

## Contagem de células somáticas no leite de vacas suplementadas com selênio e vitamina E

Juliana Jorge PASCHOAL<sup>1</sup>  
 Marcus Antonio ZANETTI<sup>2</sup>  
 José Aparecido CUNHA<sup>2</sup>

1 – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP  
 2 – Departamento de Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP

**Correspondência para:**  
 JULIANA JORGE PASCHOAL  
 Departamento de Zootecnia  
 Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos  
 Universidade de São Paulo  
 Avenida Duque de Caxias Norte, 225  
 13635-900 – Pirassununga - SP

Recebido para publicação: 28/02/2005  
 Aprovado para publicação: 23/08/2005

### Resumo

O selênio e a vitamina E são antioxidantes importantes na defesa de células e tecidos e atuam diretamente na manutenção da saúde do úbere, influenciando a contagem de células somáticas, indicador da mastite. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do selênio e da vitamina E sobre a contagem de células somáticas no leite de vacas da raça holandesa, durante o período das águas. Oitenta animais foram distribuídos em quatro tratamentos: controle; suplementação com 2,5 mg Se/dia; suplementação com 1000 UI vit. E/dia e suplementação com 2,5 mg Se + 1000 UI vit. E/dia. A suplementação foi iniciada 30 dias antes da provável data de parição, prolongando-se até o parto. Amostras do volumoso e do concentrado foram colhidas, quinzenalmente, para análise bromatológica completa e levantamento dos níveis de selênio. O sangue foi colhido antes do início da suplementação, no parto, 30 e 60 dias após o parto, para determinação dos níveis de Se no soro sanguíneo das vacas. O leite foi colhido semanalmente, para determinação da contagem de células somáticas (CCS). O período de colheita iniciou-se logo após o período colostrado, prolongando-se até a décima segunda semana de lactação. Um mês após a suplementação, as vacas que receberam selênio apresentaram níveis séricos superiores ( $P < 0,05$ ) ao grupo controle. O selênio e a vitamina E não afetaram ( $P > 0,05$ ) a CCS nas doze primeiras semanas de lactação e não foi encontrado efeito de interação entre os dois elementos.

**Palavras-chave:**  
 Antioxidantes.  
 Mastite subclínica.  
 Pré-parto.  
 Qualidade do leite.

### Introdução

Os efeitos favoráveis do selênio (Se) e da vitamina E (vit. E) nos mecanismos de defesa da glândula mamária vêm sendo estudados nos últimos anos e um problema de fundamental importância diz respeito à influência do Se e da vit. E sobre a incidência de mastite, principal afecção dos animais destinados à produção leiteira<sup>1</sup>. No Brasil, a sua incidência é alta, acometendo 71% das vacas em rebanhos de Minas Gerais e São Paulo<sup>2,3</sup>.

O primeiro estudo sobre o efeito do Se e da vit. E na incidência de mastite clínica foi realizado por Smith et al.<sup>4</sup>. Os autores verificaram diminuição de 37% na incidência

de mastite clínica em vacas que receberam suplementação de 740 UI de vitamina E por dia, durante o período seco.

Segundo Maus et al.<sup>5</sup> a suplementação com Se em níveis crescentes (ideal até 5 mg/dia) aumentou a concentração de Se no sangue e diminuiu a incidência de mastite clínica e CCS. Do mesmo modo, a suplementação com vit. E em níveis crescentes, aumentou a concentração de alfa tocoferol no sangue (mais significativo em vacas secas) e diminuiu a incidência de mastite clínica<sup>6</sup>.

Weiss et al.<sup>7</sup>, utilizando 2.000 UI de vit. E/ dia (pré-parto) diminuiu a incidência de mastite clínica de 25% para 2,6%. Valle<sup>8</sup> suplementou vacas no pré e pós-parto com

níveis de vitamina E variando de 1000 a 3000 UI / dia e constatou maior incidência de mastite clínica no grupo-controle. Por outro lado, LeBLANC et al.<sup>9</sup> não encontraram efeito da vitamina E sobre a incidência de mastite clínica em vacas injetadas com dose única de 3000 UI, uma semana antes do parto.

