



UFSM

Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO E-1,1-METILTIO-
SELENOFENIL-2-PIRROLIDINONA-HEPTENO: UM
COMPOSTO ORGÂNICO DE SELÊNIO COM BAIXA
TOXICIDADE**

Rafael Porto Ineu

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO E-1,1-METILTIO-
SELENOFENIL-2-PIRROLIDINONA-HEPTENO: UM
COMPOSTO ORGÂNICO DE SELÊNIO COM BAIXA
TOXICIDADE**

por

Rafael Porto Ineu

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em
Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa
Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do
grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

Santa Maria, RS, Brasil

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

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

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO E-1,1-METILTIO-SELENOFENIL-2-
PIRROLIDINONA-HEPTENO: UM COMPOSTO ORGÂNICO DE
SELÊNIO COM BAIXA TOXICIDADE**

elaborada por

Rafael Porto Ineu

como requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO ORGANIZADORA

Gilson Zeni
(Presidente/Orientador)
(UFSM)

Oscar Endrigo Rodrigues
(Unifra)

Vanderlei Folmer
(Unipampa)

Santa Maria, 20 de Abril de 2007

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a um “Ser Superior” pela vida e saúde concedida.

Agradeço aos meus pais Édison e Lia e a minha irmã Raquel, pelo exemplo de força, amor, bondade e por sempre me incentivarem na busca por mais conhecimentos. Obrigado.

Agradeço a Priscila pelo amor e carinho.

Aos meus orientadores Prof. Gilson Zeni e Prof. João Batista Teixeira da Rocha, pela orientação e ensinamentos transmitidos, e principalmente pela amizade e confiança. Além de minha sincera gratidão, admiro-os por seu caráter e por sempre estarem dispostos a buscar novos conhecimentos. Muito obrigado.

A Prof^ª. Cristina Wayne Nogueira pelo seus conhecimentos, amizade e pela atenção e dedicação prestada sempre que eu precisei. Muito obrigado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, que de alguma maneira ou outra contribuíram para a minha formação científica.

A turma do Laboratório da Prof^ª. Cristina e do Prof. Gilson pela colaboração e amizade. Muito obrigado.

Ao pessoal do Laboratório do Prof. Félix pelo companheirismo e amizade.

A gurizada do Laboratório do Prof. Braga; Amarelo, Negão, Eduardo, Galletto, pela amizade.

Aos colegas de laboratório; em especial aos membros da “Super Liga”: Róbson, Daniel, Matheus, Gustavo, Juliano, Alessandro, Thiago, e aos meus

colegas de laboratório Carlos, Rose, Verônica, Romaiana, Danúbia, Carol, Jéssie e demais pelo companheirismo e por terem de agüentarem as minhas chatices, mas que além de colegas, demonstraram-se grandes amigos. Agradeço-os pelo convívio e conhecimento compartilhado ao longo desse período.

Agradeço a todos os funcionários da UFSM, especialmente a Angélica e ao Rinaldo pelo cuidado com os animais.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso.

Agradeço também ao CNPq, pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que passaram pela minha vida e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO E-1,1-METILTIO-SELENOFENIL-2-PIRROLIDINONA-HEPTENO: UM COMPOSTO ORGÂNICO DE SELÊNIO COM BAIXA TOXICIDADE

