años 70. Su nombre se debe a su ubicación plasmática. Se-PP es una glicoproteína que contiene más de 10 residuos de Se-Cis en una cadena polipeptídica de unos 43 kDa. Representa alrededor del 60-80 % del Se plasmático en humanos y roedores. Se le adjudicó la función de transportadora de Se en sangre, dada la alta concentración de Se.Cis por molécula. Estudios realizados en 2002 confirmaron este rol, ya que la adición de Se-PP purificada fue efectiva para recuperar la actividad celular de la GPx. Se ha sugerido, también, que podría tener alguna función de defensa antioxidante en plasma, ya que puede contribuir a la descomposición del peroxinitrito (ONOO⁻) *in vitro*. Por otro lado, estudios realizados en ratas vincularon a la Se-PP con la protección contra necrosis hepática y peroxidaciones lipídicas. A su vez, cuando se limita la suplementación con Se, la síntesis de la Se-PP ha mostrado ser prioritaria comparada con la síntesis de la GPx (Holben, Smith, 1999; Surai, 2006).

Selenoproteína de la cápsula espermática o selenoproteína V (Se-PV): es una enzima de 34 kDa y, experimentos en ratas indican que está presente solo en testículos y espermatozoides. Ratas alimentadas con una dieta deficiente en Se producen pocos espermatozoides y, a su vez, con colas deformes o inmóviles. Estas anomalías han sido asociadas a una mayor fragilidad de la queratina de las membranas mitocondriales, ya que las mismas contienen una elevada cantidad de Se-P estructurales. Dicha estructura queratínica-mitocondrial se encuentra dentro de la fracción fibrosa de la cola espermática, y es necesaria para el correcto movimiento flagelar y la maduración del mismo (Holben, Smith, 1999; Behne, Kyriakopoulos, 2001; Surai, 2006).

Selenoproteína W (Se-PW): Proteína de bajo peso molecular, entre 9,5 y 10 kDa, purificada a partir de músculo de rata, y que contiene Se como Se-Cis. Su nombre se debe a la asociación con la enfermedad del músculo blanco (*White muscle disease*). Este es un desorden metabólico del ganado que se caracteriza por una miositis y/o

miocarditis degenerativa-necrotizante que puede ser aliviada por suplementación con Se. Los niveles de la Se-PW son afectados por el nivel de Se en la dieta, y también la Se-PW tendría un rol en la protección antioxidante (Holben, Smith, 1999; Pappas et al., 2008)

Selenofosfato-sintetasa (Se-PSin): Vinculada a la incorporación de Se-Cis dentro de las Se-P y directamente vinculado al código genético. Específicamente la Se-PSin cataliza la reacción que produce monoselenofosfato, un dador biológico de Se que lo mantiene biodisponible (Holben, Smith, 1999; Surai, 2006):

En la Figura 3 se resume la acción de algunos Se-componentes.

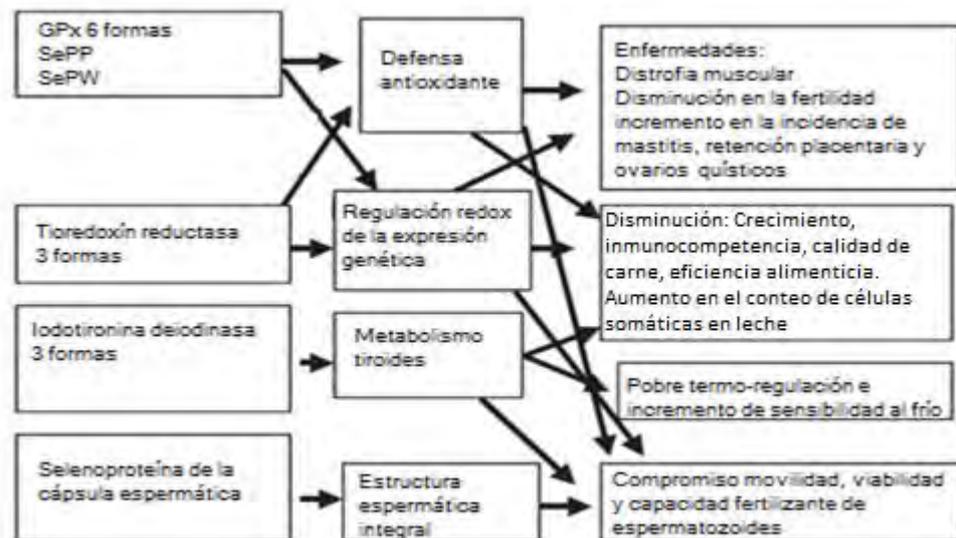


Figura 3. Esquema de funciones de algunos seleno-componentes más importantes y las enfermedades producidas en caso de deficiencia.

2.6. El selenio en el suelo y el forraje

El suelo es la principal fuente de Se para las plantas y, por lo tanto, también lo es para los animales que consumen estas plantas. La concentración de Se en el suelo puede variar significativamente entre 0,1 y 2 ppm. Altas concentraciones de Se se encuentran principalmente en suelos sedimentarios (Ej., pampa húmeda), mientras que las más bajas concentraciones son características en suelos con rocas ígneas, areniscas, granitos o piedras calizas (Ej., suelos cordilleranos). También varía la forma

en la que se encuentra el Se, incluyendo seleniuros, Se elemental, selenitos, selenatos y componentes orgánicos de Se (Surai, 2006).

La disponibilidad del Se para plantas depende de muchos factores incluyendo el pH, el potencial de óxido-reducción, la composición mineral del suelo, el rango de fertilización artificial y el régimen fluvial del suelo. Dichos factores condicionan la especie de Se que predominaría (Figura 4). Entre estos y otros factores, la transferencia de Se del suelo a la planta dependerá de:

- El tipo de suelo
- La concentración de Se en suelo
- La forma de Se en suelo
- La especie forrajera
- El estado fisiológico de la planta

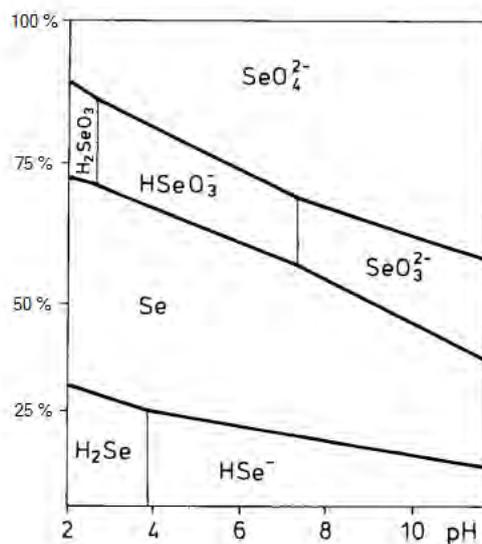


Figura 4. Porcentaje de presencia de especies de selenio en función del pH del suelo (reproducción de Barceloux, 1999).

De hecho, la disponibilidad del mineral depende más de su forma que de su concentración en el suelo. Así, el proveer una adecuada cantidad de Se en la dieta del rumiante es difícil de asegurar, ya que las concentraciones de Se pueden variar ampliamente entre alimentos y forrajes, dependiendo de la especie, estación y contenido del Se en el suelo (Barceloux, 1999; Surai, 2006; Surai, Taylor, 2008).

El Se se presenta en 4 estados de oxidación, -2, 0, +4 y +6. En alimentos (forrajes, granos, harina de oleaginosas, etc.) el mineral se presenta principalmente en estado -2

en una combinación entre Se-Met y Se-Cis, con porcentajes que van del 55-65 % y del 5-15%, respectivamente (Surai, 2006; Suttle, 2010).

En las plantas, el Se es transportado por el xilema a los cloroplastos de las hojas, donde es incorporado dentro de componentes orgánicos a través de la misma vía de incorporación del S. La forma de selenato es más fácilmente transportada desde la raíz a los brotes que los selenitos o Se orgánicos. Las plantas pueden diferir marcadamente en su capacidad de incorporar Se desde el suelo a sus tejidos, y en función de esta capacidad las especies forrajeras se pueden categorizar en:

- *Plantas acumuladoras de Se:* Pueden ser hiperacumuladoras de Se cuando crecen en suelos con elevado contenido de Se (2 ppm). Incluye especies del género *Astragalus*, *Stanleya* y *Morinda*. Las mismas pueden acumular por encima de varios mg de Se por g de materia seca, por lo que son tóxicas para los animales (Terry et al., 2000).
- *Plantas acumuladoras secundarias de Se:* Pueden acumular altas concentraciones de Se incluso cuando crecen sobre suelos con bajo o medio contenido de Se. Incluyen géneros como: *Aster*, *Astragalus*, *Atriplex*, *Castilleja* y *Comandra*. Estos géneros acumulan el mineral sin incorporarlo a sus proteínas, a diferencia de lo que pasa en las no-acumuladoras (Terry et al., 2000; Surai, 2006)
- *Plantas no acumuladoras:* En esta categoría se incluye la mayoría de los forrajes, cereales y oleaginosas. Típicamente tienen concentraciones de Se en el rango de 0,01 a 1,0 mg de Se por kg de materia seca. Estas plantas incorporan el Se dentro de sus proteínas (Surai, 2006).

Creciendo bajo las mismas condiciones, las leguminosas suelen tener menor concentración de Se que las gramíneas, siendo la alfalfa la excepción a la regla (Tabla 3). De todas maneras, todos los forrajes pueden absorber niveles tóxicos de Se cuando crecen en suelos ricos en el mineral. Algunas concentraciones de Se en forrajes, comentados en la bibliografía, se muestran en la Tabla 3 para ilustrar diferentes situaciones (Miltimore et al., 1975; Minson, 1990; Díaz-Alarcon et al., 1996; Surai, 2006; Suttle, 2010):

Tabla 3. Concentraciones de selenio en algunas forrajes y mezcla de forrajes.

Espece	Familia	Rangos de Se (ppb)	Media Se (ppb)
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	Leguminosa	10-2000	180

Trébol blanco + trébol rojo (<i>Trifolium repens</i> + <i>Trifolium pratense</i>)	Leguminosa	3-59	18
Raigrás (<i>Lolium multiflorum</i>)	Gramínea	45-3300	72
Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>)	Gramínea	39-74	57
Cebadilla (<i>Bromus unioloides</i>)	Gramínea	27-31	29
Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	Gramínea	50-990	---
Trigo (<i>Triticum</i>)	Gramínea	20-3120	457
Maíz (<i>Zea mays</i>)	Gramínea	10-1000	136
Pasto miel (<i>Paspalum dilatatum</i>)	Gramínea	---	31

2.7. Metabolismo del selenio en los rumiantes

El Se es un micronutriente esencial que debe ser ofrecido en cantidad adecuada. A continuación se harán las consideraciones necesarias para comprender su metabolismo en mamíferos, con particular referencia a los rumiantes.

2.7.1. Absorción

En mamíferos, el Se es absorbido principalmente en el duodeno. En rumiantes, existe poca evidencia de absorción en rumen, abomaso, yeyuno e íleon. Para poder considerar la biodisponibilidad del elemento es necesario analizar su eficiencia de absorción, que es el cociente entre el Se que ingresa y el que se absorbe. Dicha eficiencia depende de varios factores, entre los que se puede mencionar la especie química de Se y la especie animal (Finco, Kaneko, 1989; Koenig et al., 1990; Surai 2006; Suttle, 2010;).

Considerando las especies químicas, el Se inorgánico en forma de selenito (SeO_3^-) puede ser pasivamente absorbido, sin gasto de energía. Mientras que el selenato (SeO_4^-) comparte una vía de absorción activa con Mo y sulfatos, por lo que es vulnerable a acciones antagónicas por parte de éstos últimos, si se encuentran en concentraciones elevadas en alimento y/o agua. Surai (2006) menciona algunos trabajos donde se obtuvieron eficiencias de absorción de Se inorgánico que van del 11-16 % en novillos, vacas no lactantes y vacas lecheras. En contraste, la absorción de las especies orgánicas Se-Cis y Se-Met siguen la vía de la cisteína y la metionina, respectivamente, siendo absorbidos como moléculas intactas a través de la mucosa del intestino delgado con eficiencias de hasta el 59 %. Investigaciones *in vivo* en el lumen del intestino delgado en perro reportan que la Se-Met fue absorbida casi dos veces más rápido que la Se-Cis y cuatro veces más que el SeO_4 . La forma química en que se encuentre el Se

determina el metabolismo que seguirá, como puede verse en la Figura 5 (Combs, Combs, 1986; Finley, 2006; Suttle, 2010).

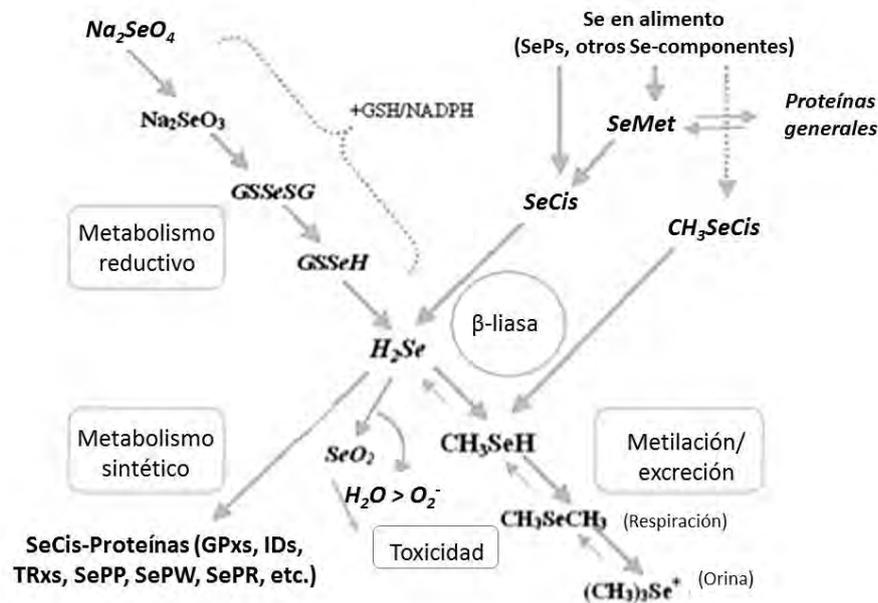


Figura 5. Vías metabólicas de diferentes seleno-moléculas (Finley, 2006).

Como puede verse en la Figura 5, el Se puede metabolizarse de forma orgánica o inorgánica. Como lo indican Fairweather-Tait et al. (2010), en los alimentos se encuentran principalmente especies orgánicas del Se, entre ellas Se-Met y, en menor proporción, Se-Cis. La Se-Met puede incorporarse directamente a proteínas no-específicas o puede pasar a Se-Cis, que subsecuentemente se transforma a seleniuro de hidrógeno (H_2Se). El H_2Se tiene dos potenciales vías metabólicas a seguir, la primera mediante una metilación y posterior excreción como ion trimetilselenio ($(CH_3)_3Se^+$), la segunda es la formación de Se-Ps con utilidad biológica. Otra vía separada para componentes orgánicos es la conversión a metilseleno-cisteína ($CH_3Se-Cis$), el que es transformado mediante una β -liasa en metilselenol (CH_3SeH), que será principalmente excretado por orina y respiración. También existe una menor proporción de Se que se ingiere con los alimentos de forma inorgánica (SeO_3^- y SeO_4^-) que ingresa en una vía reductora y se reduce hasta H_2Se (Finley, 2006; Fairweather-Tait et al., 2010).

Considerando las especies animales, los rumiantes lo absorben menos eficientemente que los no-rumiantes. En no-rumiantes, algunos estudios en ratas y cerdos muestran que una alta proporción del Se ingerido es absorbido, en el orden del 85 % y 77 %, respectivamente. Este mecanismo no parece estar homeostáticamente controlado. En el caso de los rumiantes, la eficiencia de absorción es menor, con valores del 29 % 59 %. La baja eficiencia en la absorción en los rumiantes está vinculada al

accionar de los microorganismos ruminales (bacterias, hongos y protozoos). Estos promueven la reducción del Se disponible para el rumiante, a formas insolubles como Se elemental o seleniuros, a través de la absorción del mineral para incorporación en sus proteínas y enzimas durante su crecimiento (NRC, 1983; Finco, Kaneko, 1989; Van Metre, Callan, 2001; Spears, 2003; Surai, Taylor, 2008; Suttle, 2010; Mehdi, Y, et al. 2016).

El tipo de dieta también puede afectar la biodisponibilidad del mineral, ya que otros elementos nutricionales pueden interferir en su absorción, distribución o metabolización. Tal es el caso del Ca, S, Cu, vitamina E y ácidos grasos poli-insaturados (NRC, 1983; Finco, Kaneko, 1989; Van Metre, Callan, 2001; Spears, 2003; Suttle, 2010)

2.7.2. Transporte

Después de la absorción, los compuestos hidrosolubles de Se son rápidamente distribuidos a diversos órganos. La Se-Met del alimento ingresa al *pool* de metionina, parte de la cual puede convertirse en Se-Cis mediante una liasa y adenosil metionina. La Se-Cis es rápidamente incorporada en Se-P en el hígado, para luego ser exportada al plasma desde donde puede llegar a diversos tejidos para ser incorporada a otras Se-P con actividad biológica (GPx, TR, DI, etc.). En el caso del Se que llega a la médula ósea será incorporado a los eritrocitos durante la eritropoyesis como GPx1. Así, la concentración de Se biodisponible y la magnitud de la eritropoyesis determinan la actividad de la GPx1 en sangre entera. También se encuentran elevadas concentraciones de Se en riñones, aunque es el menos afectado ante situaciones de deficiencia (Finco, Kaneko, 1989; Van Metre, Callan, 2001; Suttle, 2010).

Una vez dentro de los glóbulos rojos, el Se permanecerá por el lapso de vida de dicha célula. El contenido de Se en sangre entera está representado, en gran medida, por el Se en glóbulos rojos, en menor medida por el Se en suero, y con un insignificante aporte por el Se en glóbulos blancos (Van Metre, Callan, 2001).

2.7.3. Excreción

El Se puede ser excretado desde el cuerpo por exhalación de metil-selenol (CH_3SeH), excreción urinaria o fecal. En monogástricos y pre-rumiantes la principal ruta de excreción de Se es la vía urinaria, pero en rumiantes, la vía de eliminación depende del método de incorporación. En caso de la administración oral, y como resultado de una neta reducción de las especies de Se en el rumen e intestino grueso, muchas de las especies de Se se eliminan por heces, como formas insolubles de Se. En contraste,

cuando el Se es administrado intravenoso o subcutáneo, se eliminará más por orina (NRC, 1983; Van Metre, Callan, 2001).

2.7.4. Requerimientos de los bovinos

Dadas las pérdidas de viabilidad del Se del alimento por la acción de microorganismos ruminales es que los requerimientos de los bovinos son mayores comparados con especies no rumiantes. Forrajes y granos, con un contenido por encima de 100 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg MS}$) de Se se consideran adecuados para bovinos para carne en cría extensiva y vacas en lactancia temprana. Dicho valor debería aumentar hasta 300 ppb al aumentar los requerimientos productivos y/o fisiológicos del animal: terneros, vacas lecheras de alta producción y animales de *feed/lot* (NRC, 1983; NRC, 1996; Radostits et al., 2006).

2.8. Degradabilidad ruminal

Anatómicamente, los rumiantes son animales poligástricos, es decir que el tracto digestivo puede dividirse en tres compartimientos, cada uno con características propias y particulares: retículo-rumen, intestino delgado e intestino grueso. En el rumen y en el intestino grueso la digestión ocurre por acción microbiana, en tanto que, en el intestino delgado diferentes complejos enzimáticos degradan los componentes del alimento (Noguera, Ochoa, 2007; Díaz et al, 2008)

Como se mencionó anteriormente, en el rumen la digestión la realizan los microbios que se encuentran allí. Estos pueden utilizar los carbohidratos procedentes de las plantas (que el hombre y otros animales monogástricos no pueden aprovechar) ya que poseen enzimas digestivas capaces de romper las uniones $\beta 1-4$ de la glucosa en las cadenas de los polisacáridos estructurales (celulosa). Esta comunidad microbiana, se caracteriza por su alta densidad de población, amplia diversidad y complejidad de interacciones, encontrando representantes de los tres dominios: bacterias, hongos y protozoos (Díaz et al, 2008).