Alguns trabalhos foram feitos no Brasil com objetivo semelhante. Zanetti et al.<sup>10</sup> observaram que a suplementação oral com 5 mg de Se no último mês de gestação, aumentou significativamente o nível sérico do mineral nas vacas leiteiras, reduzindo a incidência de mastite subclínica diagnosticada por intermédio do teste CMT. Da mesma maneira, Paschoal, Zanetti e Cunha<sup>11</sup> concluíram que a suplementação diária com 5 mg de selênio e 1000 UI de vitamina E, iniciada 30 dias antes do parto, diminuiu em 38% e 53%, respectivamente, a incidência de mastite clínica nas primeiras 12 semanas de lactação. Os mesmos autores encontraram ainda efeito positivo do selênio ( $P < 0,05$ ) sobre a contagem de células somáticas, porém, não encontraram efeito da vitamina E sobre esta variável<sup>12</sup>. Segundo Costa et al.<sup>13</sup>, não houve diferença significativa entre o tratamento com Se (0,1 mg/kg MS) e o grupo-controle (sem suplementação) quanto à incidência de mastite clínica (diagnosticada pela prova de Tamis). Da mesma maneira, Malbe et al.<sup>14</sup> não encontraram efeito positivo do selênio sobre a incidência de mastite clínica quando suplementaram animais com 0,2 ppm Se / dia.

A deficiência de selênio foi constatada em várias regiões do Estado de São Paulo por meio do levantamento dos níveis de Se nas forragens e nos concentrados<sup>15</sup>, assim como, no soro sanguíneo de vacas leiteiras<sup>16</sup>. Os volumosos conservados apresentam baixas concentrações de vitamina E<sup>17</sup> e são amplamente utilizados na alimentação de rebanhos leiteiros. Sabe-se que durante o período pré-parto o consumo de matéria seca diminui, diminuindo, também, o consumo de vitamina E e selênio<sup>18</sup>.

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da suplementação de selênio e de vitamina E, no pré-parto, sobre a contagem de células somáticas no leite de vacas da raça Holandesa.

## Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido no município de Descalvado, SP. Oitenta vacas da raça Holandesa, de segunda à quinta lactação, foram pré-selecionadas durante o período seco, de acordo com a data prevista de parição, variando de 02/02/2001 a 23/03/2001. Todos os animais selecionados foram tratados com antibiótico intramamário específico para vacas secas, no momento da secagem.

As unidades experimentais foram sorteadas em quatro tratamentos, levando-se em consideração a ordem de parição e a contagem inicial de células somáticas: 2,5 mg de selênio na forma de selenito de sódio, 1.000 UI de vitamina E na forma de acetato de alfa tocoferol, 2,5 mg Se + 1.000 UI de vit.E e o controle

A suplementação foi efetuada com selenito de sódio (P.A. MERCK), diluído em fubá de milho, de modo que cada kg do suplemento continha 500 mg de selênio. O acetato de alfa tocoferol (BASF - Lutavit E 50 %) também foi diluído em fubá de milho e a dose diária individual dos dois elementos foi pesada e armazenada em saquinhos de papel (13,5 cm x 7,0 cm) os quais foram colocados diariamente dentro da boca de cada animal. A suplementação iniciou-se 30 dias antes da provável data de parição, prolongando-se até a data do parto.

As vacas secas receberam silagem de milho (22 kg na matéria natural/vaca/dia), silagem de capim napier (5 kg na matéria natural/vaca/dia) e concentrado formulado e misturado na própria fazenda (4 kg na matéria natural/vaca/dia). Todos os ingredientes foram pesados em um vagão misturador e fornecidos aos animais pela manhã.