AUTOR: Rafael Porto Ineu

ORIENTADOR: Gilson Zeni

Co-ORIENTADOR: João Batista Teixeira da Rocha

DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, Abril de 2007.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antioxidante do E-1,1-metiltio-selenofenil-2-pirrolidinona-hepteno (composto **1**); um composto orgânico de selênio que apresenta baixa toxicidade. Um grande número de parâmetros foram avaliados em cérebro, fígado e plasma de ratos e camundongos e foram usados como indicadores de toxicidade: níveis de TBARS e ácido ascórbico, atividade da δ -ALA-D e da catalase, e níveis de ALT, AST, uréia e creatinina. Nossos experimentos demonstraram que, *in vitro*, o composto **1** apresentou uma redução dependente da concentração na produção de TBARS e na geração de espécies reativas (RS) induzidos por Fe^{2+} /malonato quando o teste utilizado foi o da oxidação da DCFH-DA. A dose letal (LD_{50}) para o composto **1** foi calculada quando administrada pela via oral e os resultados demonstraram ser esta maior do que 500 mg/kg. Utilizando experimentos *ex vivo* medimos a toxicidade do composto **1** e os resultados demonstraram que esse composto não mudou a atividade da δ -ALA-D (delta-aminolevulinato desidratase) em 100 e 250 mg/kg e que somente apresentou uma inibição da atividade na maior dose (500mg/kg) entretanto, nessa mesma dose não houve nenhuma diferença significativa na atividade da δ -ALA-D em cérebros de camundongos. A peroxidação lipídica em tecidos hepáticos de camundongos não foi alterada comparando-a com o grupo controle contudo, em tecido cerebral todas as doses testadas apresentaram uma redução significativa nos níveis de TBARS. Os níveis de uréia diminuíram somente na maior dose, já os de creatinina aumentaram em doses média e alta. Também foram avaliados os níveis de ácido ascórbico e apresentaram aumentados somente na maior dose. No cérebro de camundongos, a atividade da catalase diminuiu significativamente em 100mg/kg. Em oposição a isso, no tecido hepático a atividade da catalase apresentou um aumento significativo em todas as doses. Com esses resultados, nós concluímos que trata-se de um composto promissor que apresenta uma grande atividade antioxidante e uma baixa toxicidade, entretanto são necessários mais estudos farmacológicos detalhados.

Palavras-chave: organoselênio, antioxidante, fluorescência, espécies reativas de oxigênio, toxicidade, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduate Course in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF (E)-1-(1-(METHYLTHIO)-1-SELENOPHENY)
HEPT-1-EN-2-YL) PYRROLIDIN-2-ONE: AN ORGANOSELENIUM COMPOUND
WITH LOW TOXICITY**

AUTHOR: Rafael Porto Ineu

ADVISOR: Gilson Zeni

CO-ADVISOR: João Batista Teixeira da Rocha

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, April 2007

The objective of this work was to evaluate the antioxidant activity of (E)-1-(1-(methylthio)-1-selenopheny) hept-1-en-2-yl) pyrrolidin-2-one: an organoselenium compound with low toxicity (compound **1**). A number of parameters were examined in brain, liver and plasma of rats and mice as indicators of toxicity, including reactive species to the thiobarbituric acid levels, ascorbic acid content, δ -aminolevulinate dehydratase and catalase activity, AST, ALT, urea and creatinine levels. Ours experiments demonstrated that *in vitro*, compound **1** showed a concentration-dependent reduction in TBARS production and in the generation of reactive species (RS) caused by Fe^{2+} /malonate when was tested by DCFH-DA oxidation. The LD_{50} for compound **1** was calculated administering by oral route and the results demonstrated higher than 500 mg/kg. We also examined the toxicity of the compound **1** in *ex vivo* experiments and the results demonstrated that it did not change hepatic δ -aminolevulinate dehydratase activity at 100 and 250 mg/kg only showed an inhibition at the highest dose (500mg/kg) of compound **1** but in this same dosage no significant differences were detected in brain of mice. Hepatic lipid peroxidation in treated mice did not differ from control values otherwise, in brain tissue, all doses showed a significant reduction in TBARS levels. One of the biochemicals parameters measured were urea and creatinine levels in plasma of treated mice treated. The urea levels showed a decrease at highest dose and creatinine to increase at middle and high doses. Ascorbic acid content, that is an endogenous antioxidant, was increased only at the highest dose of compound **1**. Catalase activity in brain of exposed mice had a tendency to decrease and showed a significant result only at 100mg/kg. In contrast with this, in hepatic tissue, the catalase activity showed a significant increased in all doses. We concluded that this is a promising compound with greater antioxidant activity and low toxicity but are necessary many detailed pharmacological studies involving this type of organoselenium compounds.