El crecimiento microbiano ha sido caracterizado en condiciones *in vitro* y sus etapas pueden ser representadas como se indica en la Figura 6.

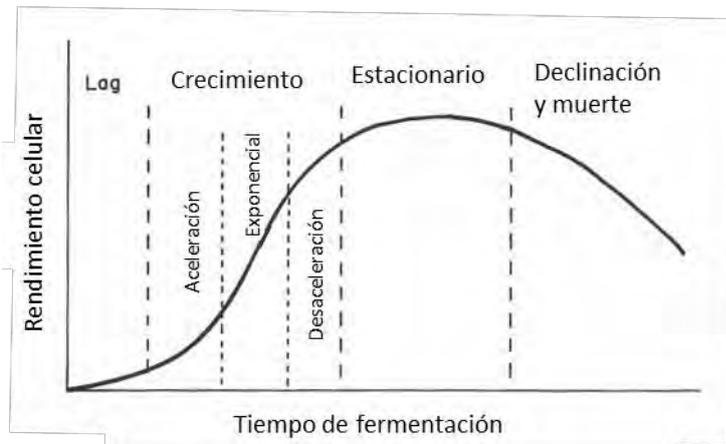


Figura 6. Etapas del crecimiento microbiano in vitro (Van Soest, 1994).

En la figura puede verse que el crecimiento bacteriano inicia una vez superado el período *lag*, en el cual los microbios deben colonizar las fibras del forraje y adaptarse a este sustrato. A continuación están las etapas de aceleración, exponencial y desaceleración donde la población se encuentra en equilibrio con su sustrato y se da el crecimiento de la comunidad microbiana. Cuando dicho equilibrio se pierde y comienza la escasez de nutrientes, el crecimiento se desacelera hasta llegar a la etapa estacionaria. Una vez que los nutrientes se terminan y/o la concentración de subproductos de la actividad microbiana es elevada sobreviene la etapa de muerte celular (Van Soest, 1994).

Los microorganismos ruminales viven en estrecha relación simbiótica (mutualista) con el rumiante. Estos ofrecen un nicho ambientalmente favorable para su desarrollo, y el crecimiento de los microorganismos favorece la degradación de los alimentos para su posterior absorción y utilización (Díaz et al, 2008).

El paso del Se por el rumen lleva consigo una gran pérdida de la biodisponibilidad del mismo por las razones previamente mencionadas, que se sintetizan en la Figura 7.

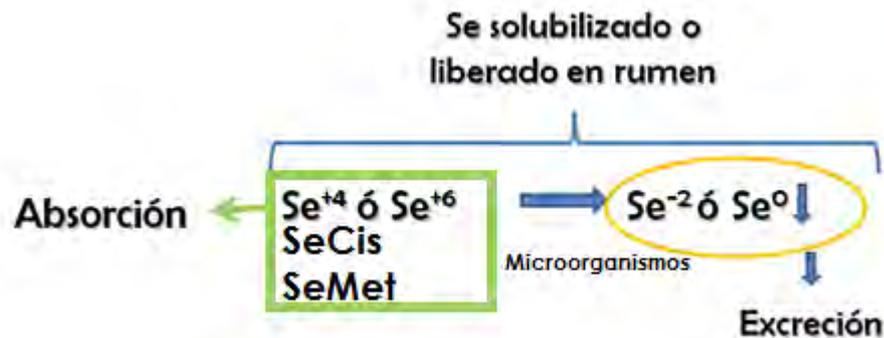


Figura 7. Especiación del selenio realizada en rumen.

Más allá del accionar microbiano, es fundamental la solubilización o liberación del Se desde el forraje al fluido ruminal para su posterior absorción. Por tal motivo, se consideró importante abordar el estudio de la liberación ruminal del Se desde el forraje, teniendo en cuenta que la información bibliográfica sobre el tema es escasa.

2.9. Digestión en rumiantes

La célula de los vegetales está compuesta por el contenido celular, formado principalmente por carbohidratos no estructurales, lípidos, proteínas y fibra soluble; y la pared celular, compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosas y lignina. El contenido celular es la fracción soluble y de rápida digestión, mientras que la pared celular tiene una fracción con digestibilidad variable a través del tiempo (celulosa y hemicelulosa) y una fracción indigestible (lignina). La composición de la pared celular de la planta es uno de los factores que más influye en el consumo de forrajes, dado que la proporción de lignina condiciona la digestibilidad (Oruña et al., 2002).

Orskov y McDonald (1979), sin considerar la variabilidad en el crecimiento microbiano y asumiendo al mismo como un proceso constante, caracterizaron el porcentaje de degradación ruminal en función de la composición del tejido vegetal, mediante el siguiente modelo:

$$D \% = a + b(1 - e^{-c \times t})$$

Siendo:

D %: porcentaje de degradabilidad a un tiempo *t*.

a: fracción soluble.

b: fracción lentamente degradable.

c: tasa de degradabilidad ruminal.

t: tiempo de incubación.

En el modelo, al aumentar el tiempo de incubación la degradabilidad ruminal aumentará. En general, un forraje con mayor contenido de pared celular necesitará más tiempo de permanencia en rumen y su pasaje por el órgano será más lento, por lo cual ocupará más espacio en el tracto digestivo. Alimentos con menor contenido de pared celular (mayor proporción de contenido celular) tendrán mayores tasas de pasaje ruminal, menor tiempo de permanencia ruminal y por ende, menor contacto con el FR (Oruña et al., 2002).

En general, como es el caso del Se, la proporción de nutrientes que están disponibles para el rumiante varía en función de la competencia entre tasa de degradación y de pasaje, ya que alimentos que salen por el orificio retículo-rumen rápidamente (mayor tasa de pasaje) se absorberán menos en este órgano.

Underwood y Suttle (2003), en experiencias a campo, observaron deficiencias de Se cuando se aumentó la calidad del forraje. Por otro lado, Suttle (2010) informó el valor umbral neto de Se necesario para diferentes categorías de animales en función de la digestibilidad del forraje consumido. Este menciona que al mejorar la calidad del forraje consumido (desde digestibilidad de 50 % a una de 70 %) el requerimiento de Se aumenta.

Tabla 4. Requerimientos netos de especies inorgánicas de selenio en función de la categoría animal y la calidad del forraje.

	Peso vivo (kg)	Requerimiento diario neto (μg de Se/día)	Requerimiento neto (μg Se/kg MS)	
			Q*=0,5	Q*=0,7
Terneros	100	75	---	31
	200	100	16	27
	300	125	15	27
Vaca lechera	500 20 l de leche/día	385	22	34

*Q= coeficiente de digestibilidad (Adaptación de Suttle. 2010).

Estos datos sugieren que la liberación de Se es un proceso lento, ya que alimentos con menor digestibilidad, que permanezcan mayor tiempo dentro del rumen, posibilitan una mayor liberación de Se (Dijkstra et al., 2005; Noguera, Ochoa, 2007).

2.10. Enfermedades asociadas con la deficiencia de selenio

La deficiencia de Se es una patología que puede tener dos orígenes (Smith et al., 1984; McDowell, 1996):

1. *Primaria*: sucede cuando el contenido de Se del alimento está por debajo del rango óptimo de 100-300 µg de Se/kg MS (Underwood, Suttle, 2003; Suttle, 2010).
2. *Secundaria*: aparece por problemas en la absorción o utilización de Se, vinculado a la interacción con otros componentes como pueden ser:
 - a. Presencia de minerales antagonistas: el Ca, Cu y S afectan la absorción o asimilación del Se del alimento.
 - b. Baja ingestión de otros antioxidantes dietéticos (especialmente vitamina E): Lo cuál está vinculado a que, tanto el Se como esta vitamina tienen funciones antioxidantes. Pero en el caso de Se, a través de la GPx, actuaría en el citoplasma celular por ser hidrosoluble, mientras que la vitamina E la hace a nivel membrana celular, por ser liposoluble. De esta forma, ante deficiencias de Se, la vitamina E colabora en mantener la integridad celular. Underwood, et al. (2003) han demostrado que la deficiencia de la vitamina E aumenta el riesgo de aparición de signos clínicos de deficiencia de Se. En general, los forrajes consumidos por los rumiantes son ricos en vitamina E, pero su conservación disminuye sus valores, especialmente cuando se exponen a condiciones adversas de conservación como elevadas temperaturas y humedad (MacDonald et al., 1976; Suttle, 2010, Smith et al, 1997).
 - c. Ingestión de oxidantes dietéticos: la ingestión de ácidos grasos poli-insaturados (PUFA, del inglés polyunsaturated fatty acid) puede generar condiciones oxidantes nocivas, aumentando los requerimientos de Se. Underwood y Suttle (2003) mencionan que la mayor parte de las afecciones musculares en terneros y la aparición de mioglobinuria parálitica aguda en vacunos adultos suelen relacionarse a que dichos animales son desplazados a pastos de primavera, que tienen mayor contenido de PUFA. Los PUFA pueden generar radicales libres que dan lugar a la formación de hidroperóxidos lipídicos inestables a nivel tisular. Estos EROs atacarán componentes celulares, principalmente las membranas (NRC, 1996; Suttle, 2010).
 - d. Alta producción de oxidantes endógenos: estos pueden provenir, por ejemplo, de un ejercicio intenso, de una infección o por agentes químicos tóxicos. Al igual que en el caso anterior, estas situaciones elevan los requerimientos de Se (Suttle, 2010).

Pueden citarse varios desórdenes relacionados a la deficiencia de Se en animales de producción, que pueden dividirse en dos grandes grupos: los que responden favorablemente a suplementación con Se y los desórdenes que no responden específicamente a la suplementación. Los primeros se mencionan en la Tabla 5 (Suttle, 2010).

Tabla 5. Resumen de desórdenes específicos relacionados a la deficiencia de Se en animales de producción que responden a suplementación con selenio.

Desorden	Descripción y consecuencia	Sitio de predilección	Especies afectadas
Enfermedad del músculo blanco	Distrofia de músculos estriados y corazón.	Músculo esquelético, corazón.	Aves, bovinos, caprinos, porcinos, equinos, ovinos.
Diátesis exudativa	Incremento de la permeabilidad de capilares: edemas y hematomas.	Tórax, cuello, alas.	Aves en mayor medida que porcinos.
Hepatitis	Necrosis de hepatocitos.	Hígado.	Porcinos.
Enfermedad del corazón morado	Microangiopatía.	Corazón en mayor medida que cerebro	Porcinos.

Suttle, 2010.

La principal patología, descrita en bibliografía para casos de deficiencia de Se es la enfermedad del músculo blanco. Esta se caracteriza por una degeneración y necrosis de las fibras musculares. Los músculos más afectados son los de mayor actividad metabólica como diafragma, intercostales, gastrocnemios (tren posterior, comúnmente llamados gemelos) y corazón. Se presenta principalmente en rumiantes recién nacidos o inclusive, antes del nacimiento, aunque también son afectados animales jóvenes (Gissel et al., 1984; Rodríguez et al., 2018).

En la bibliografía se menciona la época estival (primavera/verano) como la más propensa para la aparición de las patologías mencionadas. Esto podría explicarse por el crecimiento intenso de los forrajes, lo cual disminuye su contenido de Se, y por el aumento del contenido de PUFA (Gissel et al., 1984).

2.11. Cuantificación de selenio en forrajes y fluido ruminal

El análisis cuantitativo de Se en muestras biológicas ha sido siempre un desafío para los investigadores dada la baja concentración presente en este tipo de materiales y a su alto poder de volatilización durante la descomposición de la muestra. Existe un gran número de metodologías para la cuantificación del mineral, como son: horno de grafito acoplado a un espectrofotómetro de absorción atómica, espectrofluorimetría, plasma de acoplamiento inductivo a espectrómetro de masas, plataforma de hidruros acoplado a espectrofotómetro de absorción atómica (PH-EAA), entre otros. La espectrofluorimetría y la PH-EAA son las técnicas más frecuentemente utilizadas para la determinación de Se en muestras biológicas, debido a su relativo bajo costo y a sus mínimas interferencias. Mientras que las otras técnicas mencionadas, si bien permiten la detección de Se a concentraciones más bajas y poseen mayor sensibilidad, tienen más interferencias y son más costosas (Combs, Combs, 1986; Tinggi et al., 1992; Smrkolj, Stibilj, 2004).

La determinación de Se mediante PH-EAA es una técnica que permite lecturas a bajas concentraciones, del orden de 0,1 ppb. Esta técnica tiene como requisito que la muestra debe ser mineralizada para poder cuantificarse, para lo cual puede realizarse una digestión con ácidos concentrados y un calentamiento adecuado (Welz, Melcher, 1995).

2.11.1 Digestión y pre-reducción de las muestras

El principal problema que presenta la digestión de las muestras es la volatilidad del Se cuando es expuesto a condiciones oxidativas fuertes. Por esta razón debe controlarse bien la concentración de ácidos y la temperatura a la que se realiza. Dichas condiciones no deben ser excesivas porque provocarían la volatilización y pérdida del mineral, ni pobres, ya que no se lograría una completa mineralización de la muestra. Por otro lado, la Se-Met y Se-Cis, principales formas de Se en forrajes y FR, son compuestos particularmente resistentes a ácidos, por lo que no es simple su descomposición. De esta manera, la digestión resulta un punto crítico del proceso de cuantificación (Welz, Melcher, 1995; Suttle, 2010).

Con la digestión ácida finalizada, las condiciones oxidativas son óptimas para convertir la totalidad del Se presente (orgánico e inorgánico) en una combinación de especies inorgánicas con estados +6 ó +4. Pero es necesario que el Se se encuentre

en su totalidad en estado +4, que es la forma que puede formar hidruro de Se (H_2Se) y ser cuantificado, para lo cual se realiza una pre-reducción con ácido clorhídrico (HCl).

Otro inconveniente de la determinación de Se por PH-EAA es la interferencia con el Cu presente en la muestra. El Cu es el principal interferente, ya que en las condiciones en las que se desarrolla la técnica éste precipita como óxido de Cu (II) (CuO). El CuO puede adsorber el H_2Se formado, generando un error en la determinación. Para eliminar el efecto de la interferencia, puede utilizarse una herramienta analítica como el método de adición del estándar. Ésta es útil cuando el efecto de la matriz de la muestra es desconocido o variable, como es el caso de la determinación de Se en forraje, ya que el contenido de Cu puede variar entre las muestras (Tyson, Helen, 1991; AOAC, 2012).

2.11.2 Plataforma de hidruros acoplada a un espectrofotómetro de absorción atómica

Mediante esta técnica se logra cuantificar el Se inorgánico en estado de oxidación +4 presente en una muestra. Dicho Se ingresa en la plataforma de hidruros y forma el H_2Se , el cual se introduce en el EAA para ser cuantificado (Figura 8).

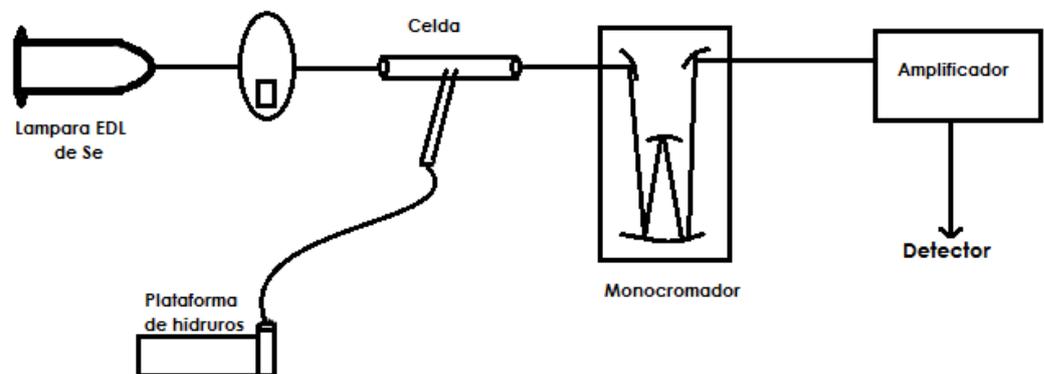


Figura 8. Esquema del recorrido del haz de luz en la plataforma de hidruros acoplada a un espectrofotómetro de absorción atómica.

El H_2Se formado ingresa en una celda de cuarzo, la cual se encuentra a alta temperatura. En estas condiciones el H_2Se se transforma a Se^0 elemental, el cual es capaz de absorber energía del haz de luz de la lámpara de Se. Dicha absorción es directamente proporcional a la concentración de Se en la muestra.

2.12. Verificación de la performance metodológica

Por lo mencionado anteriormente, es fundamental contar con metodologías que permitan la cuantificación de Se en forraje y FR de manera confiable. Así, verificar la

performance de un método estándar es un concepto necesario y obligatorio. Para esto debe llevarse a cabo un procedimiento para establecer, por medio de estudios de laboratorio, que un método tiene las características de desempeño adecuadas para cumplir con los requerimientos analíticos. Dicho procedimiento es sumamente importante, y es requerido en normas sobre sistemas de Gestión de Calidad, particularmente la Norma ISO 17025/IRAM 301 (2005) como requisito general para laboratorios de ensayo y calibración. Esto permite conocer las características funcionales del método, proporcionando un alto grado de confianza en el mismo (AOAC International, 2016).

Para verificar la performance de la determinación puede utilizarse como pauta el apéndice F de la guía de la AOAC (2016). En esta se detallan los parámetros estadísticos mínimos a ser analizados en función del tipo de técnica, para corroborar el desempeño de la misma. Estos son: rango aplicable, límite de detección (LOD), sesgo, precisión por repetibilidad y precisión intermedia, recuperación e incertidumbre del método, que se definirán más adelante.

Previo al análisis de los parámetros mencionados deben establecerse sus criterios de aceptación (CA). Éstos son los valores que el método debe cumplir para considerar que podrá utilizarse confiablemente para los fines requeridos.

Una vez realizada la puesta a punto de las técnicas de determinación de Se en forraje y FR, y caracterizadas como aptas para los requerimientos establecidos, se puede continuar con la investigación y analizar la liberación de Se en FR *in vitro*.

2.13. Liberación de selenio desde alfalfa

El estudio de la liberación ruminal de Se se realizó en alfalfa (*Medicago sativa L.*), fundamentalmente porque es un recurso forrajero extensamente usado en muchas regiones templadas del mundo. Más aún, esta leguminosa es una de las principales especies forrajeras del país y la base de la producción de carne y de leche en la región pampeana. La difusión del cultivo se sustenta en sus altos rendimientos de MS/ha, su excelente calidad forrajera y su gran adaptabilidad a diversas condiciones climáticas. A su vez, la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico, mediante asociaciones simbióticas con microorganismos, la convierten en una importante componente de la sustentabilidad de los sistemas productivos (Pagliaricci et al., 2002; Basigalup et al., 2007).

Con respecto a la concentración de Se, en general las leguminosas suelen contener menos que las gramíneas. Se menciona a la alfalfa como la excepción a la regla, ya que

tiene la capacidad de acumular Se en suelos con moderado contenido del mineral. Esto también supuso una disminución en la dispersión de los resultados al realizar la cuantificación de Se en esta especie, comparado al análisis en forrajes con bajo contenido del mineral (NRC, 1983; Underwood, Suttle, 2003).

2.14. Hipótesis

- La metodología de PH-EAA cumple con los requerimientos analíticos y de desempeño para el análisis de Se en forraje y FR.
- La liberación de Se en el rumen es progresiva a través del tiempo y depende de la permanencia del alimento en el rumen.

2.15. Objetivos

- Poner a punto la determinación de Se en forraje mediante el método de adición del estándar con PH-EAA.
- Poner a punto la determinación de Se en FR con PH-EAA.
- Caracterizar la liberación ruminal *in vitro* de Se en alfalfa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Recolección de forrajes

3.1.1. Material

El equipamiento necesario para la recolección de muestras de forraje fue el siguiente:

- Elementos de cosecha: marco de 40 × 40 cm y tijera de metal.
- Estufa de Ven Memmert TV 15.
- Molino Arcano FW100.