Amostras do volumoso e do concentrado fornecidas às vacas secas foram

colhidas quinzenalmente, diretamente do cocho, secas em estufa a 65°C, moídas e reservadas para posterior análise. Vinte por cento de cada amostra foram selecionados para a formação de um “pool” o qual foi submetido às análises de MS, PB, EE, MM, Ca, P de acordo com AOAC<sup>19</sup>, FDN<sup>20</sup> e selênio<sup>21</sup>.

Foram realizadas 4 colheitas de sangue, em cada vaca, para análise do selênio (antes da suplementação, no dia do parto, 30 e 60 dias após o parto). As amostras de sangue, para análise do selênio, foram colhidas da veia mamária em tubos com vácuo, transportadas ao laboratório e centrifugadas por 4 minutos. O soro foi pipetado, acondicionado em *ependorfs* de plástico e congelado a -20°C. As análises laboratoriais para determinação do selênio foram realizadas após a digestão úmida com ácido perclórico 70% e, posterior leitura fluorimétrica, seguindo-se a sensibilização por diamino-naftaleno<sup>21</sup>.

As colheitas de leite para levantamento da CCS foram realizadas semanalmente, logo após o período colostrado (total de 12 semanas de coleta), durante a ordenha da tarde. Os tubos plásticos, com capacidade de 60 mL, contendo 2 pastilhas do conservante dicromato de potássio, foram utilizados para colheita do leite. As amostras foram previamente identificadas, acondicionadas em caixas especiais para transporte e levadas rapidamente ao laboratório. A CCS foi realizada por espectroscopia eletrônica (BENTLEY® 300).

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados (DBC), onde os blocos

foram elaborados de acordo com a ordem de parição dos animais e a contagem de células somáticas inicial foi usada como covariável.

Os níveis de selênio no soro foram comparados em cada tempo de colheita utilizando PROC GLM do SAS<sup>22</sup>.

Por não seguirem uma distribuição normal, os valores de contagem de células somáticas (CCS) foram transformados em log<sub>e</sub>, desta forma reportados. Os dados foram analisados usando PROC MIXED do SAS<sup>22</sup>.

## Resultados e Discussão

O teor médio do selênio na dieta basal durante o período experimental foi de 0,47 mg/kg MS (0,47 ppm), valor superior ao que foi encontrado nas fazendas do Estado de São Paulo na década de oitenta<sup>15</sup> e no Estado de Ohio, EUA<sup>6</sup>. Atualmente, estão sendo utilizados níveis superiores de selênio, sendo o sal mineral a principal via de fornecimento. Os animais deste experimento, suplementados com 2,5 mg de selênio/dia, passaram a consumir 8,1 mg de selênio diário ou 0,8 ppm, valores similares aos testados por Maus et al.<sup>5</sup> e Weiss et al.<sup>6</sup>.

Os níveis séricos do selênio no período precedente à suplementação, no parto, 30 e 60 dias após o parto estão apresentados na tabela 1.

Pelos resultados, observou-se que antes do início dos tratamentos, os níveis séricos do selênio foram semelhantes (0,057; 0,056 e 0,054 µg/mL para os tratamentos Controle, Selênio e Selênio+vit.E,

Tabela 1 - Níveis de selênio (µg/ml) no soro de vacas holandesas nos períodos: antes do parto, no parto, 30 e 60 dias pós-parto

| Tratamento           | Antes do parto     | Parto              | 30 dias pós-parto  | 60 dias pós-parto  |
|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Controle             | 0,057 <sup>a</sup> | 0,069 <sup>b</sup> | 0,079 <sup>a</sup> | 0,085 <sup>a</sup> |
| Selênio              | 0,056 <sup>a</sup> | 0,082 <sup>a</sup> | 0,088 <sup>a</sup> | 0,088 <sup>a</sup> |
| Se + vitE            | 0,054 <sup>a</sup> | 0,085 <sup>a</sup> | 0,091 <sup>a</sup> | 0,085 <sup>a</sup> |
| E.P.M <sup>(1)</sup> | 0,0026             | 0,0021             | 0,0034             | 0,0023             |