Keywords: organoselenium, antioxidant, selenium, reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** – Estrutura do Disseleneto de difenila. 3
- Figura 2** – Estrutura do E-1,1-metiltio-selenofenil-2-pirrolidinona-hepteno, composto **1**. 3
- Figura 3** - Condensação assimétrica de 2 moléculas do ALA, catalisada pela enzima δ -aminolevulinato desidratase. 15
- Artigo**
- Figura 1** – Structure of (*E*)-1-(1-(methylthio)-1-(selenopheny) hept-1-en-2-yl) pyrrolidin-2-one. 46
- Figura 2** – Structure of diphenyl diselenide. 46
- Figura 3** – In vitro effects of compound **1** on TBARS levels in rat **A)** brain; **B)** liver. *One-Way/ANOVA LSD test and [#]p<0.05 as compared to Fe and vehicle groups.* 46
- Figura 4** – In vitro effects of compound **1** on reactive species in rat **A)** brain; **B)** liver. *One-Way/ANOVA LSD test and [#]p<0.05 as compared to Fe/malonate and dmsso groups, *p<0.05 as compared to induced.* 48

- Figura 5** – Dose–response of animal’s survival. Mice received a single dose of compound **1** by oral route. 50
- Figura 6** - Effect of compound **1** at different doses on δ -ALAD activity in the brain of mice. *One-Way ANOVA/LSD test with * $p < 0.05$ vs control, # $p < 0.05$ vs 100 and 250mg/kg and + $p < 0.05$ vs 100mg/kg.* 51
- Figura 7** - Effects of compound **1** on δ -ALAD activity in the liver of mice. *One-Way ANOVA/LSD test with * $p < 0.001$ vs all groups.* 52
- Figura 8** - Effects of compound **1** on catalase enzyme activity in both, brain and liver on mice. *One-Way ANOVA/LSD test with # $p < 0.05$ vs 500 mg/kg and * $p < 0.05$ vs control.* 53
- Figura 9** - Effects of compound **1** on lipid peroxidation (TBARS) in both, brain and liver of mice. *One-Way ANOVA/LSD test with * $p < 0.01$ vs control and # $p < 0.05$ vs 500mg/kg.* 54
- Figura 10** - Effects of compound **1** on ascorbic acid content in both, brain and liver of mice. *One-Way/ANOVA LSD test with * $p < 0.006$ vs control and # $p < 0.008$ vs 500mg/kg.* 55

LISTA DE TABELAS

Artigo

Table 1 - Effects of compound 1 on biochemical parameters	36
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

δ -ALA-D - delta-aminolevulinato desidratase, porfobilinogênio sintase ou 5'-aminolevulinato hidrolase

(PhSe)₂ - disseleneto de difenila

ALA – ácido 5'-aminolevulínico ou ácido delta-aminolevulínico

ALT – alanina aminotransferase

ANOVA – análise de variância

AST – aspartato aminotransferase

CAT – catalase

Composto 1 - E-1,1-metiltio-selenofenil-2-pirrolidinona-hepteno

CuSO₄ – sulfato de cobre

DCFH-DA – diclorofluorisceína diacetato

DL₅₀ ou LD₅₀ – dose letal

DMSO – dimetilsulfóxido

DNPH – dinitrofenil hidrazina

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EROs – espécies reativas de oxigênio

GSH-Px – glutationa peroxidase

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

H₂SeO₃ – ácido selenoso

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

O₂^o – ânion superóxido

OH^o – radical hidroxil

PBG - porfobilinogênio

RS – espécies reativas

R-SeH – selenol

S.E.M – erro médio padrão

Se – selênio

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	
APRESENTAÇÃO	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
	3
2.1. Toxicologia	
2.2. Toxicidade	4
2.3. Danos Oxidativos	4
2.4. Selênio	7
2.4.1. Histórico	7
2.4.2. Toxicidade	8
2.4.3. Importância Fisiológica	9
2.4.4. Biodisponibilidade do selênio	11
2.4.5. Disseleneto de Difenila	12
2.5. Enzima δ-ALA-D	14
2.5.1. Histórico e Função	14
2.5.2. Características Estruturais	16
2.5.3. Importância toxicológica	17
3. OBJETIVOS	18
4. ARTIGO CIENTÍFICO	19
4.1. Antioxidant Activity and Low Toxicity of (E)-1-(1-(methylthio)-1-selenopheny) hept-1-en-2-yl) pyrrolidin-2-one, an Organoselenium Compound	20
5. DISCUSSÃO	56

6. CONCLUSÕES	60
7. PERSPECTIVAS	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
Demais trabalhos desenvolvidos durante o Curso de Mestrado	83

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, está descrita uma sucinta revisão bibliográfica sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual encontra-se no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representa a íntegra deste estudo.