3.1.2. Procedimiento

Los forrajes utilizados en la puesta a punto de la metodología para la cuantificación de Se por PH-EAA y el utilizado para el ensayo de liberación ruminal *in vitro* fueron obtenidos en la EEA INTA Balcarce, ubicada en Ruta Nacional 226 km 73,5 km (37°47'40,1" S; 58°17'54,9" O). Se muestreó avena (*Avena sativa*) en la primavera del 2014 y alfalfa (*Medicago sativa*) en el inicio del verano de 2015. En los dos casos, la recolección se basó en un muestreo en transectas con inicio aleatorio hasta coleccionar aproximadamente 5 kg de material fresco. El material se secó en estufa a 60°C hasta peso constante y luego se molió a 1 mm.

La avena sólo se utilizó para la puesta a punto de la determinación de Se en forrajes. La importancia de utilizar un forraje en la puesta a punto metodológica se debe a la necesidad de respetar la matriz original de la muestra para considerar posibles interacciones, neutralizaciones, oxidaciones, reducciones, etc., que puedan suceder en el proceso completo de cuantificación, y que sólo ocurrirán en dicha matriz.

La alfalfa se cosechó seleccionándola dentro de una pastura consociada con cebadilla y trébol (Figura 9 y Figura 10). La misma se encontraba en un estadio que Ponce (2011) define como vegetativo tardío, con algunas ramificaciones auxiliares, pero sin presencia de botones florales.



Figura 9. Alfalfa al momento de la cosecha.



Figura 10. Pastura consociada y elementos de cosecha.

La alfalfa se utilizó en los ensayos de liberación ruminal de Se *in vitro*.

3.2. Análisis químico del contenido de selenio en forrajes, fluido ruminal y soluciones acuosas

El análisis del contenido de Se en FR, forrajes y soluciones se realizó mediante una digestión ácida y posterior cuantificación por PH-EEA. Experimentalmente se comprobó que el contenido de Cu de los forrajes deprime la cuantificación de Se (Figura 11), por lo cual debió utilizarse el método de adición del estándar para la cuantificación de Se.

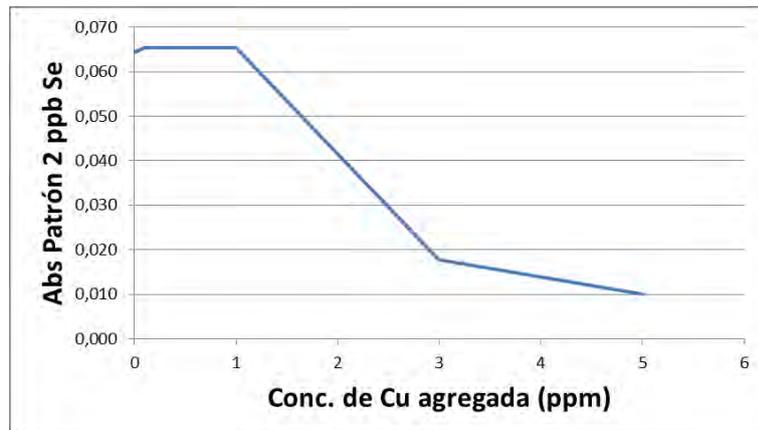


Figura 11. Interferencia del cobre sobre la señal respuesta en la cuantificación de selenio.

3.2.1. Material

El equipamiento necesario para el análisis del contenido de Se en muestras de forraje y FR fue el siguiente:

- Placa digestora Velp DK 20
- Tubos de digestión
- Pipetas graduadas de 10 y 5 mL.
- Balanza analítica Precisa 40 SM-200 A.
- Baño María Griffin 100 series.
- Espectrofotómetro de absorción atómica AAnalyst 700 (Figura 12)
- Plataforma de hidruros FIAS 100 (Figura 12).



Figura 12. Plataforma de hidruros FIAS 100 (derecha) acoplada al espectrofotómetro de absorción atómica AAnalyst 700 (izquierda).

3.2.2. Reactivos

Los reactivos necesarios para el análisis del contenido de Se en muestras de forraje y FR fueron los siguientes:

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 96 - 98 % P.A. Cicarelli.
- Ácido perclórico (HClO_4) 70 % P.A. Cicarelli.
- Ácido clorhídrico (HCl) 36 % P.A. Cicarelli.
- Ácido nítrico (HNO_3) 65 % P.A. Cicarelli.
- Solución estándar certificada de 1000 ppm de Se en 1% de HNO_3 Perkin Elmer.
- Borohidruro de sodio (NaBH_4) P.A. Merck.
- Hidróxido de sodio (NaOH) P.A. Biopack.
- Gas carrier Argón (Ar).

3.2.3. Cuantificación de selenio en forraje:

La determinación de Se en forrajes y FR tenían en común los materiales, equipamientos y reactivos utilizados, pero se diferenciaron en las soluciones estándar y el procedimiento utilizado para llegar a un resultado. Es por esto que estos ítems se consideran por separado en los incisos 3.2.3 y 3.2.4.

En particular, para la determinación de forrajes se consideró:

a. Soluciones

- 1 L de NaBH_4 0.2 % en NaOH 0.05 %.
- 2 L de HCl 10 %.
- Estándar madre de 1000 ppb Se en HCl 1%.
- Estándar 100 ppb Se en HCl 1%.

b. Método adición del estándar

Para la cuantificación de Se en forrajes fue necesario implementar el método de adición del estándar dada la interferencia variable del Cu. La adición del estándar es una herramienta útil para eliminar el efecto de interferencias variables de la matriz. El método es muy utilizado en espectrofotometría de absorción atómica. Se basa en realizar la cuantificación del Se nativo sobre el forraje problema y también medir el Se en muestras del mismo forraje adicionadas con concentraciones conocidas y diferentes de Se. Así, el Cu afectará de la misma manera al Se nativo que al adicionado, y ya que puede calcularse la magnitud de dicha interferencia en los estándares, puede corregirse en la muestra original (Miller, Miller, 1993).

Para llevar a cabo el método es necesario graficar la señal (absorbancia del equipo) vs. la concentración añadida, como puede verse en el ejemplo de la Figura 13.

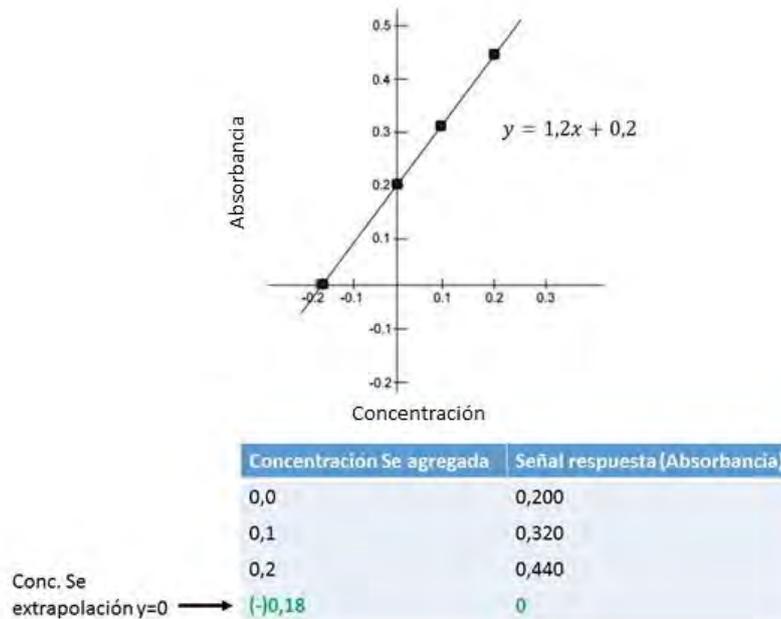


Figura 13. Ejemplo de gráfico de análisis de un analito por adición del estándar.

La señal (absorbancia) se grafica en el eje de ordenadas, mientras que en el eje de abscisas se representa la concentración de Se agregada a la muestra. Así se puede extrapolar “y”, para despejar “x” de la siguiente manera:

$$0 = 1,2x + 0,2 \rightarrow (-)0,18 = x$$

El valor absoluto de “x” será la concentración de analito en la muestra eliminando el efecto de interferencia (Miller, Miller, 1993).

Así, para evaluar cada muestra se prepararon 9 tubos de digestión colocando 1 g de forraje en los primeros 3, en otros 3 tubos 1 g de forraje con 1,25 mL estándar de 100 ppb y en los últimos 3 tubos 1 g de forraje con 2,5 mL del mismo estándar.

c. Digestión y pre-reducción

Se realizó la digestión con H₂SO₄, HClO₄ y HNO₃ concentrado, en una relación (1/3/5) (v/v/v). Los tubos se colocaron en la placa de digestión durante 2 horas 50 minutos, en programas de temperaturas entre 120 °C y 180 °C. El digesto resultante debió ser blanquecino o levemente amarillo. Dicho digesto se llevó a 25 mL con agua bidestilada. De esta manera, se dieron a los tubos las condiciones necesarias para convertir todo el

Se a especies +6 ó +4 y fue necesaria una pre-reducción para reducir todo el Se y llevarlo a un estado de oxidación +4.

Para la pre-reducción se tomaron 5 mL desde el digesto, se le agregaron 5 mL de ácido clorhídrico (50% v/v) y se llevó a 90 °C por 20 min en baño María. Las reacciones de pre-reducción se esquematizan en la Figura 14.

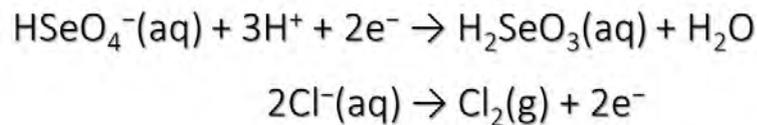


Figura 14. Esquema de reacción de pre-reducción del selenio en estado +6 (HSeO_4^-) a selenio en estado +4 (H_2SeO_3).

Como puede verse en el esquema, es necesaria una elevada acidez para hacer espontánea la reacción.

Entonces 1 g de pasto fue digerido y llevado a 25 mL, para luego, desde ahí tomar 5 mL, realizar la pre-reducción y resuspender a 25 mL. Por lo cual el factor de dilución resultante del tratamiento de la muestra fue:

$$FdF = \frac{25 \text{ ml}}{1 \text{ gr}} \times \frac{25 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 125$$

FdF: Factor de dilución del tratamiento de forrajes.

d. Cuantificación por plataforma de hidruros acoplada a un espectrofotómetro de absorción atómica:

La solución con Se mineralizado y reducido (en estado +4) se inyectó en la plataforma de hidruros y se lo trató con la solución de NaBH_4 0,2 %. De esta manera, el Se presente forma hidruro de Se (H_2Se) gaseoso, el cual es transportado por el gas *carrier* (argón) hasta una celda de cuarzo.

La celda es calentada eléctricamente a 930 °C para romper el hidruro en átomos de Se elemental (Se^0). Estos átomos en estado fundamental absorben energía lumínica proveniente de una lámpara específica de Se, e ingresan a un estado de excitación. Para salir de ese estado emiten la energía absorbida a una longitud de onda diferente, por lo que el equipo puede leer sólo la absorción. Cuanto mayor sea la concentración de átomos de Se, mayor será la proporción de luz absorbida.

De esta manera la PH-EAA cuantifica la absorción y, cotejando esta absorbancia con la de los estándares adicionados a la muestra, se puede calcular la concentración de Se en la muestra. A continuación, se presenta un ejemplo de cálculo de concentración de Se en forraje (Figura 15):

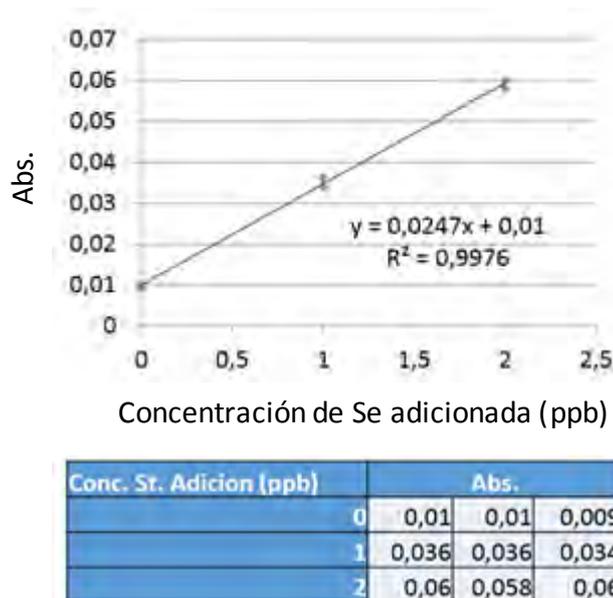


Figura 15. Ejemplo de curva de calibración por método de adición del estándar con absorbancia vs. concentración de selenio adicionada, utilizada en el cálculo de concentración de selenio en forraje.

A partir de la ecuación de la recta estimada, se reemplaza “y” por 0, se despeja “x” y se multiplica por el *FdF* resultando:

$$0 = 0,0247x + 0,01 \rightarrow x = (-)0,405$$

$$0,405 \times 125 = 50,6 \text{ ppb}$$

3.2.4. Cuantificación de selenio en fluido ruminal y soluciones acuosas:

En FR las lecturas se realizaron sin considerar el método de adición del estándar.

a. Soluciones:

- 1 L de NaBH₄ 0.2 % en NaOH 0,05 %.
- 2 L de HCl 10 %.
- Estándares para la recta de calibrado: se prepararon los estándares a partir de la solución de 100 ppb de Se, éstos fueron:
 - 0,25 ppb Se
 - 0,5 ppb Se
 - 1 ppb Se

- 2 ppb Se
- 5 ppb Se

b. Digestión y pre-reducción:

Se colocó en tubos de digestión, por triplicado, 5 mL de FR con H₂SO₄, HClO₄ y HNO₃ en relación (1/2/3) (v/v/v). Luego, los tubos se ubicaron en la placa de digestión durante 2 horas 40 minutos en programas de temperaturas entre 120 °C y 180 °C. El digesto resultante debió ser transparente o levemente amarillo. Dicho digesto se llevó a 25 mL con agua destilada.

Para la pre-reducción se tomaron 10 mL desde el digesto, se le agregaron 5 mL de HCl (quedando al 33 % v/v) y se llevó a 90 °C por 20 min en baño María.

El factor de dilución resultante del tratamiento de la muestra fue:

$$FdFR = \frac{25 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times \frac{25 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} = 12,5$$

FdFR: Factor de dilución del tratamiento de FR y soluciones acuosas.

c. Cuantificación por plataforma de hidruros acoplada al espectrofotómetro de absorción atómica:

La PH-EAA cuantifica la absorción de la solución incógnita y, cotejando esta absorbancia con la de los estándares de la curva de calibrado de concentración conocida, se calcula la concentración de Se en la solución, como en el ejemplo de la Figura 16.

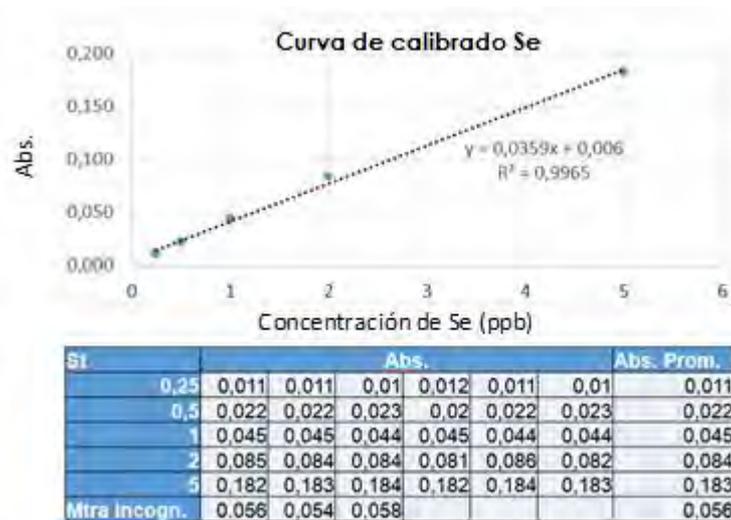


Figura 16. Ejemplo de curva de calibrado de absorbancia promedio vs. concentración de selenio en los estándares.

Para resolver el ejemplo de la Figura 16 se reemplaza la absorbancia promedio de la muestra incógnita por “y” en la ecuación de la recta, se despeja “x” y se multiplica el valor resultante por el factor de dilución:

$$x = 1.393 \text{ ppb} \times 12,5 = 17,409 \text{ ppb}$$

3.3. Performance de la metodología

Para verificar la confiabilidad de las técnicas de determinación de Se fue necesario evaluar su performance metodológica. Dicha evaluación requiere establecer, por un lado, los parámetros estadísticos a analizar y, por otro lado, los criterios de aceptación (CA), para cotejarlos y poder concluir sobre su aplicabilidad. Los parámetros estadísticos se extrajeron del apéndice F de la AOAC (2016). Los CA fueron previamente establecidos utilizando como guía algunas fuentes bibliográficas que se indicarán en cada caso.

3.3.1. Parámetros analizados - Cálculos

La guía de la AOAC establece los requerimientos analíticos de las metodologías. Estos parámetros fueron calculados de la siguiente manera (AOAC, 2016):

a. Límite de detección

Se lo define como la menor concentración del analito que puede cuantificarse, con un 99% de probabilidad que no sea un ruido del equipo. Se considera así que la

cuantificación por debajo del LOD deja de ser fiable, ya que la incertidumbre asociada a la medición sería mayor al valor de la medición en sí mismo.

$$LOD = Bco + 3 \times Sbco$$

Bco: Señal media de 10 blancos de calibración.

Sbco: Desvío estándar de los 10 datos.

La AOAC (ª2016) sugiere el cálculo del límite de cuantificación (LOQ) para la caracterización de la performance metodológica. El LOQ es la señal que puede diferenciarse de un ruido del equipo con una probabilidad muy cercana al 100%. Dicho límite se alcanzaba a concentraciones de Se innecesariamente más elevadas que para el LOD, ya que el LOQ considera la suma de la señal del blanco y 10 veces el desvío estándar de blanco. Así, se concluyó que la utilización del LOD como valor umbral era suficiente para caracterizar la performance de la técnica analítica (Ruggieri et al., 2016).

Los CA establecidos para este parámetro se ajustaron en función de la concentración más baja encontrada en bibliografía. Esta es: para FR 0,22 ppb (Serra, et al. 1994) y para forraje 13 ppb (Rosenfeld, Beath, 1964, Minson, 1990).

b. Rango aplicable

Se refiere al rango de concentraciones de Se que el método puede medir directamente. Se caracterizó por el intervalo que va desde el LOD hasta el último estándar de la recta de calibración con el que se haya trabajado, multiplicado por el factor de dilución de la muestra (*FdF* y *FdFR*).

$$LInf = LOD$$

LInf: Límite inferior del rango aplicable.

$$LSup = [St] \times FdFR \text{ ó } [St] \times FdF$$

LSup: Límite superior del rango aplicable.

FdFR: factor de dilución en FR (12,5).

FdF: Factor de dilución en forraje (125).

[St]: Concentración del último estándar de la curva de calibración (5 ppb).

Los CA de las dos técnicas fueron establecidos de diferentes maneras. Para la determinación en FR se consideró como mínimo y máximo la concentración más baja (0,220 ppb) y la más alta encontrada en bibliografía (9,68 ppb) (Panev et al., 2013).

Para la determinación en forraje, también el mínimo fue la concentración más baja reportada en bibliografía, pero para el valor máximo se consideró el doble del requerimiento de bovinos de 300 ppb (Rosenfeld, Beath, 1964; NRC, 1983; Minson, 1990; NRC, 1996; Panev et al., 2013).

c. Sesgo o Bias

Expresa la cercanía entre una respuesta medida y la respuesta teórica. Se estimó mediante el cociente entre el valor promedio medido de un material de referencia y su valor teórico, y su diferencia con 1, que es el valor óptimo de esta relación. El sesgo es un componente del error sistemático (AOAC, 2015).

En el presente trabajo no fue posible contar con estándares certificados de FR ni de forrajes. De esta manera, como lo sugiere la AOAC (2016), se utilizaron muestras fortificadas con una solución estándar certificada de 980 ppm de Se en 1% de HNO₃ PerkinElmer. Se analizaron 5 réplicas independientes en tres niveles de fortificación y el sesgo se calculó en función de la diferencia entre la concentración agregada y lo medido. El CA que se estableció corresponde a los informes de conferencias de Shah et al. (Shah et al., 1992; Shah, et al. 2000), ampliamente aceptado en análisis bioanalíticos. El cálculo fue:

$$Sesgo\% = \left[\left(\frac{Co}{Ca} \right) - 1 \right] \times 100$$

Co: Concentración obtenida.