Médias seguidas de letras diferentes na coluna, diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05)

<sup>(1)</sup> Erro padrão da média

respectivamente), valores superiores àqueles encontrados por Zanetti, Lucci e Meirelles<sup>16</sup>, fato explicado pela maior concentração de selênio encontrada na dieta basal. Estes níveis denotam insuficiência do mineral, uma vez que o valor recomendável para o aumento da resistência da glândula mamária é de 0,080 µg/mL<sup>6</sup>. No momento do parto, ou seja, um mês após a suplementação, vacas que receberam selênio ou selênio associado à vitamina E apresentaram níveis séricos superiores ( $P < 0,05$ ) ao grupo Controle (0,082; 0,085; 0,069 µg/mL, respectivamente), alcançando os níveis recomendados, o que mostrou ser suficiente o período de suplementação utilizado. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Zanetti et al.<sup>18</sup>, os quais encontraram aumento significativo nos níveis séricos do selênio após 30 dias de suplementação com o mineral. De acordo com Maus et al.<sup>5</sup>, a suplementação com seis mg selênio/dia conseguiu manter a concentração sérica do selênio em níveis adequados e semelhantes

aos obtidos neste trabalho.

Trinta dias após o parto, os níveis séricos do selênio se igualaram. Tal fato pode ser explicado pelo término da suplementação e pela alteração da dieta de todos os animais, pois, estando em produção, todos os grupos passaram a receber maior quantidade de concentrado por dia, e, conseqüentemente, maior quantidade de selênio.

Por não seguirem uma distribuição normal, os resultados relativos à contagem de células somáticas (CCS) nas doze primeiras semanas de lactação, foram transformados em  $\log_e$  (Tabela 2).

Não foi encontrado efeito do selênio e da vitamina E sobre a CCS nas primeiras doze semanas de lactação e não houve interação significativa entre os dois elementos.

De acordo com Paschoal, Zanetti e Cunha<sup>11</sup>, a suplementação com nível de selênio superior ao utilizado neste trabalho (5mg Se/dia) diminuiu a CCS nas oito primeiras semanas de lactação; os autores não encontraram efeito da vitamina E sobre esta

Tabela 2 - CCS ( $\log_e$ ) no leite de vacas suplementadas com selênio e vitamina E, até a décima segunda semana de lactação

|             | Semanas  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | Média |
|-------------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
|             | 1        | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |       |
| Controle    | 6,43     | 6,78 | 5,81 | 6,99 | 6,19 | 6,39 | 5,94 | 5,95 | 6,17 | 6,66 | 6,97 | 6,84 | 6,43  |
| Se          | 5,75     | 5,64 | 6,11 | 5,75 | 5,71 | 6,12 | 6,00 | 5,54 | 6,50 | 5,96 | 6,19 | 5,92 | 5,93  |
| vit.E       | 5,50     | 6,16 | 6,96 | 6,59 | 6,48 | 6,93 | 6,89 | 7,14 | 6,25 | 6,62 | 7,17 | 7,53 | 6,69  |
| Se + vit. E | 5,78     | 6,54 | 6,21 | 6,48 | 5,60 | 6,25 | 6,51 | 6,34 | 6,13 | 6,83 | 6,66 | 6,42 | 6,31  |
| E.P.M.      | 0,56     | 0,69 | 0,54 | 0,56 | 0,51 | 0,52 | 0,54 | 0,53 | 0,45 | 0,49 | 0,51 | 0,78 | -     |
| Sem Se      | 6,09     | 6,64 | 6,52 | 6,13 | 6,06 | 6,50 | 6,44 | 6,30 | 6,38 | 6,27 | 6,64 | 6,67 | 6,39  |
| Com Se      | 5,63     | 5,90 | 6,01 | 6,74 | 5,90 | 6,32 | 6,22 | 6,15 | 6,15 | 6,74 | 6,78 | 6,58 | 6,26  |
| Sem vit.E   | 6,08     | 6,19 | 6,58 | 6,50 | 6,00 | 6,56 | 6,69 | 6,71 | 6,20 | 6,71 | 6,88 | 6,92 | 6,50  |
| Com vit.E   | 5,64     | 6,35 | 5,96 | 6,37 | 5,95 | 6,25 | 5,97 | 5,75 | 6,34 | 6,31 | 6,54 | 6,32 | 6,15  |
| Média       | 5,86     | 6,27 | 6,27 | 6,43 | 5,98 | 6,41 | 6,33 | 6,23 | 6,27 | 6,51 | 6,71 | 6,62 | 6,32  |
|             | <i>P</i> |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |
| Se          | NS       | NS   | NS   | NS   | NS   | NS   | NS   | NS   | NS   | NS   | NS   | NS   | 0,88  |
| vit.E       | NS       | NS   | NS   | NS   | NS   | NS   | NS   | NS   | NS   | NS   | NS   | NS   | 0,56  |
| Interação   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0,46  |