Os itens, **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

No item **PERSPECTIVAS** estão expostos os possíveis estudos para continuação do estudo do autor, referente a esse assunto.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento significativo da concentração intracelular de espécies oxidantes, como espécies reativas de oxigênio (ERO) e acompanhada simultaneamente pela perda das defesas antioxidantes (Arteel and Sies, 2001). As EROs provocam severas mudanças à nível celular levando à morte celular devido a sua extrema reatividade. As EROs atacam os constituintes celulares, como proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos levando a formação de compostos tóxicos (Kaharaman et al., 2003). Muitas doenças e processos degenerativos podem ser associados com a superprodução de EROs, incluindo inflamações, isquemia cerebral, mutagenicidade, câncer, demência e envelhecimento (Ren et al., 2001).

O selênio (Se) é um elemento traço essencial na dieta, no entanto, concentrações ligeiramente superiores às requeridas apresentam efeitos tóxicos. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a deficiência de selênio na dieta está relacionada com a gênese e ou progressão de diversas patologias como desordens cardiovasculares e neurológicas, câncer e diabetes (Wilber, 1980; Salonen et al., 1982; Oldifield, 1987; El-Bayoumy, 1991; Combs and Gray, 1998; Armstrong et al., 1996; Navarro-Alárcon e Lopez-Martinez, 2000; Reddi et al., 2001). A atividade antioxidante exibida pelo elemento parece ser responsável pela sua eficácia no tratamento de doenças que tem o estresse oxidativo como processo central no seu desenvolvimento.

Compostos orgânicos de selênio vêm sendo usados devido a sua seletividade reacional (Moro et al., 2005) e a sua grande atividade biológica. Esses

compostos reagem com grupos tióis em importantes moléculas biológicas (Nogueira et al., 2004). Assim, enzimas contendo tióis, assim como δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), a qual é responsável pela síntese do heme (Barbosa et al., 1998; Maciel et al., 2000; Meotti et al., 2003; Nogueira et al., 2003), são inibidas por compostos orgânicos de selênio.

O disseleneto de difenila (PhSe)₂ (Figura 1) um composto orgânico de selênio que juntamente com o ebselen apresentam atividade tipo-glutationa peroxidase e atividades antioxidantes (Wilson et al., 1989; Rossato et al., 2002a; Meotti et al. 2004; Santos et al., 2005; Barbosa et al. 2006). Em doses antiinflamatórias e antinociceptivas, esse composto não apresentou toxicidade em camundongos, ratos e coelhos (Nogueira et al., 2001; Zasso et al., 2005, de Bem et al., 2006). Além disso, o disseleneto de difenila apresenta um papel importante em variedades de modelos experimentais associados com a superprodução de radicais livres (Rossato et al., 2002b; Ghislene et al., 2003; Borges et al., 2005; Barbosa et al., 2006).

Considerando as propriedades químicas, farmacológicas e toxicológicas já apresentadas pelos compostos sintéticos orgânicos de selênio, o presente estudo visa avaliar a atividade antioxidante e a toxicidade apresentada pelo composto E-1,1-metiltio-selenofenil-2-pirrolidinona-hepteno (composto **1**) (Figura 2) *in vitro* e *ex vivo* experimentos.

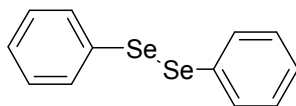


Figura 1 – Estrutura do disseleneto de difenila

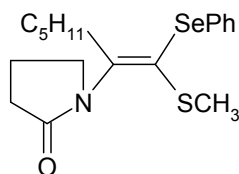


Figura 2 - Estrutura do E-1,1-metiltio-selenofenil-2-pirrolidinona-hepteno (composto 1)

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Toxicologia

A toxicologia se ocupa da natureza e dos mecanismos das lesões tóxicas e da avaliação quantitativa do espectro das alterações biológicas produzidos pela exposição aos agentes químicos.

É a ciência que tem como objeto de estudo o efeito adverso de substâncias químicas sobre os organismos vivos, com a finalidade principal de prevenir o aparecimento deste efeito, ou seja, estabelecer o uso seguro destas substâncias químicas.