Ca: Concentración agregada.

d. Precisión

Es el grado de dispersión entre los resultados obtenidos por medidas replicadas sobre un mismo objeto, bajo condiciones específicas. La dispersión de los resultados depende de la matriz de la muestra y de la concentración del analito, por lo que la precisión puede diferir sustancialmente según se utilicen altas o bajas concentraciones. Es un parámetro que se relaciona sólo con el error aleatorio. El diseño para la validación de técnicas por un solo laboratorio ofrece la posibilidad de caracterizarlo mediante la repetibilidad y la precisión intermedia (Magnusson, Örnemark, 2014; AOAC, 2015; Ruggieri et al., 2016):

d.1. Repetibilidad

Consiste en el grado de concordancia entre resultados de análisis independientes obtenidos con el mismo método, sobre la misma muestra, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, en un corto intervalo de tiempo (en el mismo día). Se analizaron en un mismo día 5 réplicas independientes de 3 muestras con diferentes niveles de concentración (Gonzales, Herrador, 2007).

No fue posible calcular este parámetro para la técnica de Se en forraje ya que, al utilizar la adición del estándar y considerando limitaciones de equipamiento, sólo pueden analizarse dos muestras en un mismo día, de las 5 requeridas. El CA establecido en FR, fue el sugerido por la AOAC en su apéndice F (º2016), el cual se indica en función de la concentración nativa de Se en la muestra, que rondaría entre 1 a 10 ppb de Se. Para cada muestra se calculó el coeficiente de variación porcentual por repetibilidad (denominado CVr %).

d.2. Precisión intermedia

Es el grado de concordancia entre los resultados de análisis independientes obtenidos con el mismo método, sobre la misma muestra, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, en diferentes días, con diferentes curvas de calibración. En el caso de la determinación de Se en forrajes se analizaron 13 réplicas independientes de la misma muestra leídas en 9 días diferentes. Mientras que, para la metodología en FR se analizaron 15 réplicas independientes en 3 días diferentes. Con los datos mencionados se calculó el coeficiente de variación porcentual de estas medidas (denominado CVpi%) para ambas técnicas. El CA establecido es el sugerido por la AOAC en su apéndice F (º2016) para la precisión por repetibilidad asumiendo que la variación entre días no es significativa.

e. Recuperación

La recuperación es la fracción del analito que es cuantificada desde una muestra fortificada. Para la metodología de FR, a partir de una misma muestra se analizaron 7 réplicas en 3 niveles de fortificación y para forrajes, fueron 7 réplicas en 2 niveles. Cada lectura se cotejó con la concentración de la muestra sin fortificar.

Tanto en FR como en forrajes, las fortificaciones se realizaron con una solución estándar certificada de 980 ppm de Se PerkinElmer. Las concentraciones adicionadas para la técnica de FR fueron 10, 25 y 50 ppb, mientras que para la de forrajes fueron 50

y 100 ppb. Dichas fortificaciones fueron hechas considerando que la concentración nativa de una muestra no debe ser inferior al 10 % de la fortificación, como lo menciona la AOAC en su apéndice F (2016). Por ejemplo, en el caso del FR, ya que la concentración nativa más alta encontrada en bibliografía fue de 9,68 ppb, no sería válido fortificar con más de 96,8 ppb de Se.

El CA establecido es el sugerido por la AOAC en su apéndice F (2016), que se indica en función de la concentración de la muestra. Se caracterizó el parámetro realizando el promedio de la recuperación porcentual para cada nivel de concentración, donde dicha recuperación porcentual (Rec%) se obtiene como:

$$Rec \% = \left(\frac{L_f - L_s}{C_f} \right) \times 100$$

L_f: Concentración leída en el FR fortificado.

L_s: Concentración leída en el FR sin fortificar.

C_f: Concentración de fortificación.

f. Incertidumbre relativa expandida

Parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando. Se compone de diversos aportes, como son: incertidumbre debida a la precisión del método (material de referencia certificado, repetibilidad), a la preparación de los patrones (solución madre, calibrado de balanzas, calibración de pipetas) y vinculada al equipamiento (repetibilidad del equipo, línea de calibrado) (Sánchez et al., 2009; AOAC, 2012; Brambilla, 2012; OAA, 2013; Ruggieri et al., 2016).

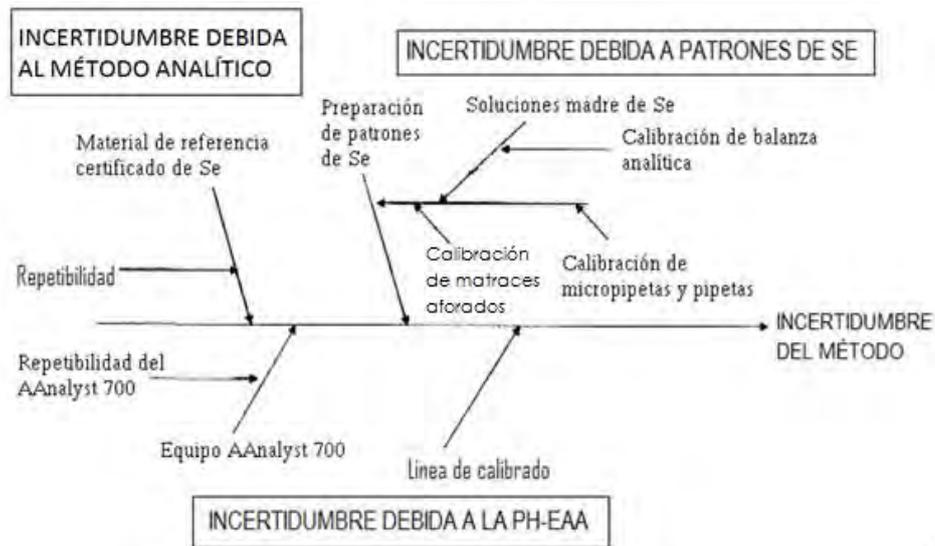


Figura 17. Contribuciones de la metodología a la incertidumbre (adaptación de Brambilla, 2012).

Dada la gran cantidad de contribuciones que influyen en este parámetro (Figura 17) su cálculo es muy engorroso. Así es que se planteó la estimación de la incertidumbre relativa expandida porcentual, a través del modelo de la “caja negra”. En este modelo, propuesto por Reyes et al. (2009), solo se consideran el sesgo y la precisión intermedia para el cálculo de la incertidumbre, como puede verse en la siguiente ecuación:

$$Urel\% = 2 \times \sqrt{\left(\frac{CVpi\%}{\sqrt{n}}\right)^2 + \left(\frac{Sesgo}{\sqrt{3}}\right)^2}$$

Urel%: incertidumbre relativa expandida.

CVpi%: coeficiente de variación porcentual de precisión intermedia.

n: número de días en los que se analizó la precisión intermedia.

Sesgo: Sesgo máximo obtenido.

Dado que este parámetro posee contribuciones de la incertidumbre asociada a la precisión intermedia y al sesgo, es que el CA de la incertidumbre relativa expandida no puede ser menor a ninguno de los respectivos CA.

3.4. Obtención de fluido ruminal:

3.4.1. Material:

- Lienzo de quesería 1 x 1 m.
- Termo plástico de 2 L.

3.4.2. Procedimiento:

El FR se obtuvo el día del ensayo colectando contenido ruminal desde un bovino fistulado donante. El material ruminal extraído se estrujó a través de un paño de quesería y el líquido obtenido fue transportado al laboratorio en un termo, conservando así la temperatura del mismo. En el laboratorio se volvió a pasar por el paño para separar el material particulado restante y obtener así el FR para el ensayo.

El bovino fistulado consumía una ración que consistía en 5 kg de fardo de alfalfa (Figura 18) y 7 kg de heno de gramíneas (Figura 19) por día.



Figura 18. Fardo de alfalfa, parte de la ración.



Figura 19. Muestra del heno de gramíneas.

La ración se muestreó para caracterizar:

- Contenido de Se (procedimiento 3.2.3),
- Digestibilidad de la materia seca (Van Soest, 1994).
- Fibra en detergente neutro (Komarek, Robertson, 1994)
- Fibra en detergente ácido (Komareck et al, 1993)
- Contenido de lignina (Goering, Van Soest, 1970).
- Almidón (MacRae, Armstrong, 1968)
- Proteína bruta (Horneck, Miller, 1998)
- Materia orgánica (AOAC International, 1990)
- Carbohidratos solubles en agua (Morris, 1948)

3.5. Estudio de liberación ruminal de selenio *in vitro*

3.5.1. Material

- Equipos Daisy II AnkomTech (Figura 23).
- Jarras de digestión Ankom de vidrio (Figura 20)
- Bolsas filtrantes Ankom F57 (Figura 21)
- Probeta graduada de 2 L.
- Balanza analítica Precisa 40 SM-200 A.
- Balanza granataria MicrowaSwiss 7720.
- Destilador por ósmosis inversa Thermo Scientific Barnstead Easy Pure II.
- Potenciómetro/peachímetro Chemicadet.



Figura 20. Jarras de digestión Ankom.



Figura 21. Bolsas filtrantes Ankom.

3.5.2. Reactivos

- Fosfato disódico dodecahidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) P.A.
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) P.A.
- Cloruro de sodio (NaCl) P.A.
- Cloruro de potasio (KCl) P.A.
- Cloruro de magnesio hexahidrato ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) P.A.
- Cloruro de calcio (CaCl_2) P.A.

3.5.3. Soluciones

- Solución madre de saliva artificial: Para 3 L de solución pesar:

Reactivo	Cantidad
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	55,35 g
NaHCO_3	147,0 g
NaCl	7,05 g
KCl	8,55 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	4,125 g
CaCl_2	0,6 g

Se lleva a volumen con agua destilada.

- Sulfato diamónico ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 2 M.
- Saliva artificial: Se prepararon 15,375 L con la mezcla de 3 L de solución madre de saliva artificial + 12 L de agua destilada + 0,375 mL de la solución de sulfato de amonio 2 M y, por último, se llevó a pH 6,9 gaseando con dióxido de carbono.
- Mezcla incorporada a las jarras de digestión: 1,760 mL de saliva artificial y 440 mL de FR.

3.5.4. Procedimiento

El análisis de la cinética de liberación y solubilización ruminal de Se se llevó a cabo mediante un estudio *in vitro*, en incubadores Daisy (Figura 23). Cada incubador Daisy aloja cuatro jarras de digestión con una tapa que permite la salida del gas generado. En el equipo, las jarras rotan suave y constantemente a una temperatura de 39,5 °C simulando las condiciones del rumen. En éstas se colocaron 2200 mL de volumen total entre FR, saliva artificial y agua de dilución (según correspondía), y 25 bolsas filtrantes Ankom con 500 mg de alfalfa seca y molida. Las bolsas Ankom fueron pre-tratadas con acetona, secadas al aire y, luego de colocarles la alfalfa, selladas térmicamente (Figura 22). La cantidad de forraje agregado en el volumen de la jarra supone, para un animal de 470 kg consumiendo un forraje de buena calidad (2,5 % de MS/Kg PV), un 10 % de llenado ruminal. Se utilizaron 2 incubadores Daisy simultáneamente, configurados a la misma temperatura, utilizando el mismo FR y saliva artificial, por lo que se consideraron como un sistema único.



Figura 22. Sellado térmico de bolsas filtrantes Ankom.



Figura 23. Incubadores Daisy Ankom.

3.5.5. Diseño experimental para la liberación ruminal de selenio.

Con el fin de evaluar el efecto del FR sobre la liberación de Se se realizó un diseño completamente aleatorizado donde las jarras de digestión eran las unidades experimentales a las que se le aplicaron 2 tratamientos, utilizando 3 repeticiones:

Tratamiento 1 (T1): 440 mL de FR + 1760 mL de saliva artificial + 25 bolsas con 500 mg de alfalfa.

Tratamiento 2 (T2): 440 mL de agua destilada + 1760 mL de saliva artificial + 25 bolsas con 500 mg de alfalfa.

El T1 permitió cuantificar el Se aportado por el FR *per se* más el liberado desde la alfalfa por el accionar microbiano sobre el forraje, sumado a la solubilidad propia del mineral en medio acuoso. El T2 cuantificó el Se aportado por el forraje sólo por solubilización en medio acuoso, ya que no contenía FR. También, se incluyeron 2 jarras para aportar información descriptiva adicional:

Jarra testigo (JT): 440 mL de FR + 1760 mL saliva artificial, la que permitió caracterizar descriptivamente la posible variación de Se en el tiempo en ausencia de la alfalfa.

Jarra blanco (J0): 440 mL de FR + 1760 mL de agua destilada, que se utilizó para descontar una posible contaminación de la saliva artificial al ser contrastada con JT.

De cada jarra se realizaron 10 extracciones de 20 mL en los siguientes horarios: 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 5; 7; 12 y 24 h, considerándose como momento cero aquel en que se agregaron las bolsas con alfalfa para su digestión. Los horarios fueron escogidos luego

de realizar 2 pruebas exploratorias de liberación ruminal *in vitro* de 48 h, en las que se observó mayor variabilidad en el contenido de Se al inicio, por lo que se buscó aumentar los puntos de muestreo en los primeros horarios y no considerar más allá de las 24 h.

Al finalizar el ensayo se cuantificó el Se en la alfalfa remanente de las bolsas filtrantes correspondientes al T1 y al T2 siguiendo el procedimiento del apartado 3.2.3.

3.6. Análisis estadístico

Con el diseño empleado se buscó establecer el efecto sobre la liberación de Se de los dos tratamientos (T1 y T2) y del tiempo, así como de su interacción. Los datos obtenidos se analizaron mediante el siguiente modelo:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \delta_{ij} + \beta_k + (\tau\beta)_{ik} + \varepsilon_{ijk} \quad ; \quad i = 1, 2 \quad j = 1, 2, 3 \quad k = 1, \dots, 10 \quad (M1)$$

Siendo:

y_{ijk} : Concentración de Se en el i-ésimo tratamiento, la j-ésima repetición y el k-ésimo tiempo de extracción.

μ : Media general de la concentración de Se.

τ_i : Efecto del i-ésimo tratamiento.

δ_{ij} : Error experimental aleatorio del i-ésimo tratamiento y la j-ésima repetición.

β_k : Efecto del k-ésimo tiempo de extracción.

$(\tau\beta)_{ik}$: Efecto de interacción del i-ésimo tratamiento y el k-ésimo tiempo de extracción.

ε_{ijk} : Error aleatorio asociado con la k-ésima medida repetida en el i-ésimo tratamiento y j-ésima repetición.

En principio, se asumió que los δ_{ij} son independientes e idénticamente distribuidos (*iid*) $N(0, \sigma_\delta^2)$ y ε_{ijk} son $N(0, \sigma_\varepsilon^2)$, pero donde $cov(\varepsilon_{ijk}, \varepsilon_{ijk'})$ no es necesariamente cero. Se consideraron distintas estructuras de covarianza entre las concentraciones de Se de diferentes tiempos en una misma unidad experimental y se evaluó cuál fue la más apropiada utilizando criterios de información (AIC o criterio de información de Akaike, y BIC o criterio de información de Schwarz). También se evaluó el cumplimiento de los supuestos a través de un análisis de residuos y se consideraron medidas correctivas en caso que alguno no se satisfaga. Además, en caso de considerarse modelos anidados, para obtener el más adecuado, se compararon los mismos usando una prueba de cociente de verosimilitudes. En caso de detectarse interacción o diferencia entre las medias de la concentración de Se de los distintos

momentos, se utilizó la prueba de mínima diferencia significativa para realizar la comparación de las medias correspondientes.

También se contrastaron las jarras JT vs J0 y JT vs T1. Dado que para JT y J0 no se hicieron repeticiones, sólo se caracterizó descriptivamente la evolución en el tiempo de la concentración de Se en ambas situaciones. Para contrastar T1 y JT solo a nivel descriptivo y asumiendo que los valores obtenidos para JT pudieran considerarse como valores poblacionales, se utilizó un modelo de medidas repetidas para caracterizar la diferencia en la concentración de Se entre T1 y JT a través del tiempo. Si la diferencia en la concentración de Se entre T1 y JT cambiaba según el tiempo de extracción, se evaluó si en cada tiempo dicha diferencia puede considerarse distinta de cero o no, mediante una prueba t.

Los análisis se realizaron mediante el programa R versión 3.3.0 (R Core Team, 2016).

4. RESULTADOS

Los resultados se presentan de la siguiente manera: los correspondientes a los parámetros de performance analítica de la técnica de determinación de Se en forraje y en FR, y por otro lado, los de la liberación ruminal de Se desde la alfalfa.

4.1. Verificación de la performance analítica

Los resultados obtenidos al analizar los parámetros requeridos para corroborar la performance de la técnica, tanto para FR como para forraje, se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados y criterios de aceptación para cada uno de los parámetros analizados para verificar la performance de las técnicas. Datos completos en el apéndice I.

	Fluido ruminal		Forraje	
	CA	Valor obtenido	CA	Valor obtenido
LOD	< 0,22 ppb	0,196 ppb	< 13 ppb	1,957 ppb
Rango aplicable	0,22-9,68 ppb	0,196-62,5 ppb	13-600 ppb	1,957-625 ppb
Sesgo	15 %	10 ppb: 9,2 %	15 %	50 ppb: 3,4 %
		25 ppb: 10,2 %		100 ppb: -11,6 %
		50 ppb: 4,34 %		
Precisión por repetibilidad	CVr < 21 %	3,28 ppb: 6,2 %	No fue posible analizarla	
		3,52 ppb: 9,8 %		
		3,75 ppb: 10,8 %		
Precisión intermedia	CVpi < 21 %	3,52 ppb: 10,2 %	CVpi < 21 %	23,83 ppb: 13,6 %
Recuperación	80 – 110 %	10 ppb: 109,2 %	80 – 110 %	50 ppb: 88,4 %
		25 ppb: 96,7 %		100 ppb: 95,1 %
		50 ppb: 96,8 %		
Incertidumbre relativa expandida	<21 %	16,48 %	<21 %	16,20 %

LOD: límite de detección; CVr: coeficiente de variación por repetibilidad; CVpi: coeficiente de variación por precisión intermedia.

Las metodologías se desarrollaron en función del equipamiento y las capacidades disponibles en el laboratorio, siguiendo los lineamientos metodológicos establecidos por Raptis et al. (1983), Alfthan (1984) y Tinggi et al. (1992).

Como puede verse en la Tabla 6 todos los parámetros estudiados se encuentran dentro de los CA preestablecidos.

4.2. Liberación ruminal

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para el estudio de la liberación ruminal de Se *in vitro*.

4.2.1. Análisis de forrajes

Se realizó el análisis de las características nutricionales y el contenido de Se en los forrajes consumidos por el animal donante de FR y de la alfalfa utilizada en el ensayo de liberación. Los resultados se presentan en las Tablas Tabla 7, Tabla 8 y Tabla 9.

Tabla 7. Caracterización nutricional de la alfalfa utilizada en el ensayo.

Materia orgánica	84,4 %
Digestibilidad de materia seca	69,5 %
Proteína	26,3 %
Fibra en detergente neutro	34,0 %
Fibra en detergente ácido	23,4 %
Almidón	n.d.
Carbohidratos solubles en agua	5,4 %
Lignina	3,7 %
Selenio	349,5 ppb

Tabla 8. Caracterización nutricional del heno de alfalfa con el que se alimentó al animal donante.

Materia orgánica	91,4 %
Digestibilidad de materia seca	60,8 %
Proteína	14,5 %
Fibra en detergente neutro	49,9 %
Fibra en detergente ácido	34,9 %
Almidón	3,4 %
Carbohidratos solubles en agua	5,6 %
Lignina	8,1 %
Selenio	50,6 ppb

Tabla 9. Caracterización nutricional del heno de gramíneas con el que se alimentó al animal donante.