E. P. M. - Erro padrão da média  
NS - não significativo ( $P > 0,05$ )

variável, concordando com os resultados obtidos no presente estudo. COSTA et al.<sup>13</sup> não obtiveram resultados positivos com a suplementação de selênio quando utilizaram baixo teor suplementar.

Weiss et al.<sup>6</sup> não encontraram correlação entre níveis de vitamina E no sangue e a CCS ( $P < 0,25$ ). Do mesmo modo, Zanetti et al.<sup>9</sup> não encontraram diminuição da mastite subclínica diagnosticada através do teste CMT em vacas recebendo vitamina E, porém, encontraram efeito positivo do selênio após suplementação com 5mg/dia. Valle<sup>8</sup> não encontrou efeito da vitamina E sobre a incidência de mastite subclínica, concordando com os resultados apresentados. Weiss et al.<sup>7</sup> encontraram resultados benéficos da vitamina

E sobre a incidência de mastite quando utilizaram níveis mais altos de suplementação (2000 UI vitE/dia).

## Conclusões

A suplementação com selênio e vitamina E realizada no pré-parto não afetou a contagem de células somáticas do leite possivelmente devido aos baixos níveis utilizados. Os resultados desta pesquisa evidenciam a necessidade de realização de outros estudos relacionados aos níveis suplementares e formas de administração, para melhor avaliar os efeitos da suplementação de minerais e vitaminas na prevenção e controle da mastite.

## Milk somatic cell count of selenium and vitamin E supplemented cows

### Abstract

Selenium and vitamin E are important antioxidants for cells and tissues protection acting directly as a support for the udder health. This experiment was designed to evaluate the influence of prepartum selenium and vitamin E supplementation on milk somatic cell counts of Holstein cows during summer period. Eighty animals were allocated into four treatments: control; supplementation with 2.5 mg Se/day; supplementation with 1000 IU vitamin E/day and supplementation with 2.5 mg Se/day + 1000 IU vitamin E/day. The supplementation started thirty days prior to probable parturition date until parturition. Forage and concentrate samples were taken every fifteen days for chemical and selenium analyses. Blood samples were taken before starting supplementation, right after parturition, thirty and sixty days after it to determine the selenium serum levels. Milk samples were taken to determine SCC. Selenium supplemented cows had higher serum selenium concentration compared with control group ( $P < 0.05$ ). The selenium and vitamin E do not decrease ( $P > 0.05$ ) SCC up to 12<sup>th</sup> week of lactation.

### Key-words:

Antioxidants.  
Milk quality.  
Prepartum.  
Subclinical mastitis.

### Referências

- 1 LANGONI, H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas. **Revista Educação Continuada CRMV-SP**, v. 3, p. 57-64, 2000.
- 2 COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R. ; WATANABE, E. T.; WHITE, C. R. e PARDO, R. B. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 17, p. 215-217, 1995.