A toxicologia se apóia, então, em 3 elementos básicos:

1) o agente químico capaz de produzir um efeito;

2) o sistema biológico com o qual o agente químico irá interagir para produzir o efeito;

3) o efeito resultante que deverá ser adverso (ou tóxico) para o sistema biológico. (Amdur et al., 1996)

2.2. Toxicidade

É a capacidade, inerente a um agente químico, de produzir danos aos organismos vivos, em condições padronizadas de uso. Uma substância muito tóxica causará dano a um organismo se for administrada em quantidades muito pequenas, enquanto que uma substância de baixa toxicidade somente produzirá efeito quando a quantidade administrada for muito grande.

O conhecimento da toxicidade das substâncias químicas se obtém através de experimentos em laboratório utilizando animais. Os métodos são empregados com todo rigor científico com a finalidade de fornecer informações relativas aos efeitos tóxicos e principalmente para avaliar riscos que podem ser extrapolados ao homem (Amdur et al, 1996).

2.3. Danos oxidativos

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas normalmente durante o metabolismo celular. As EROs incluem radicais livres, como radicais hidroxil (OH^{\cdot}) e ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), bem como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) entre outros. Os radicais livres possuem uma grande reatividade, causando lipoperoxidação e oxidações de proteínas e DNA.

As membranas celulares, que contêm grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, podem sofrer danos mediados por radicais livres. A lipoperoxidação é iniciada por algum radical, que ao reagir com os lipídios insaturados das biomembranas resulta na formação de hidro ou lipoperóxidos, que são altamente reativos e podem seguir uma cascata oxidativa, com severas conseqüências à integridade da membrana, liberando no meio produtos da degradação de ácidos graxos tais como, o malondialdeído. A quantificação de tal composto têm sido utilizada para avaliar a extensão do dano oxidativo. Esta quantificação pode ser feita pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), a qual tem sido usada como uma medida de lipoperoxidação (Ohkawa et al., 1979).

Os antioxidantes são substâncias que direta ou indiretamente protegem os sistemas celulares dos efeitos tóxicos produzidos por radicais oxidativos (Halliwell, 1995). Existem diversos compostos com ação biológica e importante função antioxidante, entre eles: vitamina C, glutathione, glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase (Halliwell, 1999; Evans et al., 1997; Jourdeuil et al., 1998; McKenzie et al., 1998; Krishna et al., 1996).

A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel, citosólico, que remove radicais $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e oxigênio singlete. A vitamina C também é importante na redução do radical alfa-tocoferil até alfa-tocoferol (Namiki, 1990). Durante sua função antioxidante o ascorbato sofre uma oxidação até ácido dehidroascórbico (forma oxidada da vitamina C) com a formação intermediária do radical ascorbil, que é relativamente pouco reativo. O ácido ascórbico é um dos antioxidantes mais importantes em tecidos de mamíferos (Banhegyi et al., 1997), tendo sido demonstrado que ele é eficiente na redução da toxicidade de vários xenobióticos,

tais como chumbo (Fox, 1975), organofosfatos (Chakraborty et al., 1978) e cloreto de mercúrio (Chatterjee & Rudra Pal, 1975).

A catalase (CAT) é a mais eficiente das enzimas conhecidas, tanto que ela não pode ser saturada pelo peróxido de hidrogênio (Lledías et al., 1998). A catalase reage com o peróxido de hidrogênio formando água e oxigênio molecular.

Entre as peroxidases que contém selênio, destaca-se a glutathione peroxidase (GSH-Px). Essa enzima catalisa a redução de hidroperóxidos utilizando-se de grupos tiólicos (principalmente glutathione) como doador de elétrons (agente redutor), protegendo dos danos oxidativos (Matés, 2000). Como já visto, os peróxidos são um importante passo na formação de espécies reativas de oxigênio e conseqüente propagação da lipoperoxidação, portanto, a remoção de peróxidos atenua os danos oxidativos nas membranas celulares. Além da glutathione peroxidase, outras selenoenzimas contendo selenocisteína ou selenometionina podem manter uma linha de defesa dependente de glutathione contra processos oxidativos, como por exemplo a peroxinitrito redutase (Sies et al., 1997).

Sob condições normais, os sistemas antioxidantes celulares minimizam os danos causados pelas EROs, porém, quando a produção de radicais livres excede a capacidade protetora da célula, têm-se o estresse oxidativo.