Materia orgánica	93,2 %
Digestibilidad de materia seca	41,0 %
Proteína	5,0 %
Fibra en detergente neutro	71,6 %
Fibra en detergente ácido	41,1 %
Almidón	0,5 %
Carbohidratos solubles en agua	6,1 %
Lignina	5,4 %
Selenio	167,7 ppb

Según la información de las Tabla 8 y Tabla 9 se puede estimar el contenido de Se de la dieta del animal donante, dado que era alimentado con 5 kg de heno de alfalfa y 7 kg de heno de gramíneas:

$$\frac{[(5 \text{ kg} \times 50,6 \text{ ppb de Se}) + (7 \text{ kg} \times 167,7 \text{ ppb de Se})]}{12 \text{ kg}} = 118,9 \text{ ppb de Se}$$

Dicha concentración de Se se encuentra dentro de los requerimientos nutricionales adecuados (100 - 300 ppb).

4.2.2. Liberación ruminal *in vitro* de selenio

A continuación, se muestran los resultados de la liberación ruminal *in vitro* de Se en diferentes condiciones.

a. Concentración de Se en los tratamientos 1 y 2

En la Figura 24 pueden observarse las concentraciones de Se en función del tiempo de extracción medidas en el FR en T1 y T2 respectivamente, y las medias con sus desvíos estándar en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

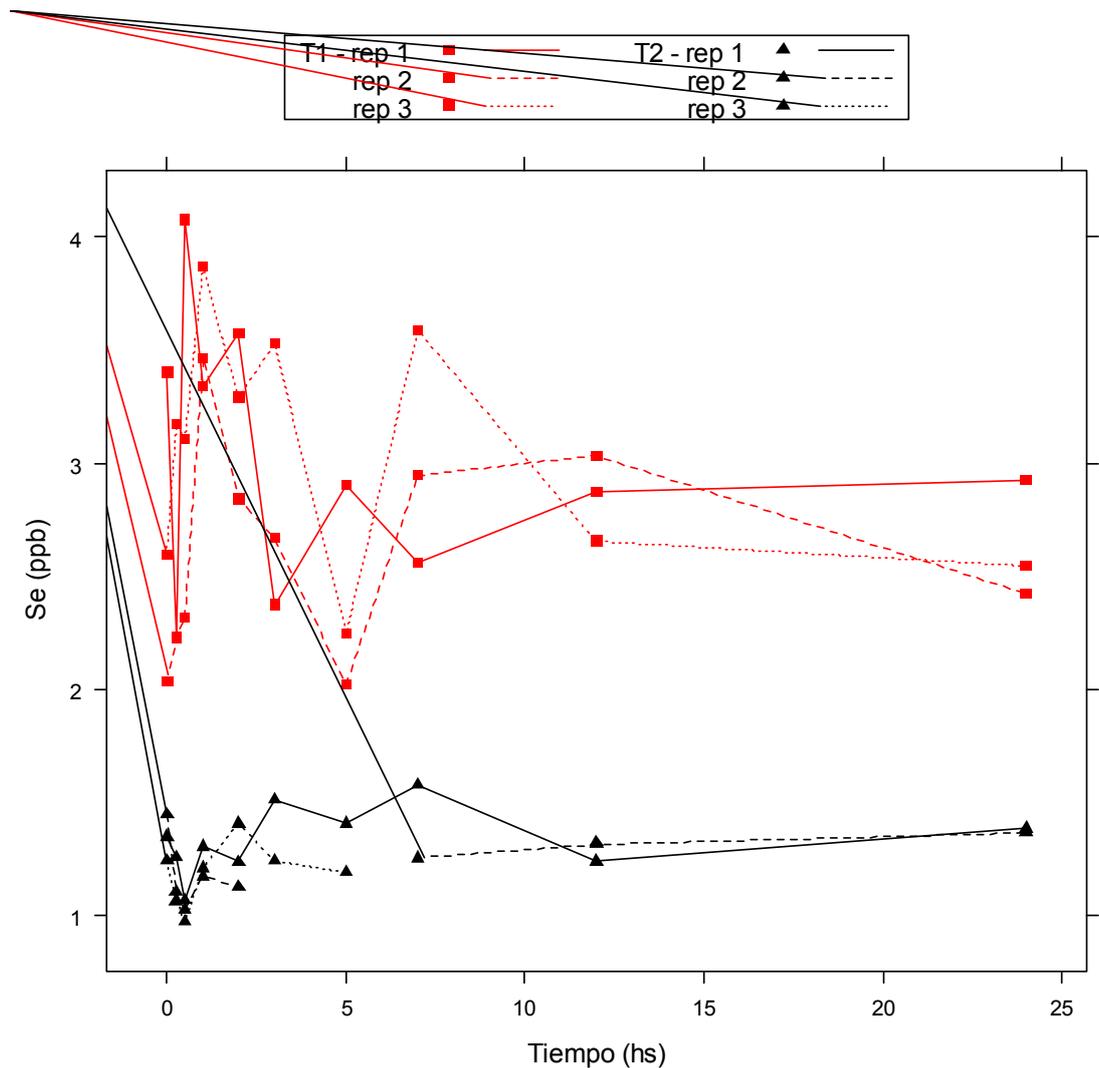


Figura 24. Liberación de selenio en el tratamiento 1 y 2 (T1= tratamiento 1: fluido ruminal + saliva artificial + alfalfa; T2= tratamiento 2: saliva artificial + alfalfa), en las tres repeticiones.

A dichos datos, inicialmente se les ajustó el modelo M1 que consideraba homogeneidad de varianzas según el tratamiento, pero el análisis de residuos mostró que la varianza residual difirió según el tratamiento, por lo que se ajustó un modelo (M2) que considera que los ε_{ijk} son $N(0, \sigma_{\varepsilon_i}^2)$.

Tabla 10. Comparación de los modelos M1 y M2.

Modelo	Grados de libertad	AIC	BIC	Prueba de cociente de verosimilitudes (PCV)	Valor p de PCV
M1	22	97,29	132,12		
M2	23	71,82	108,24	24,47	<0,0001

Tanto la prueba de cociente de verosimilitudes, como los criterios de información (AIC y BIC) y el análisis de residuos mostraron que este último modelo (M2) resultó mejor. Además, se evaluaron diferentes estructuras de covarianza entre las concentraciones de Se de los diferentes tiempos en una misma unidad experimental, resultando adecuada la que supone ausencia de covarianza entre las observaciones de los diferentes tiempos. En base a este modelo final, se obtuvo el análisis de la varianza de la Tabla 11.

Tabla 11. Análisis de la varianza obtenido a partir del modelo M2.

Fuente de variación	Grados de libertad del numerador	Grados de libertad del denominador	Valor F	Valor P
Tratamiento	1	4	244,46	0,0001
Tiempo	9	32	2,97	0,0109
Tratamiento × Tiempo	9	32	1,77	0,1124

A partir del Anova (Tabla 11) puede concluirse que no hay interacción entre tratamiento y tiempo de extracción ($p=0,1124$), y que hay efecto del tiempo de extracción ($p= 0,0109$) y del tratamiento ($p= 0,0001$) sobre la concentración de Se.

Es decir, las concentraciones promedio de Se difieren entre T1 y T2 (con y sin FR), como así también, entre al menos dos de los tiempos. Esto último se resume en la Tabla 12. En dicha tabla, las medias que comparten la misma letra no difieren significativamente ($\alpha = 0,05$). En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** también se muestran las medias de las concentraciones de Se para cada horario.

Tabla 12. Medias mínimo cuadráticas de la concentración de selenio (ppb) en el tratamiento 1 y 2 a diferentes tiempos de extracción, sus errores estándar y el resultado de las comparaciones múltiples.

Tratamiento		Tiempo (h)										Medias*
		0	0,25	0,5	1	2	3	5	7	12	24	
1	1	2,678 (0,296)	2,543 (0,296)	3,170 (0,296)	3,559 (0,296)	3,235 (0,296)	2,856 (0,296)	2,389 (0,296)	3,031 (0,296)	2,855 (0,296)	2,631 (0,296)	2,895 a (0,098)
	2	1,344 (0,068)	1,141 (0,068)	1,021 (0,068)	1,228 (0,068)	1,256 (0,068)	1,366 (0,081)	1,287 (0,081)	1,401 (0,081)	1,292 (0,068)	1,363 (0,081)	
Medias*		2,011 b (0,152)	1,842 b (0,152)	2,095 ab (0,152)	2,394 a (0,152)	2,245 a (0,152)	2,111 ab (0,154)	1,838 b (0,154)	2,216 ab (0,154)	2,073 ab (0,152)	1,997 b (0,154)	

*letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($\alpha = 0,05$).

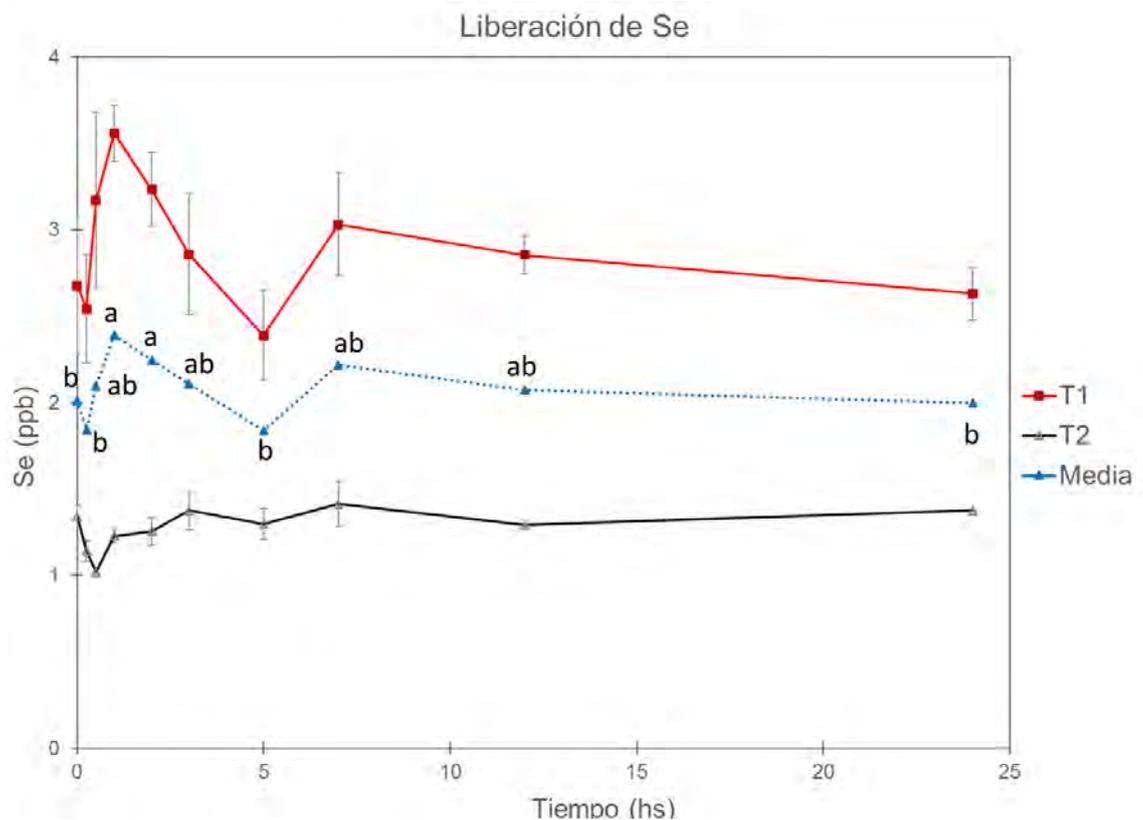


Figura 25. Medias y desvíos estándares de la liberación de selenio en cada horario, en los dos tratamientos (T1= tratamiento 1: fluido ruminal + saliva artificial + alfalfa; T2= tratamiento 2: saliva artificial + alfalfa), y medias de la liberación de selenio en cada horario con los resultados de las comparaciones múltiples correspondientes. Las medias que comparten la misma letra no difieren significativamente ($\alpha = 0,05$).

b. Análisis de alfalfa remanente del tratamiento 1 y del tratamiento 2

Al finalizar el ensayo se cuantificó el Se en la alfalfa remanente en las bolsas filtrantes agrupándolas por tratamiento. Los resultados fueron:

- Alfalfa T1: 338,38 ppb Se.
- Alfalfa T2: 276,11 ppb Se.

Fue necesario agrupar las 75 bolsas de cada tratamiento (25 bolsas × 3 jarras) dado que de las 25 bolsas de cada jarra se recuperaron entre 4 y 5 g de forraje (unos 12 g entre las 3 jarras) y se necesitaban 9 g de forraje por análisis.

c. Análisis de jarra blanco y jarra testigo

Se caracterizó el contenido de estas jarras al momento inicial para verificar la posible contaminación de la saliva artificial con Se. En la Tabla 13 se muestran las concentraciones de Se en los triplicados de la JT y la J0 al inicio del ensayo.

Tabla 13. Concentración en cada submuestra, su respectiva media y desvío estándar de las jarras testigo y blanco en el inicio (0 h). (J0= jarra blanco: agua bidestilada + fluido ruminal; JT= jarra testigo: saliva artificial + fluido ruminal)

Jarra	Submuestra	Se (ppb)	Media (ppb)	Desvío estándar
JT	1	2,416	1,929	0,422
	2	1,667		
	3	1,702		
J0	1	2,784	1,968	0,722
	2	1,711		
	3	1,409		

En la Figura 26 se muestran los resultados de la concentración de Se promedio de los triplicados en FR a través del tiempo en ambas jarras.

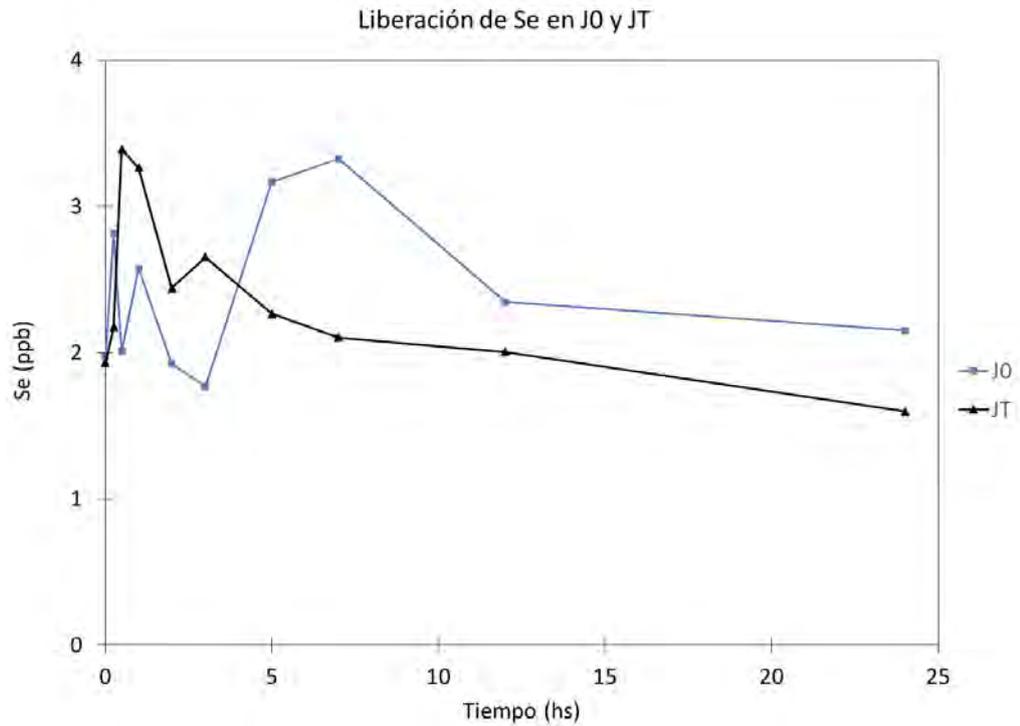


Figura 26. Concentración de Se en la jarra blanco y jarra testigo en función del tiempo. (J0= jarra blanco: agua bidestilada + fluido ruminal; JT= jarra testigo: saliva artificial + fluido ruminal)

Al analizar gráficamente el comportamiento de la concentración de Se en las jarras J0 y JT puede notarse que en ambas existió un pico de máxima concentración, pero desfasado en el tiempo (pico máximo de JT alrededor de las 0,5 - 1 h y de J0 alrededor de las 5 - 7 h).

d. Análisis exploratorio de tratamiento 1 y jarra testigo

En la Figura 27 se muestra la evolución en el tiempo de la concentración de Se en JT y la concentración media en T1.

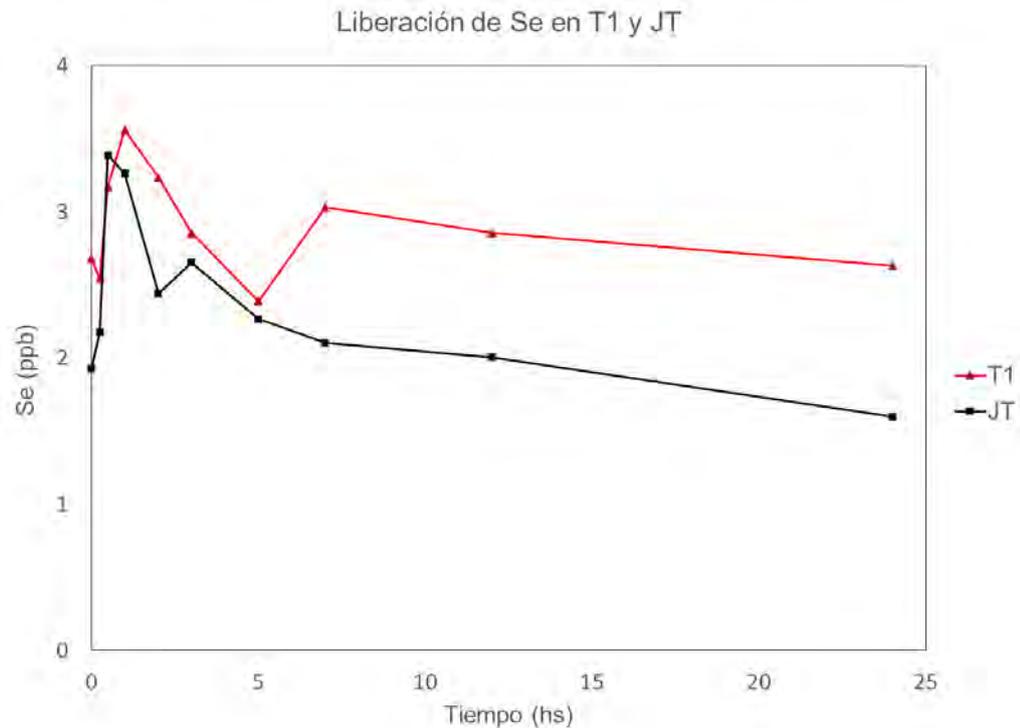


Figura 27. Liberación de selenio en la jarra testigo y el tratamiento 1 en función del tiempo. (T1= tratamiento 1: fluido ruminal + saliva artificial + alfalfa; JT= jarra testigo: saliva artificial + fluido ruminal)

Puede verse en el gráfico que desde la hora 5 a la 7, en T1 hay un aumento de la concentración de Se que no se da en JT. A partir del análisis, se encontró que la diferencia en la concentración de Se entre T1 y JT cambia según el tiempo de extracción ($p= 0,022$). En la Tabla 14. Diferencias en el contenido medio de selenio entre el fluido ruminal del tratamiento 1 y la jarra testigo para cada tiempo de extracción. Tabla 14 se muestran dichas diferencias para cada tiempo de extracción y el valor p correspondiente a evaluar si la concentración media de Se en T1 difiere de la concentración de Se en JT, al comparar estas diferencias con cero.

Tabla 14. Diferencias en el contenido medio de selenio entre el fluido ruminal del tratamiento 1 y la jarra testigo para cada tiempo de extracción. Valor de t y valor p correspondiente.

Tiempo	Diferencia (ppb)	Valor t	P valor
0	0,749	2,48	0,0234*
0,25	0,369	1,22	0,2378
0,5	-0,220	-0,73	0,4770
1	0,297	0,98	0,3397
2	0,795	2,63	0,0171*

3	0,204	0,67	0,5086
5	0,123	0,41	0,6899
7	0,928	3,07	0,0066**
12	0,851	2,81	0,0115*
24	1,033	3,42	0,0031**

De la comparación surge que la concentración media de Se en T1 difiere significativamente de la concentración de Se en JT a las horas 0 y 2, y a partir de la hora 7.