- 3 COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. ; SILVA, J. A. B.; GARINO, J. R. F.; BENITES, N. R.; HORIUTI, A. M. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Revista Napgama**, v. 2, p. 16-20, 1999.

- 4 SMITH, K.L.; et al. Effect of Vitamin E and Selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 1293-1300, 1984.

- 5 MAUS, R.F.; et al. Relationship of diet selenium to selenium in plasma and milk from dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 533-537, 1980.

- 6 WEISS, W.P.; HOGAN, J.S.; SMITH, K.L. ; HOBLET, K.H. Relationship among selenium, vitamin E and mammary gland health in commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science*, v.73, p.381-390, 1990.
- 7 WEISS, W.P.; et al. Effect of vitamin E supplementation in diets with a low concentration of Selenium on mammary gland health of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 1728-1737, 1997.
- 8 VALLE, C.R. **Influência da suplementação de vitamina E nos períodos pré e pós parto na ocorrência de mastite clínica.** 2000. 76 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2000.
- 9 LEBLANC, S.J.; et al. The effect of prepartum injection of vitamin E on health in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, p. 1416-1426, 2002.
- 10 ZANETTI, M. A.; et al. Efeito da suplementação de Selênio e Vitamina E em bovinos leiteiros. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 27, p. 405-408, 1998.
- 11 PASCHOAL, J. J.; ZANETTI, M. A., CUNHA, J. A. Efeito da suplementação de selênio e vitamina E sobre a incidência de mastite clínica em vacas da raça holandesa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, p. 249-255, 2003.
- 12 PASCHOAL, J. J.; ZANETTI, M. A., CUNHA, J. A. Suplementação de selênio e vitamina E sobre a contagem de células somáticas do leite de vacas da raça holandesa. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, n. 6, p. 2032-2039, dez. 2003. Suplemento 2..
- 13 COSTA, E. O.; et al. Influência da suplementação de selênio na incidência de mastite. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 19, p. 169-172, 1997.
- 14 MALBE, M.; et al. Effects of oral selenium supplementation on mastitis markers and pathogens in Estonian cows. *Veterinary Theriogenology*, p. 145-154, 2003.
- 15 LUCCI, C. S.; MOXON, A. L.; ZANETTI, M. A. ; FUKUSHIMA, R. S.; SCHALCH, E.; PETTINATTI, R. F. Selênio em bovinos leiteiros do estado de São Paulo. I. Níveis de Selênio em soros sanguíneos. *Revista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, v. 21, p. 65-70, 1984.
- 16 ZANETTI, M. A.; LUCCI, C. S.; MEIRELLES, G. J. R. Selênio em bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. V. Suplementação de Selênio para vacas em fase final de gestação. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, v. 21, p. 141-145, 1984.
- 17 THAFVELIN, B.; OKSANEN, H.E. Vitamin E and linolenic acid content of hays as related to different drying conditions. *Journal of Dairy Science*, v. 49, p. 282-286, 1996.
- 18 MILLER, G. Y.; BARTLETT, P. C.; ERSKINE, R. J.; SMITH, K. L. ; SMITH, K. L. Factors affecting serum selenium and vitamin E concentrations in dairy cows. *JAVMA*, v. 206, n. 09, p. 1369-1373, 1995.
- 19 ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis.** 12. ed. Washington, D.C.: 1975. 1094 p.
- 20 GOERING, G. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications).** n. 379, Washington DC., 1970. (Agriculture Handbook/ United States Department of Agriculture; n. 379),
- 21 OLSON, O. E.; PALMER, L. S.; CARY, E. L. Modification of the official Fluorimetric method for selenium in plants. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, v. 58, p. 117-121, 1975.
- 22 STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS user's guide:** statistics. Version 5. Cary, NC : SAS Institute Inc, 1982.