As espécies reativas de oxigênio podem ser tóxicas, e determinantes do tempo de vida celular. Porém, os tipos celulares específicos onde a ocorrência de dano oxidativo pode limitar o tempo de vida ainda não estão completamente esclarecidos (Parkes et al., 1998). Entretanto, já está demonstrado que os metabólitos das espécies reativas de oxigênio estão associados com muitos

processos degenerativos (Melov et al., 1998; Janssen et al., 1998). Alterações no *status* oxidativo do organismo têm sido implicadas em diversas desordens, tais como câncer, catarata, isquemia, enfisema pulmonar, diabetes mellitus, envelhecimento, doenças neurodegenerativas e cirrose hepática (Cohen, 1989; Halliwell & Gutteridge, 1990; Floyd, 1990). Também tem sido relatada a ocorrência de dano oxidativo renal (Fukino et al., 1984; Lund et al., 1993), caracterizado por lipoperoxidação após exposição ao cloreto de mercúrio (Yonaha et al., 1980).

Os radicais livres podem induzir diretamente lipoperoxidação ou modificar os grupos sulfidrílicos. Esta modificação pode ser reversível, enquanto a oxidação das membranas não o é. Esta reversão pode ser promovida enzimaticamente (catalases, superóxido dismutase, glutathione peroxidase), ou de forma não enzimática, pela ação da vitamina C ou de tióis endógenos como a glutathione (Pruijn et al., 1991).

2.4. Selênio

2.4.1. Histórico

O selênio é um elemento traço essencial na dieta, no entanto, concentrações ligeiramente superiores às requeridas apresentam efeitos tóxicos. Este elemento químico foi descoberto em 1817 pelo sueco Jons. J. Berzelius enquanto investigava uma doença que acometia trabalhadores em uma fábrica de ácido sulfúrico.

Já no século XIII, Marco Polo relatou que cavalos na região de Succuir, no oeste da China apresentavam perda de cascos e pêlos após a ingestão de certas

plantas venenosas. Seis séculos após os relatos de Marco Polo, foram descritos os mesmos sintomas em animais que se alimentaram da vegetação nativa próxima ao Rio Missouri, entre o Sul de Dakota e Nebraska, Estados Unidos. A descoberta do agente etiológico destes efeitos tóxicos data do ano de 1928, quando Dr. Kurt Franke estudou estas plantas e seus grãos, concluindo que se tratava do selênio.

Devido a estas intoxicações, o selênio passou a ser um elemento conhecido por sua importância toxicológica, pois causava emagrecimento, perda de pêlos e anemia (Franke, 1934). Investigando-se a respeito das fontes naturais de selênio, foi descoberto que algumas espécies de plantas dos gêneros *Astragalus*, *Xylorrhiza*, *Oonopsis* e *Stanleya* eram capazes de acumular este elemento quando cresciam em solos seleníferos (Trelease & Beath, 1949).

2.4.2. Toxicidade

Atualmente sabe-se que a dose tóxica de selênio é de apenas 100 vezes à ingestão diária recomendada (Who, 1987). Recentemente foi relatado que o excesso de selênio causa morte em aves adultas, além de deformações e morte embrionária (Ohlendorf, 1999). Em ratos, Usami et al. (1999), relataram que o selênio causa teratogenicidade.

O selênio elementar e os sais orgânicos são menos tóxicos. A forma mais tóxica encontrada é a do ácido selenoso (H_2SeO_3).

A toxicidade do selenito é em parte atribuída à sua redução até seleneto, pela glutathione, produzindo espécies reativas de oxigênio (Yan & Spallholz, 1993). Já na década de 60, especulava-se sobre os efeitos tóxicos do selênio, onde seu excesso causaria inativação das enzimas sulfidrílicas (Tsen & Collier, 1959; Schwarz, 1961).

Embora o selênio seja bem reconhecido como elemento traço essencial e apresente uma variedade de efeitos protetores para humanos e animais contra determinadas doenças (Combs and Gray, 1998; Navarro-Alárcon e Lopez-Martinez, 2000), sua toxicidade foi descrita em 1941 (Painter, 1941). Apesar, do mecanismo pelo qual este elemento exerce sua toxicidade não encontrar-se totalmente elucidado, vários estudos sugerem que os efeitos tóxicos do mesmo estão associados à sua habilidade em catalisar a oxidação de tióis endógenos e com a gênese de radicais livres (Seko et al., 1989, Spallhoz et al., 1994; Barbosa et al., 1998; Nogueira et al., 2003b; 2004).