5. DISCUSIÓN

5.1. Verificación metodológica

5.1.1. Límite de detección

En ambas técnicas se obtuvieron límites de detección aceptables comparando con los CA. No fue posible encontrar referencias para contrastar este valor en FR y forraje en las mismas condiciones. Sí fue posible cotejarlos con algunos límites de detección obtenidos en muestras biológicas, los cuales se resumen en la Tabla 15:

Tabla 15. Comparación de límites de detección de selenio obtenidos por diferentes autores en muestras biológicas.

Muestra analizada	LOD*	Referencia
Alimentos Australia (cereales, carnes, huevos, pescados)	3,0 ppb	Tinggi et al., 1992
Alimentos Eslovaquia (huevos, papas, ajos, leches)	0,24 ppb	Kadrabova et al., 1997
Cereales, legumbres y frutas	0,21 ppb	Diaz-Alarcon et al., 1996

*Sin convertir por el factor de dilución.

Los LOD obtenidos para ambas técnicas, sin considerar el factor de dilución, fueron 0,0156 ppb (para FR: $0,0156 \times 12,5 = 0,196$ ppb ; para forraje: $0,0156 \times 125 = 1,957$ ppb), los cuales fueron inferiores a lo obtenido por los autores consultados. Esto se traduce en que las técnicas poseen una mejor capacidad de responder selectivamente a Se, con un 99 % de certeza de que la respuesta no es un ruido del equipo.

5.1.2. Rango aplicable

El rango obtenido en ambas técnicas está alineado con lo requerido por el CA. En el caso de la metodología para determinación de Se en FR, es aplicable a cualquiera de los intervalos de concentraciones de Se hallados en la bibliografía que se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Rango de concentraciones de selenio en fluido ruminal informado en la bibliografía.

Rango concentraciones de Se (ppb)	Referencia bibliográfica
[0,948; 1,659]	Faixová et al., 2007
[0,220; 7,140]	Serra, et al. 1994

[0,5; 2,0]	Koenig et al., 1997
[0,91; 9,68]	Panev et al., 2013

En el caso de la metodología para determinación de Se en forraje, el rango aplicable obtenido [1,975; 625 ppb] incluye el rango de requerimientos nutricionales informado por el NRC (1983) que es de 100 a 300 ppb, y las concentraciones medias en forrajes informadas en la Tabla 3, pero no es aplicable a la totalidad de las concentraciones posibles halladas en la bibliografía.

5.1.3. Sesgo

En la determinación de Se en FR, el sesgo obtenido en las tres fortificaciones ensayadas, estuvo alineado con el CA establecido de sesgo %, que es menor a 15 %. En los resultados de la Tabla 6 puede apreciarse que el sesgo fue positivo, de modo que se tiende a sobreestimar la concentración del analito en el rango de concentraciones ensayadas.

En la determinación en forrajes se obtuvieron diferencias entre las dos concentraciones de fortificación ensayadas y el valor teórico, las cuales estuvieron alineadas con el CA pre establecido. Hasta 50 ppb de fortificación, el sesgo fue positivo, lo que indica una aceptable sobreestimación de los resultados. Mientras que para una fortificación de 100 ppb, el sesgo fue negativo indicando una aceptable subestimación de los resultados.

Los sesgos aquí obtenidos, tanto para la determinación de Se en FR como para forrajes, son comparables a los obtenidos por otros autores con la misma técnica en muestras biológicas (Tabla 17).

Tabla 17. Rango de sesgo % en la determinación de Se en muestras biológicas obtenidos por autores consultados.

Concentración analizada (ppb)	Sesgo %	Muestra analizada	Referencia bibliográfica
[110; 3000]	[-6,6; 9,09]	Harina integral e hígado bovino.	Tinggi et al., 1992.
[10; 50]	[-5,33; 10]	Suero sanguíneo	Mayer et al., 1992.
[80; 3600]	[-5; 3,3]	Tejidos biológicos marinos.	Maher, 1987.

[49,4; 90,7]	[-2,83; 4,74]	Plasma sanguíneo y orina.	Macpherson et al., 1988.
150	4,0	Suero sanguíneo.	Navarro et al., 1995.

En la Tabla puede verse que la mayoría de los autores obtuvieron valores negativos de sesgo. En nuestro caso, sólo en la técnica de determinación en forraje obtuvimos un sesgo negativo de -11,6% para lecturas de 100 ppb (Tabla 6). Coincidiendo con los autores mencionados, los valores negativos de sesgo % se obtuvieron en las mayores concentraciones de Se analizadas.

A su vez, tanto en la determinación en FR como en forrajes, los mayores valores absolutos de sesgo (FR 10,2 % y forraje 11,6 %) fueron superiores que lo reportado, por lo tanto, poseen un mayor sesgo o error sistemático.

5.1.4. Precisión

a. Repetibilidad

La precisión por repetibilidad para la técnica de FR (3,28 ppb: 6,2 %; 3,52 ppb: 9,8 %; 3,75 ppb: 10,8 %) estuvo dentro del CA que era CVr % < 21 % sugerido por la guía de la AOAC (ª2016) para las 3 concentraciones ensayadas.

Autores consultados obtuvieron los valores de CVr % de la Tabla 18.

Tabla 18. Rango de coeficiente de variación porcentual por repetibilidad encontrado en bibliografía.

Concentración analizada (ppb)	CVr %	Muestra analizada	Referencia bibliográfica
[82; 224]	[2,3; 4,3]	Suero, sangre entera y orina.	Alfthan, 1984.
150	7,6	Suero sanguíneo.	Navarro et al., 1995.
--	[6,5; 16,0]	Cereales, legumbres y frutas secas.	Díaz-Alarcon et al., 1996
[18; 575]	[1,1; 3,8]	Huevos, papas, ajo y leche.	Kadrabova et al., 1997
[60; 300]	[1,6; 5,0]	Suero sanguíneo.	Hao, et al. 1996.
[29; 848]	16,0	Alimentos humanos: brócoli, cerveza, queso, etc.	Mindak, et al. 1999.

Cuatro de los seis autores consultados obtuvieron CVr% menores a los obtenidos en este trabajo, pero estos analizaron muestras biológicas con concentraciones de Se superiores (desde 18,0 a 848,0 ppb), lo cual puede disminuir la dispersión relativa de los datos.

b. Precisión intermedia

La precisión intermedia obtenida en ambas metodologías (Forraje: 23,83 ppb: 13,6 %; FR: 3,52 ppb: 10,2 %) se encuentra debajo del CA establecido de CVpi %<21 %. Alfthan (1984) obtuvo valores de 3,6 a 5,7 % de CVR%. Éste trabajó en muestras biológicas como suero, sangre entera y orina, y obtuvo una menor dispersión relativa, pero con concentraciones de 49,4 a 1025,0 ppb, las cuales son superiores a las ensayadas en el presente trabajo.

5.1.5. Recuperación

Las recuperaciones con muestras fortificadas, tanto en forraje como en FR (Tabla 6), están incluidas dentro del CA de 80 - 110 % sugerido por la AOAC (2016). Además, estuvieron en concordancia con lo obtenido por otros autores, quienes cuantificaron Se sobre muestras biológicas (Tabla 19).

Tabla 19. Rango de recuperaciones porcentuales de selenio obtenidas por diferentes autores.

Recuperación (%)	Concentración de Se agregada (ppb)	Muestra analizada	Referencias bibliográficas
101	[20; 25]	Suero, sangre entera y orina.	Alfthan, 1984.
[94; 103]	[50; 200]	Sangre.	Clinton, 1977.
[103; 107]	[50; 200]	Pasturas.	
[95; 103]	[76; 3700]	Tejidos biológicos marinos.	Maher, 1987.
[93,9; 101,1]	[66,5; 400]	Huevos, papas, ajo y leche.	Kadrabova et al., 1997.
[91; 101]	[730; 1400]	Hígado.	Miksa et al., 2005.

90	--	Papas, zanahorias, zapallo, uvas.	Smrkolj, Stibilj, 2004.
101,11	150	Suero sanguíneo.	Navarro et al., 1995.
[94,7; 110]	[10; 50]	Suero sanguíneo.	Mayer et al., 1992.
[99; 104]	[700; 1140]	Harina integral e hígado bovino.	Tinggi et al., 1992.
[97,2; 95,5]	[49,4; 90,7]	Plasma sanguíneo y orina.	Macpherson et al., 1988.

5.1.6. Incertidumbre relativa expandida

La incertidumbre relativa expandida (forraje: 16,20 %; FR: 16,48 %) se encontró por debajo del CA establecido menor al 21 Urel%. No fueron hallados valores en bibliografía para comparar este parámetro en FR o forrajes.

5.1.7. Análisis integral de la performance metodológica

Un análisis integral de la performance metodológica, permite corroborar el correcto desempeño de las metodologías de determinación de Se, lo cual deja instalada en el laboratorio de Bioquímica Clínica Veterinaria del grupo de Sanidad Animal del INTA Balcarce una capacidad analítica de la que antes no disponía.

5.2. Liberación ruminal *in vitro* de selenio

A pesar de que se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica, se hallaron pocos trabajos referidos a liberación ruminal de Se que respalden o refuten los resultados que fueron obtenidos en esta tesis.

5.2.1. Caracterización nutricional de forrajes

La caracterización nutricional de los forrajes realizada en la sección 4.2.1, cuyos resultados se muestran en las Tabla 7, Tabla 8 y Tabla 9, se encontraron dentro de los esperables para cada uno de ellos, según lo citado por Guaita et al. (2011).

5.2.2. Comparación de tratamiento 1 y tratamiento 2

Tal como se mostró en los resultados de la sección 4.2.2, junto con los gráficos de las Figura 24 y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, las concentraciones de Se mostraron una varianza diferente entre tratamientos, siendo mayor en aquel que contiene FR (T1).

A su vez se mostró que la concentración de Se difiere entre los tratamientos, así como entre los tiempos de extracción. El comportamiento de las concentraciones de Se de los diferentes momentos (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) puede compararse con la variación en la actividad bacteriana encontrada por Cone et al. (1996), quienes investigaron la producción de gas *in vitro*, a partir de tres alimentos a base de una gramínea, mazorcas de maíz y gramínea, y silaje de maíz, los cuales eran incorporados a un FR + saliva artificial. Estos autores obtuvieron producciones de gas a través del tiempo de incubación como las que se muestran en la Figura 28.

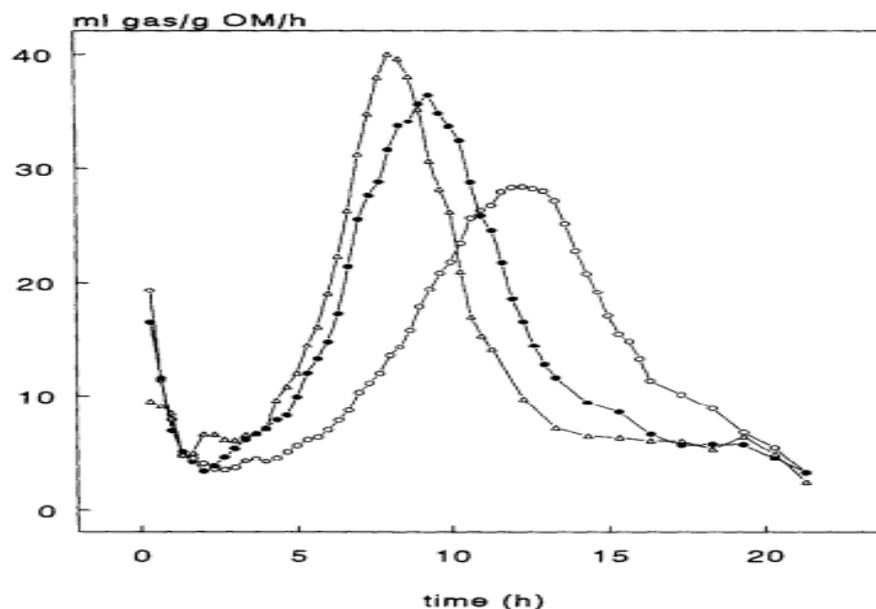


Figura 28. Producción de gas "in vitro" de 3 alimentos diferentes expresada en mL de gas/g de materia orgánica vs. horas de incubación (Cone et al, 1996).

La producción de gas se relaciona con el tamaño de la población microbiana y con su actividad, según lo informado por El-Shazly et al. (1965). Así, una actividad microbiana a través del tiempo de incubación, con una distribución como la Figura 28, podría explicar la variabilidad de la concentración de Se que se observa en la curva media de los tratamientos (línea punteada en la Figura 25). Podría especularse que el contenido de Se en los tratamientos tuvo una respuesta inversa a la actividad de los microorganismos. Esto se puede observar en la Figura 29 comparando el gráfico "a", correspondiente al ensayo de Cone et al. (1996) antes mencionado, con el gráfico "b"

que representa la evolución del contenido de Se (promedio de los tratamientos) obtenido en la presente tesis. Se ve que la etapa inicial del gráfico "a", donde cae la actividad microbiana, coincide con el aumento del contenido de Se observado en el gráfico "b". En la próxima etapa, cuando la actividad aumenta en "a" la concentración de "b" disminuye. Se puede relacionar la baja actividad inicial en el gráfico "a" al período necesario para que las bacterias lleven a cabo la colonización de las fibras del forraje. De esta manera, los microorganismos tendrían reducido su metabolismo y no estarían asimilando el Se, por lo cual el mismo aumenta en el medio de incubación. También McAllister, Rode, Major et al. (1990) y McAllister, Rode, Cheng et al. (1990) mencionan que sobre granos de cereales y cáscara de cebada, utilizados húmedos e íntegros en un tamaño que simula la masticación del animal (6 mm) la etapa inicial de colonización puede demorar entre 2 y 4 h. Superado este período de colonización, las bacterias muestran un aumento de la actividad que a su vez concuerda con un descenso del Se. Las mismas asimilarían el Se del medio y lo fijarían en sus proteínas microbianas, y al estar ubicadas en las fibras de la alfalfa, dentro de las bolsas filtrantes se registraría el descenso en el contenido de Se observado desde la hora 1 a la 5 en la Figura 29.b.

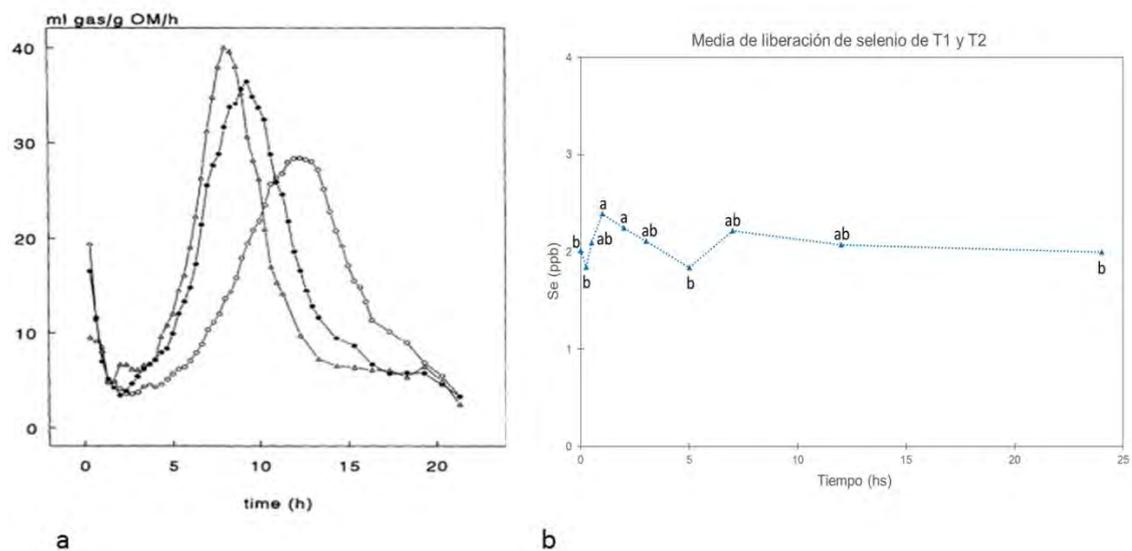


Figura 29. Gráficos "a" de actividad bacteriana por Cone, et al (1996) y "b" liberación media de selenio obtenida en este ensayo.

En la Figura 29.b puede verse que las mayores concentraciones de Se, que difieren con la concentración inicial, se detectan a 1 h de iniciado el ensayo. Este sería el tiempo que los microorganismos ruminales necesitan para colonizar al forraje, por lo que el Se puede liberarse desde la alfalfa al medio. El tiempo habría sido menor que el obtenido por McAllister, Rode, Major et al. (1990) y McAllister, Rode, Cheng et al. (1990) dado

que el material se encontraba seco y molido más finamente, lo cual facilitaría la colonización microbiana sobre las fibras. El pico de Se encontrado concuerda con lo informado por Serra et al. (1994), quienes en un ensayo *in vivo* realizaron una cuantificación de Se en FR de animales bajo dieta de heno de *timothy grass* (*Phleum pratense*) suplementado con Se. Estos autores obtuvieron la mayor concentración de Se en el FR entre la 1 y las 3 h luego de la suplementación. Similar comportamiento fue hallado por Hidiroglou et al. (1974), quienes analizaron el metabolismo ruminal *in vivo* de la Se-metionina en ovinos. Entre sus resultados mencionaron que la mayor concentración de Se en el FR la hallaron 2 horas después de la inyección ruminal de Se-metionina, y luego de este tiempo la concentración de Se desciende dada la absorción del mineral por parte de los microbios presentes.

Con respecto a otros oligoelementos, Serra et al. (1997) cuantificaron el porcentaje de liberación de Cu, Zn, Mo y Mn desde forrajes filipinos en un ensayo *in vivo*. Estos obtuvieron el mayor porcentaje de liberación para todos los minerales ensayados a las 3 h de colocadas las bolsas filtrantes con forraje.

Si bien en el presente trabajo no fue posible distinguir significativamente un solo punto mínimo de concentración de Se a través del tiempo (Tabla 12), analizando la Figura 29.b se observa que uno de los momentos con menor concentración de Se es a las 5 h. Esto, en el caso del FR, podría relacionarse con la asimilación del mineral por parte de los microbios, luego de adherirse y colonizar las fibras del forraje. En este sentido, Mainville et al. (2009) realizaron un ensayo de suplementación *in vivo* con Se orgánico e inorgánico y cuantificaron la evolución de la concentración del elemento en los microorganismos ruminales. Obtuvieron la máxima concentración de Se en los mismos a las 3 h de iniciado el contacto del suplemento con los forrajes. Así, en este caso, el descenso en el contenido de Se promedio que se observa desde las horas 1 - 2 a la 5, podría estar explicado por el aumento de la concentración de Se en los microorganismos ubicados dentro de las bolsas filtrantes.

Por otro lado, estudiando la liberación ruminal de algunos macrominerales, Correa (2006) analizó tres muestras (m1, m2 y m3) de un mismo forraje (*Pennisetum clandestinum*). En su conclusión, describe dos cinéticas de liberación. Una de liberación inmediata, como por ejemplo para el K, cuyo gráfico se muestra en la Figura 30, y una de liberación progresiva en el tiempo, como por ejemplo para el Ca, que se muestra en la Figura 31.

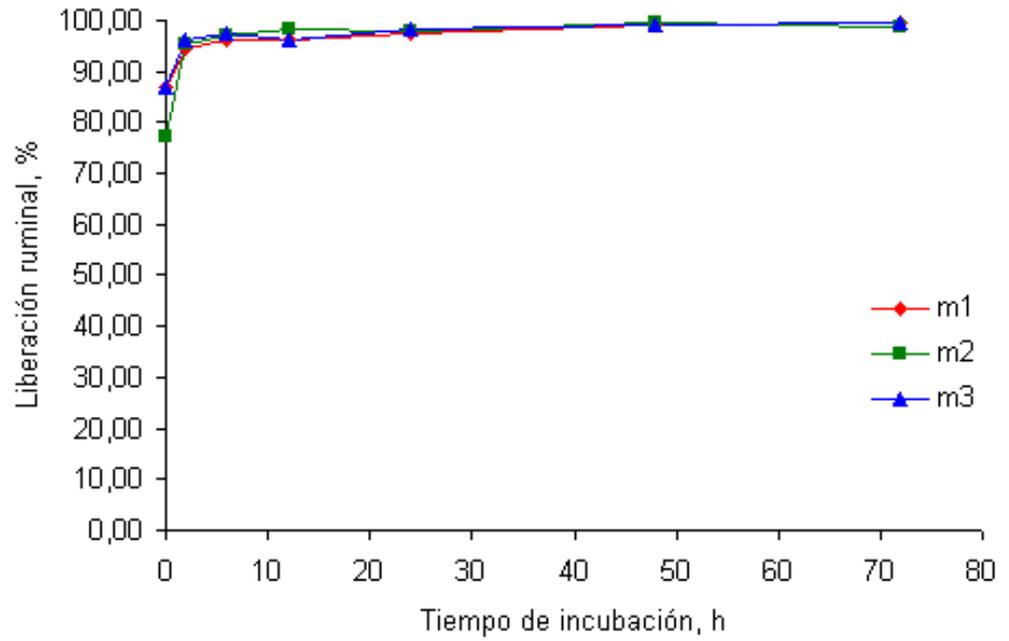


Figura 30. Cinética de liberación ruminal in situ de potasio (%) en función del tiempo de incubación (Correa, 2006).

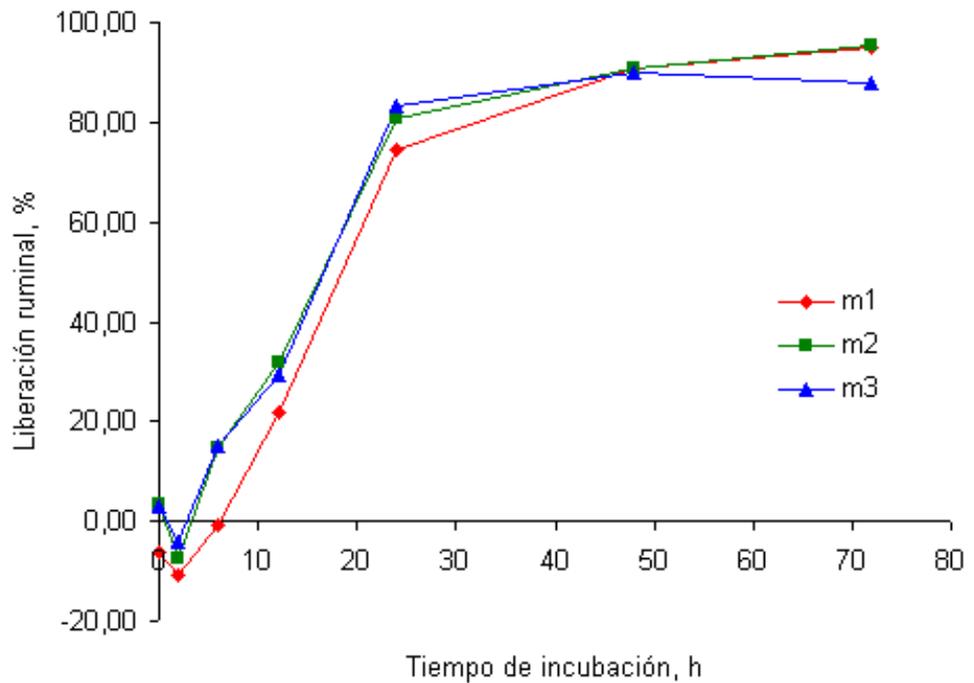


Figura 31. Cinética de liberación ruminal in situ de calcio (%) en función del tiempo de incubación (Correa, 2006).

Contrastando las dos Figuras puede notarse que la liberación del Ca es progresiva en el tiempo y que demora al menos 24 h para estabilizarse en su máximo. Los datos obtenidos por Correa (2006) le permitieron ajustar modelos clásicos de cinética de liberación ruminal. En el presente trabajo, debido a la distribución de los datos obtenida (Figura 24 y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) no fue posible ajustar satisfactoriamente este tipo de modelo para la liberación del Se.

Čerešňáková et al. (2007) realizaron un análisis de la liberación ruminal *in sacco* (bolsas con forraje en un rumen *in vivo*) de macrominerales. Colocaron 5 forrajes, 3 gramíneas y 2 leguminosas, con similar degradabilidad y analizaron la liberación de minerales desde éstos, entre los que estaba el Ca y K. Observaron una liberación rápida para el K, y una liberación progresiva en el tiempo para el caso del Ca, similar a lo obtenido por Correa (2006). Čerešňáková et al. (2007) midieron el contenido de Ca en los forrajes a 6 h de iniciado el ensayo y observaron que la concentración del mineral se había incrementado en todos los forrajes. Atribuyeron dicho aumento a la colonización de microbios sobre fibra no digestible dentro de las bolsas. En la Figura 29.b se muestra algo similar, ya que en la hora 5 se observó un descenso en la concentración de Se del medio, por lo cual se podría asumir que también se estaría fijando el Se en los microbios ubicados en las fibras no digestibles de la alfalfa dentro de las bolsas.

Con los resultados del presente trabajo se podría decir que la liberación de Se no sería inmediata como la liberación del K, sino que se asemejaría más a la del Ca, ya que es paulatina en el tiempo. Si bien no se encontraron diferencias significativas desde la hora 3 a la 24, en términos generales, la liberación de Se tiende a un aumento hasta la hora 1 y 2, un descenso hasta la hora 5, para luego mantenerse relativamente estable hasta la hora 24. Algunos autores refuerzan esta idea y permiten especular con una liberación de Se progresiva en el tiempo. Underwood y Suttle (2003) indicaron que animales alimentados con forraje de mayor digestibilidad incurrieran en problemas de deficiencia del mineral. También Minson (1990) y Suttle (2010) mencionan que las leguminosas, en general, tienen una menor disponibilidad de Se comparadas con las gramíneas lo cual podría relacionarse con que estas últimas, usualmente, poseen una menor digestibilidad.

Así, un mayor tiempo de permanencia en el rumen aumentaría la proporción de Se liberado. Por el contrario, si el alimento sale del rumen rápido (mayor tasa de pasaje), lo hará con gran parte del Se unido a las proteínas bacterianas (hora 5 en el gráfico b de la Figura 29) y este sería menos asimilable. En contraste, un alimento con baja digestibilidad y tasa de pasaje permitiría que se supere el tiempo de mayor actividad

microbiana (aproximadamente de 8 a 12 h) (Figura 28) y se favorezca la liberación de Se desde el forraje.

No se hallaron diferencias significativas en la concentración de Se entre la hora 0 y las 24 horas. Esto se explicaría teniendo en cuenta que el animal donante era alimentado con un forraje con 118,9 ppb de Se (calculada en la sección 4.2.1), que se encuentra dentro de los requerimientos del oligoelemento indicados en la sección 2.7.4. Así, al colocar en la digestión *in vitro* la alfalfa que posee también un nivel adecuado de Se en su composición de 349,5 ppb, es esperable que el contenido de Se se mantenga y/o tienda a aumentar levemente. En los gráficos del tratamiento T1 (Figura 24 y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) puede observarse dicho comportamiento entre el estadio inicial y final del ensayo. En un futuro ensayo debería considerarse que el contenido de Se de la dieta del animal donante sea bajo y analizar la liberación *in vitro* en estas condiciones.

5.2.3. Comparación descriptiva entre la jarra blanco y la jarra testigo

Del análisis realizado en la sección 4.2.2.c, donde se compara una jarra que contiene FR + saliva artificial (JT) vs. otra que contiene FR + agua bidestilada (J0), la similitud de valores observados mostraría que, en las condiciones del ensayo, la saliva no aporta Se.

No hay evidencias estadísticas de que J0 y JT efectivamente tengan ese comportamiento, ya que no se realizaron repeticiones. Dado que en estas jarras no existía forraje, lo observado podría ser explicado sólo por el accionar de los microbios que se encuentran en suspensión en el FR. Pero para demostrar esto, sería necesario realizar otro ensayo replicando estas jarras y, además, utilizar algún inhibidor microbiano (antibiótico, bactericida).

5.2.4. Comparación entre tratamiento 1 y jarra testigo

El análisis que se muestra en la Tabla 14, junto con el comportamiento observado en la Figura 27, evidencian que la diferencia entre JT y T1 es significativa a partir de la hora 7 hasta la 24. Dicho comportamiento podría relacionarse con la presencia de alfalfa y la liberación de Se a partir de ésta. Considerando esta situación, en la que las curvas de liberación de Se en FR con (T1) y sin alfalfa (JT) se diferencian luego de 7 hs, podría sugerirse que la liberación desde la alfalfa es progresiva en el tiempo.

5.2.5. Concentración de selenio en alfalfa

La buena digestibilidad y el alto contenido de Se de la alfalfa utilizada en el ensayo indican que ésta puede cubrir los requerimientos del mineral, aún en una producción animal exigente. Según Suttle (2010) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**Tabla 4), una vaca lechera de 500 kg que produce 20 L de leche/día, consumiendo alfalfa de 69 % de DMS, tiene un requerimiento de 34 µg Se/kg MS. Considerando una eficiencia de absorción del 29 % del Se ingerido, se puede calcular el contenido mínimo de Se del forraje:

$$\frac{34 \mu\text{g de Se/ kg MS}}{0,29} = 117\mu\text{g de Se/kg MS}$$

Considerando los forrajes remanentes en las bolsas del ensayo, el menor contenido de Se hallado en el forraje remanente de T1, estaría vinculado a la presencia de los microorganismos ruminales, los cuales están adheridos a las fibras dentro de las bolsas filtrantes. Čerešňáková et al. (2007) mencionaron que, en el caso del Ca, esta adhesión a las fibras puede incrementar el contenido de mineral en el forraje. Además, según lo reportado por Mainville et al. (2009), los microbios ruminales pueden llegar a tener aproximadamente 363,9 ppb de Se, que aportarían al valor final de Se leído en la alfalfa del T1. También Koenig et al. (1997) refuerzan esta idea, pues informaron que las bacterias aisladas del rumen pueden contener entre 2,3 y 3,9 veces la concentración original de Se del forraje de la dieta.

6. CONCLUSIONES

- Las metodologías de determinación de Se por PH-EAA en forraje y en FR poseen un desempeño adecuado para los fines requeridos según los CA establecidos y siguiendo los lineamientos de la AOAC.
- Se verificó que la presencia de FR, en la digestión in vitro causa una mayor variabilidad en la liberación del mismo.
- Se comprobó que la liberación de Se a través del tiempo tuvo un incremento hasta lograr un valor máximo entre las horas 1 y 2, para luego descender hasta la hora 5 a partir de la cual se mantuvo estable.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AOAC INTERNATIONAL. 1990. Official methods of analysis. 15th. ed Association of Official Analytical Chemists,, Washington DC pp. 1-684
- AOAC INTERNATIONAL. 2012. Appendix K: Guidelines for single-laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals pp.1-32 [en línea] AOAC, Official Methods of Analysis, 19th. ed. <http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/eoma_appendix_k.pdf> [Consulta: 13/06/2018].
- AOAC INTERNATIONAL. 2015. Accuracy, trueness, error, bias, precision, and uncertainty: what do these terms mean? [en línea] AOAC, Inside Laboratory Management <http://tdrm.aoac.org/rm_docs/RM%20Documents/ILM_Accuracy_Trueness_2015_Weitzel.pdf> [Consulta: 13/06/2018].
- AOAC INTERNATIONAL. 2016 Appendix F: Guidelines for standard methods performance requeriments pp. 1-16 [en línea] AOAC, Official Methods of Analysis, 19th. ed. <http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf > [Consulta: 13/06/2018].
- ALFTHAN, G. 1984. A micromethod for the determination of selenium in tissues and biological fluids by single-test-tube fluorometry. *AnalyticaChimica Acta*. 165: 187-194.
- ARTEEL, G. E.; HELMUT S. 2001. The Biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 10(4): 153–58.
- BARCELOUX, D.G. 1999. Selenium. *Clinical Toxicology*. 37 (2): 145-172.
- BASIGALUP, D. H. R.; RODRÍGUEZ, R. O.; SPADA, N. E.; COLLINO, M. D. C.; DARDANELLI, D. J.; DE LUCA, J. L.; PAGANO, F. 2007. El cultivo de la alfalfa en la Argentina. [en línea] Ediciones INTA. <https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-el_cultivo_de_la_alfalfa_en_la_argentina.pdf> [Consulta: 26/10/2018].
- BEHNE, D.; KYRIAKOPOULOS, A. 2001. Mammalian selenium-containing proteins. *Annual Review of Nutrition*. 21(1): 453-473.

- BERRETT, S.; HEBERT, C. N. 1979. A semi-quantitative spot test for glutathione peroxidase in blood of cattle and sheep for the assessment of biological selenium status. *The Veterinary Record*. 105(7): 145-146.
- BOGGERO, C.; CASTRO, R. 2005. Carencia de Selenio (Se) y vitamina E. *Archivos de Zootecnia*. (34): 113-120.
- BENES, S. E.; ROBINSON, P. H.; CUN, G. S. 2015. Depletion of selenium in blood, liver and muscle from beef heifers previously fed forages containing high levels of selenium. *Science of the Total Environment*. 536: 603–608. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.07.096.
- BRAMBILLA, E. C. 2012. Validación de métodos analíticos para determinación de nitratos en suelo. Facultad de Ciencias. Exactas y Naturales, Universidad Nacional de La Pampa. 51 p.
- BYE, R.; ENGVIK, L.; LUND, W. 1983. Thiourea as a complexing agent for reduction of copper interference in the determination of selenium by hydride generation/atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry*. 55(14): 2457-2458.
- CABRERA C. T.; SÁNCHEZ S. D. 2000. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Revista Cubana de Cardiología*. 14(1): 55-60.
- CEBALLOS, A.; WITTEWER, F.G.; CONTRERAS, P.A.; QUIROZ, E.; BÖHMWALD, H.L. 1999. Actividad de glutatión peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selenio. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* (34): 2331–2338.
- ČEREŠŇÁKOVÁ, Z.; FLÁK, P.; POLÁČIKOVÁ, M.; CHRENKOVÁ, M. 2007. In sacco macromineral release from selected forages. *Czech Journal of Animal Science*. 52: 175-182.
- CLINTON, E. 1977. Determination of selenium in blood and plant material by hydride generation and atomic-absorption spectroscopy. *Analyst*. 102(1212): 187-192.

- COMBS, G. F.; COMBS, S. B. 1984. The nutritional biochemistry of selenium. *Annual Review of Nutrition*. 4(1): 257-280.
- COMBS, G.F.; COMBS, S.B. 1986. The role of selenium in nutrition. 1st.ed. Academic Press, Inc. 532 p. doi: 10.2174/1875041901104010115.
- CONE, J. W.; VAN GELDER, A. H.; VISSCHER, G. J. W.; OUDSHOORN, L. 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Animal Feed Science and Technology*. 61(1-4): 113-128.
- CORREA, H. J. 2006. Cinética de la liberación ruminal de macrominerales en pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) cosechado a dos edades de rebrote. *Livestock Research for Rural Development*. 18(6): 101-117.
- CSEH, S. B.; DRAKE, M. L.; BRAMBILLA, E. C. 2013. Deficiencia de Se en bovinos según la época del año y la región en Argentina. *Revista Argentina de Producción Animal*. 33: 17-43.
- DÍAZ-ALARCÓN, J. P.; NAVARRO-ALARCÓN, M.; LOPEZ-GARCÍA DE LA SERRANA, H.; LOPEZ-MARTINEZ, M. C. 1996. Determination of selenium in cereals, legumes and dry fruits from southeastern Spain for calculation of daily dietary intake. *Science of the Total Environment*. 184(3): 183-189.
- DÍAZ, R.; GALINDO, J.; BOCOURT, R.; LAURENCIO, M.; PÉREZ, M. 2008. Los microorganismos del rumen y su papel en la fisiología digestiva del rumiante (Doctoral dissertation) Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos, Facultad de Agronomía: Cuba, pp.1-25.
- DIJKSTRA, J.; FORBES, J. M.; FRANCE, J. 2005. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. CABI. 746 p.
- EL-SHAZLY, K.; HUNGATE, R. E. 1965. Fermentation capacity as a measure of net growth of rumen microorganisms. *Applied Microbiology*. 13(1): 62-69.
- FAIXOVÁ, Z.; VÁCZI, P.; MAKOVÁ, Z.; SZABÓOVÁ, R. 2007. Haematological, blood and rumen chemistry changes in lambs following supplementation with se-yeast. *Acta Veterinaria Brno*. 76(1): 3-8. <http://doi.org/10.2754/avb200776010003>.

- FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; COLLINGS, R.; HURST, R. 2010. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 91(5): 1484S-1491S.
- FINCO, D. R.; KANEKO, J. J. 1989. Clinical biochemistry of domestic animals. In: Keen, C.L.; Graham, T.W. (eds.) *Trace element*. 4^o ed. Academic Press, pp. 772-776.
- FINLEY, J. W. 2006. Bioavailability of selenium from foods. *Nutrition Reviews*. 64(3): 146-151.
- GERLOFF, B. J. 1992. Effect of selenium supplementation on dairy cattle. *Journal of Animal Science*. 70 (12): 3934-3940. <http://doi.org/10.2527/1992.70123934x>.
- GISSEL, G.; GUPTA, U. C.; LAMAND, M.; WESTERMARCK, T. 1984. Selenium in soils and plants and its importance in livestock and human nutrition. *Advances in Agronomy*. 37: 397-460.
- GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. 1970. Forage fiber analyses (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications). USDA-ARS agricultural handbook 379. US Government Printing Office, Washington, D.C. 20 p.
- GONZALEZ, A. G.; HERRADOR, M. Á. 2007. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Analytical Chemistry*. 26(3): 227-238. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009>.
- GUAITA, M.S.; FERNANDEZ, H.H. 2005. *Tabla de composición química de alimentos para rumiantes*. INTA EEA Balcarce, Argentina. Publicaciones Regionales. 60 p.
- HAO, D.Q.; XIE, G.-H.; ZHANG, Y.; TIAN, G. 1996. Determination of serum selenium by hydride generation flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*. 43(4): 595-600.
- HARRISON, J. H.; CONRAD, H. R. 1984. Effect of dietary calcium on selenium absorption by the nonlactating dairy cow 1, 2, 3. *Journal of Dairy Science*. 67(8): 1860-1864.

- HIDIROGLOU, M.; JENKINS, K.; KNIPFEL, J. E. 1974. Metabolism of selenomethionine in the rumen. *Canadian Journal of Animal Science*. 54(3): 325-330.
- HOLBEN, H.D., SMITH, A.M. 1999. The diverse role of selenium within selenoproteins. *Journal of the American Dietetic Association*. 99(7): 836-843.
- HORNECK, D. A.; MILLER, R. O. 1998. Determination of total nitrogen in plant tissue. *Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*. 2: 75-83.
- IRAM. 301: 2000/ISO/IEC 17025. 2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. IRAM. Buenos Aires. 29 p.
- KADRABOVA, J.; MADARIC, A.; GINTER, E. 1997. The selenium content of selected food from the Slovak Republic. *Food Chemistry*. 58 (1-2): 29-32.
- KOENIG, K. M.; BUCKLEY, W. T.; SHELFORD, J. A. 1990. True absorption of selenium in dairy cows: Stable isotope tracer methodology and effect of dietary copper. *Canadian Journal of Animal*. 71: 175–183.
- KOENIG, K. M.; RODE, L. M.; COHEN, R. D.; BUCKLEY, W. T. 1997. Effects of diet and chemical form of selenium on selenium metabolism in sheep. *Journal of Animal Science*. 75(3): 817-827.
- KOMAREK, A.R., ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P.J. 1993. A comparison of methods for determining ADF using the filter bag technique versus conventional filtration. *Journal of Dairy Science*. 77 (Supl. I): 24-26
- KOMAREK, A. R.; ROBERTSON, J. B. 1994. Comparison of the filter bag technique to conventional filtration in the Van Soest NDF analysis of 21 feeds. In *Proceedings of the National Conference on Forage Quality, Evaluation and Utilization*. University of Nebraska. 78 p.
- MACDONALD, D. W.; CHRISTIAN, R. G.; WHENHAM, G. R.; HOWELL, J. 1976. A review of some aspects of vitamin E-selenium responsive diseases with a note on their possible incidence in Alberta. *Canadian Veterinary Journal*. 17(3): 61-71.

- MACPHERSON, A. K.; SAMPSON, B.; DIPLOCK, A. 1988. Comparison of methods for the determination of selenium in biological fluids. *Analyst*. 113(2): 281-283.
- MACRAE, J.C.; AMSTRONG, D.G. 1968. Enzyme method for determination of alpha-linked glucose polymers in biological materials. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 19: 578-581.
- MADDIPATI, K. R.; MARNETT, L. J. 1987. Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. Purification and properties of a selenium-dependent glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*. 262(36): 17398-17403.
- MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U. (eds.). 2014. *Eurachem Guide: the fitness for purpose of analytical methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics 2nd.ed.* pp1-59.
- MAHER, W. A. 1987. Decomposition of marine biological materials for the determination of selenium by fluorescence spectrometry. *Microchemical Journal*. 35(1): 125-129.
- MAINVILLE, A. M.; ODONGO, N. E.; BETTGER, W. J.; MCBRIDE, B. W.; OSBORNE, V. R. 2009. Selenium uptake by ruminal microorganisms from organic and inorganic sources in dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*. 89(1): 105-110.
- MAYER, D.; HAUBENWALLNER, S.; KOSMUS, W. 1992. Modified electrical heating system for hydride generation atomic absorption spectrometry and elaboration of a digestion method for the determination of arsenic and selenium in biological materials. *Analytica Chimica Acta*. 268(2): 315-321.
- MCALLISTER, T. A.; RODE, L. M.; MAJOR, D. J.; CHENG, K. J.; BUCHANAN-SMITH, J. G. 1990. Effect of ruminal microbial colonization on cereal grain digestion. *Canadian Journal of Animal Science*. 70(2): 571-579.
- MCALLISTER, T. A.; RODE, L. M.; CHENG, K. J.; SCHAEFER, D. M.; COSTERTON, J. W. 1990. Morphological study of the digestion of barley and maize grain by rumen microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*. 30(1-2): 91-105.

- MCDOWELL, L. R. 1996. Feeding minerals to cattle on pasture. *Animal Feed Science and Technology*. 60(3-4): 247-271.
- MEHDI, Y.; DUFRASNE, I. 2016. Selenium in cattle: a review. *Molecules*. 21(4): 545. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-498310-6.50007-9>
- MIKSA, I. R.; BUCKLEY, C. L.; CARPENTER, N. P.; POPPENG, R. H. 2005. Comparison of selenium determination in liver samples by atomic absorption spectroscopy and inductively coupled plasma – mass spectrometry. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 17(4): 331-340.
- MILLER, J. N.; MILLER, J. C. 1993. *Estadística para química analítica*. 2ª.ed. Addison-Wisley Iberoamericana. Argentina 210 p.
- MILTIMORE, J. E.; RYSWYK, A. V.; CHAPMAN, F.; KALNIN, C.; PRINGLE, W. 1975. Selenium concentrations in British Columbia forages, grains, and processed feeds. *Canadian Journal of Animal Science*. 55(1): 101-111.
- MINDAK, W. R.; DOLAN, S. P. 1999. Determination of arsenic and selenium in food using a microwave digestion-dry ash preparation and flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*. 12(2): 111-122.
- MINSON, D. J. 1990. *Forage in ruminant nutrition*. Academic Press, San Diego. 483 p.
- MORRIS, D. L. 1948. Quantitative determination of carbohydrates with dreywood's anthrone Reagent. *Science* 107: 254-255.
- MOXON, A.L. 1937. Alkali disease or selenium poisoning. *Agricultura Experiment Station. South Dakota Station College of Agriculture and Mechanic Arts. Brookings S.D. . Boletin No. 311, 91 p.*
- NAVARRO, M.; LÓPEZ, H.; RUIZ, M. L.; GONZÁLEZ, S.; PEREZ, V.; LÓPEZ, M. C. 1995. Determination of selenium in serum by hydride generation atomic absorption spectrometry for calculation of daily dietary intake. *Science of the Total Environment*. 175(3): 245-252.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1983. *Selenium in Nutrition*. National Academy Press. Washington, DC. 174 p.

- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7a.ed.rev. National Academy Press, Washington, D.C. pp.105-150. <http://doi.org/10.17226/9825>.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1996. Nutrient requirements of beef cattle. 7a. ed.. National Academy Press, Washington, D.C. pp.54-68.
- NOGUERA, R. R.; OCHOA, S. L. P. 2007. Modelación de la cinética de degradación de alimentos para rumiantes. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 20(2):174-182.
- ORSKOV, E. R.; MCDONALD, I.1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. The Journal of Agricultural Science. 92(2): 499-503.
- ORGANISMO ARGENTINO DE ACREDITACIÓN (OAA). 2013. Guía para la validación de métodos de ensayo. GUI-LE-03. Versión: 1. 11 p.
- ORUÑA, R. R.; LOZANO RAMÍREZ, R. G.; GUTIÉRREZ, L. F. 2002. Factores estructurales de la pared celular del forraje que afectan su digestibilidad. Ciencia Universidad Autónoma Nueva León. 5(2):180-189.
- PAPPAS, A. C. E.; ZOIDIS, P. F.; SURAI, G. Z.2008. Selenoproteins and maternal nutrition. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 151(4): 361-372. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.08.009>.
- PAGLIARICCI, H. R.; OHANIAN, A.; PEREYRA, T.; GONZALEZ, S. 2002. Utilización de pasturas. [en línea] Sitio argentino de producción animal. [en línea] <<https://es.scribd.com/document/199139642/08-Utilizacion-de-Pasturas>> [consulta: 28/09/2017]: 1–28.
- PANEV, A.; HAUPTMANOVÁ, K.; PAVLATA, L.; PECHOVÁ, A.; FILÍPEK, J.; DVORAK, R. 2013. Effect of supplementation of various selenium forms and doses on selected parameters of ruminal fluid and blood in sheep. Czech Journal of Animal Science. 58: 37-46.
- PERKINELMER. 2000. Flow injection mercury/hydride analysis: recommended analytical conditions and general information. USA pp. 1-16; 2-29.

- PONCE, M. A. 2011. Producción de forraje: estado de desarrollo de alfalfas con distinto grado de reposo. Editorial Universitaria de Villa María. 77 p.
- R CORE TEAM. 2016. R: A language and environment for statistical computing: version 3.3.0. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- RADOSTITS, O. M.; CLIVE, G.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. 2006. Veterinary medicine. Elsevier (10 ed). 2156 p. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- RAISBECK, M. F. 2000. Selenosis. veterinary clinics of North America: Food Animal Practice. 16(3): 465–480.
- RAPTIS, S. E.; KAISER, G.; TÖLG, G. 1983. A survey of selenium in the environment and a critical review of its determination at trace levels. Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie. 316(2): 105-123.
- REYES, M.; CEREZO, M. J. 2009. Consideraciones sobre la evaluación de la incertidumbre. V Iberolab: 1-3 p.
- RICCIARDINO, M. Z. 1993. Actualización en funciones bioquímicas de cobre, selenio y cinc en rumiantes. [en línea]. Sitio Argentino de Producción Animal. <http://www.produccion-animal.com.ar/suplementacion_mineral/35-%20bioquimica_cobre_selenio_zinc.pdf> [consulta:26/10/18].
- RODRIGUEZ, A. M.; SCHILD, C. O.; CANTÓN, G. J.; RIET-CORREA, F.; ARMENDANO, J. I.; CAFFARENA, R. D.; BRAMBILLA, E. C.; GARCÍA, J. A.; MORREL, L. E.; POPPENGA, R.; GIANNITTI, F. 2018. White muscle disease in three selenium deficient beef and dairy calves in Argentina and Uruguay. Ciência Rural, 48(5). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20170733>
- ROSALES, R. B.; PINZÓN, S. S. 2005. Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 6(1): 69-82.
- ROSENFELD, I.; BEATH, O. 1964. Selenium: geobotany, biochemistry, toxicity and nutrition. Academic Press, New York. 411 p.

- RUGGIERI, F.; ALIMONTI, A.; BOCCA, B. 2016. Full validation and accreditation of a method to support human biomonitoring studies for trace and ultratrace elements. *Trends in Analytical Chemistry*. 80: 471–485. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.023>.
- SÁNCHEZ, A. 2009. Selenio y tiroides. *Glándulas Tiroides y Paratiroides* 18(1): 40-45.
- SCHWARZ, K.; FOLTZ, C. M. 1957. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society*. 79(12), 3292-3293.
- SERRA, S. D.; SERRA, A. B.; ICHINOHE, T.; FUJIHARA, T. 1997. Ruminal solubility of trace elements from selected Philippine forages. *Asian Journal of Animal Sciences*. 10: 378-384.
- SERRA, A. B.; NAKAMURA, K.; MATSUI, T.; HARUMOTO, T.; FUJIHARA, T. 1994. Inorganic selenium for sheep I. Selenium balance and selenium levels in the different ruminal fluid fractions. *Asian Journal of Animal Science* 7: 83-89.
- SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I. J.; SKELLY, J. P.; YACOBI, A.; PITTMAN, K. A. 1992. Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 81(3): 309-312.
- SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; FINDLAY, J. W.; HILL, H. M.; HULSE, J. D.; MCGILVERAY, I. J.; TONELLI, A. 2000. Bioanalytical method validation-a revisit with a decade of progress. *Pharmaceutical Research*. 17(12): 1551-1557.
- SHAMBERGER, R. J. 1983. *Biochemistry of selenium*. Plenum Press, New York, USA. 334 p.
- SILVA, J. H.; QUIROGA, M. A.; AUZA, N. J. 2000. Selenio en el rumiante. *Relaciones suelo, planta, animal. Medicina Veterinaria*. 17 (10): 229-246.
- SMITH, K. L.; HARRISON, J.; HANCOCK, D.; TODHUNTER, D.; CONRAD, H. 1984. Effect of vitamin E and selenium supplementation on Incidence of clinical

- mastitis and duration of clinical symptoms. *Journal of Dairy Science*. 67(6): 1293-1300. doi:10.3168/jds.S0022-0302 (84)81436-8.
- SMITH, K. L.; HOGAN, J. S.; WEISS, W. P.; SMITH, K. L. 1997. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *Journal of Animal Science*, 75(6): 1659-1665.
- SMRKOLJ, P.; STIBILJ, V. 2004. Determination of selenium in vegetables by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 512(1): 11-17.
- SPEARS, J. W. 2003. Trace mineral bioavailability in ruminants. *Journal of Nutrition*. 133(5): 1506-1509.
- SURAI, P. F.; TAYLOR-PICKARD, J. A. 2008. Current advances in selenium research and applications (Vol. 1). Wageningen Academic Publishers. 351 p. doi: 10.3920/978-90-8686-642-7
- SURAI, P. F. 2006. Selenium in nutrition and health. Nottingham University Press, United Kingdom. 974 p.
- SUTTLE, N.F. 2010. Mineral nutrition of livestock. in: selenium. 4th. ed. CAB International pp. 377-425.
- TERRY, N.; ZAYED, A. M.; DE SOUZA, M. P.; TARUS, A. S. 2000. Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*: 401-432.
- TINGGI, U.; REILLY, C.; PATTERSON, C. M. 1992. Determination of selenium in foodstuffs using spectrofluorometry and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*. 5(4): 269-280.
- TYSON, J. F.; HELEN, A. B. 1991. Elimination of copper interference by continuous flow matrix isolation in the determination of selenium by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 6(2): 133-138.
- UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. 2003. Los minerales en la nutrición del Ganado. En su: Selenio. 3a.ed. Acribia: Zaragoza, España. pp. 429-484.

- UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). 2009. Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens. United Nations: New York. 67 p.
- VAN METRE, D. C.; CALLAN, R. J. 2001. Selenium and vitamin E. *veterinary clinics of North America: Food Animal Practice*. 17(2): 373-402.
- VAN SOEST, P.J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2nd.ed. Cornell University Press Ithaca 476 p.
- WEISS, W. P.; HOGAN, J. S.; TODHUNTER, D. A.; SMITH, K. L. 1997. Effect of vitamin E supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 80(8): 1728–1737. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)76105-8.
- WELZ, B.; MELCHER, M. 1985. Decomposition of marine biological tissues for determination of arsenic, selenium, and mercury using hydride-generation and cold-vapor atomic absorption spectrometries. *Analytical Chemistry*. 57(2): 427-431.

Apéndice I. Datos de la performance metodológica

Tabla 20. Cálculo del límite de detección de fluido ruminal y forraje.

	Fecha				
	29/01/2015	06/02/2015	15/07/2015	16/07/2015	
Señal blanco 1	0,000	0,000	0,000	0	
Señal blanco 2	0,000	0,000	0,000	0	
Señal blanco 3	0,001	0,000	0,001	0	
Señal blanco 4	0,000	0,000	0,000	0,0005	
Señal blanco 5	0,000	0,000	0,000	0	
Señal blanco 6	0,001	0,000	0,001	0	
Señal blanco 7	0,000	0,000	0,000	0	
Señal blanco 8	0,000	0,001	0,000	0	
Señal blanco 9	0,000	0,000	0,000	0	
Señal blanco 10	0,000	0,000	0,000	0	
Promedio Señal	0,00010	0,00010	0,0002	0,0001	
LOD (señal)	0,0010	0,0010	0,00171049	0,000524342	Promedio
LOD (ppb) FR	0,2950	0,0419	0,26903037	0,176663238	0,1956844
LOD (ppb) forrajes	2,9506	0,4197	2,69030367	1,766632385	1,956844005

Rango aplicable

FR

LInf=0,195 ppb

LSup= 5 ppb x 12,5 = 62,5 ppb

Forraje

LInf= 1,95 ppb

LSup= 5 ppb x 125 = 625 ppb

Tabla 21. Cálculo del Sesgo % en fluido ruminal.

Concentración teórica de Se (ppb)	Concentración leída	Sesgo%	Sesgo% promedio
10	10,4867	4,8679	9,20
10	11,1341	11,3412	
10	13,0761	30,7612	
10	10,4867	4,8679	
10	10,4867	4,8679	
10	10,2505	2,5056	
10	10,8200	8,2004	
10	10,2505	2,5056	
10	10,8200	8,2004	
10	11,3895	13,8952	
25	27,3174	9,2698	10,22
25	28,6121	14,4484	
25	29,2594	17,0378	
25	23,4334	-6,2661	
25	27,9647	11,8591	
25	26,7653	7,0615	
25	27,9043	11,6173	
25	27,3348	9,3394	
25	29,0432	16,1731	
25	27,9043	11,6173	
50	47,3847	5,2304	4,34
50	45,4427	9,1144	
50	53,2107	6,4215	
50	53,2107	6,4215	
50	46,7374	-6,5251	
50	54,1002	8,2004	
50	54,1002	8,2004	
50	52,9612	5,9225	
50	48,9749	-2,0501	
50	51,2528	2,5056	

Tabla 22. Cálculo del Sesgo % en forrajes.

Concentración teórica de Se (ppb)	Concentración leída	%Sesgo	%Sesgo promedio
100	99,3	-0,6769	3,4
100	117,9	17,8633	
100	98,9	-1,1421	
100	130,4	30,4243	
100	99,1	-0,9409	
100	90,1	-9,9191	
100	88,2	-11,7736	
50	49,7	-0,6839	-11,6
50	31,7	-36,6034	
50	38,7	-22,6514	
50	52,0	3,9600	
50	49,0	-1,9346	
50	46,0	-8,0716	
50	42,4	-15,1470	

Precisión

Tabla 23. Cálculo de precisión por repetibilidad en fluido ruminal.

Fracción	LR3	LR3	LR3
1	3,118	4,106	3,81
2	3,586	3,489	4,297
3	3,284	3,246	3,916
4	3,480	3,500	3,41
5	3,158	3,271	3,298
Promedio	3,325	3,522	3,746
Desvest.	0,203	0,347	0,403
n	5	5	5
CV %	6,100	9,853	10,762
Promedio total ponderado	7,4		

Precisión intermedia

Tabla 24. Cálculo de precisión por precisión intermedia en fluido ruminal.

FR					
Fracción	Día 1 (ppb)	Día 2 (ppb)	Día 3 (ppb)	Total	
1	3,118	4,106	3,810	n días	3
2	3,586	3,489	4,297	Promedio	3,53
3	3,284	3,246	3,916	n	15
4	3,480	3,500	3,410	Desvió Estándar	0,35
5	3,158	3,271	3,298	CV%	10,0

Tabla 25. Cálculo de precisión por precisión intermedia en forraje..

Forraje	
Fecha	Concentración (ppb)
Día 1	27,78
Día 2	26,70
Día 2	26,83
Día 3	24,94
Día 3	19,47
Día 4	20,04
Día 5	27,98
Día 5	22,76
Día 6	20,60
Día 6	25,86
Día 7	20,57
Día 8	20,35
Día 9	25,91
n días	9
Promedio	23,83
n	13
Desvió Estándar	3,26
CV%	13,68

Recuperación

Tabla 26. Cálculo de recuperación % en fluido ruminal.

Selenio agregado (ppb)	Selenio en la muestra	Selenio en la muestra + agregado	Recuperación %	Recuperación % promedio
10	3,755	14,241	104,87	109,20
10	3,755	14,889	111,34	
10	3,755	16,831	130,76	
10	3,755	14,241	104,87	
10	3,755	14,241	104,87	
10	0,569	10,820	102,51	
10	0,569	11,390	108,20	
10	0,569	10,820	102,51	
10	0,569	11,390	108,20	
10	0,569	11,959	113,90	
25	3,338	20,031	66,77	96,66
25	3,338	25,424	88,34	
25	3,338	23,883	82,18	
25	3,338	24,653	85,26	
25	3,338	25,424	88,34	
25	3,338	25,424	88,34	
25	3,544	24,653	84,44	
25	3,544	26,194	90,60	
25	3,544	23,883	81,36	
25	3,544	23,883	81,36	
25	3,544	25,424	87,52	
25	3,544	28,505	99,85	
25	3,755	31,072	109,27	
25	3,755	32,367	114,45	
25	3,755	33,014	117,04	
25	3,755	27,188	93,73	
25	3,755	31,719	111,86	
25	0,569	27,335	107,06	
25	0,569	28,474	111,62	
25	0,569	27,904	109,34	
25	0,569	29,613	116,17	
25	0,569	28,474	111,62	
50	3,338	49,307	91,94	96,79
50	3,338	49,307	91,94	

50	3,338	48,536	90,40
50	3,338	43,143	79,61
50	3,338	51,618	96,56
50	3,338	49,307	91,94
50	3,544	46,225	85,36
50	3,544	52,388	97,69
50	3,544	50,847	94,61
50	3,544	54,700	102,31
50	3,544	48,536	89,98
50	3,544	54,700	102,31
50	3,755	51,139	94,77
50	3,755	49,197	90,89
50	3,755	56,965	106,42
50	3,755	56,965	106,42
50	3,755	50,492	93,47
50	0,569	54,670	108,20
50	0,569	54,670	108,20
50	0,569	53,531	105,92
50	0,569	49,544	97,95
50	0,569	51,822	102,51

Forraje

Tabla 27. Cálculo de recuperación % en forraje.

Fecha	Se. agregado (ppb)	Se muestra (ppb)	Se muestra + st	Recuperación	Promedio
21/01/2015	100	27,78	127,10	99,32	95,11
29/01/2015	100	26,70	144,56	117,86	
29/01/2015	100	26,83	125,69	98,86	
06/02/2015	100	24,94	155,36	130,42	
06/02/2015	100	19,47	118,53	99,06	
26/02/2015	100	20,04	110,12	90,08	
16/03/2015	100	27,98	116,21	88,23	
16/03/2015	50	22,76	72,42	99,32	
27/03/2015	50	20,60	52,30	63,40	
27/03/2015	50	25,86	64,54	77,35	
08/05/2015	50	15,07	67,05	103,96	
08/05/2015	50	20,57	69,60	98,07	
02/07/2015	50	20,35	66,31	91,93	
11/08/2015	50	25,91	68,34	84,85	