2.4.3. Importância Fisiológica

O selênio foi descrito como micronutriente essencial ao fim da década de 50, quando foram observadas desordens causadas pela sua deficiência em ovinos, bovinos, suínos e aves (Eggert et al., 1957; Muth et al., 1958; Calvert et al., 1962; Hartley & Grant, 1961). A deficiência de selênio tem sido apontada como causa de algumas patologias humanas, como cardiomiopatia (Keshan disease research group, 1979), problemas musculares, alterações digestivas e distúrbios reumáticos (Neve, 1996; Ortuño et al., 1996).

O selênio possui várias funções biológicas. A mais conhecida é sua ação antioxidante, por formar selenocisteína, que faz parte do centro ativo da enzima glutathione peroxidase (GSH-Px), (Flohe et al., 1973; Rotruck et al., 1973), que é responsável pela remoção de peróxidos. Inicialmente a selenocisteína presente no sítio ativo da enzima reage com um hidroperóxido orgânico para formar ácido selenênico, a seguir ocorre uma redução seqüencial (duas etapas) da enzima com oxidação da glutathione (GSH) (Sies, 1993). Devido a essa função na GSH-Px, o selênio provavelmente interage com qualquer nutriente que afete o balanço anti e pró-oxidante celular (Levander & Burk, 1994; Alarcón & Martínez, 2000). Mais recentemente foram descobertas outras selenoproteínas como a iodotironina 5'-deiodinase, (Foster & Sumar, 1997), glutathione peroxidase de hidroperóxidos de fosfolípidios (Ursini et al., 1982), e a tioredoxina redutase (May et al., 1998).

O selênio compartilha propriedades químicas e físicas com o enxofre. Esta similaridade permite que o selênio substitua o enxofre, promovendo interações selênio-enxofre nos sistemas biológicos. Por outro lado, as diferenças nas propriedades físico-químicas entre selênio e enxofre constituem a base de seus papéis biológicos específicos (Stadtman, 1980).

Os selenóis (R-SeH) são as formas correspondentes aos tióis (R-SH), onde ocorre a substituição do átomo de enxofre pelo átomo de selênio (Klayman e Günther, 1973).

Esse calcogênio apresenta um grande número de funções biológicas, sendo a mais importante como antioxidante. Sabe-se que moléculas contendo selênio, como por exemplo o disseleneto de difenila (PhSe)₂, podem ser melhores

nucleófilos (e portanto antioxidantes) do que os antioxidantes clássicos (Arteel e Sies, 2001).

A atividade antioxidante exibida pelo elemento parece ser responsável pela sua eficácia no tratamento de doenças que tem o estresse oxidativo como processo central no seu desenvolvimento. Além da propriedade antioxidante, determinados compostos de selênio exibem ação antinociceptiva, neuroprotetora, anti-inflamatória, anticarcinogênica, hepatoprotetora e insulina-like (El-Bayoumy, 1991; Stapleton et al., 2000; Rossato et al., 2002b; Porciuncula et al., 2003; Nogueira et al., 2003b, Burguer et al., 2005; Zasso et al., 2005, Borges, et al., 2006).

2.4.4. Biodisponibilidade do selênio

A incorporação de selênio no organismo, especialmente como cofator de enzimas do sistema antioxidante, depende, além da quantidade absorvida, da sua conversão a uma forma biologicamente ativa (Foster & Sumar, 1995).

As formas inorgânicas de selênio (selenito e selenato) são imediatamente destinadas à síntese de selenoproteínas, entre elas a GSH-Px, e o excesso é excretado (Alarcón & Martínez, 2000). Correlacionando diferentes fontes de selênio *in vitro*, Leist et al. (1999) encontraram que o selenito de sódio (Na_2SeO_3) e selenocistina N-etil-carbamato são doadores de selênio de alta biodisponibilidade promovendo aumento na captação de selênio, indução de enzimas dependentes de GSH, e proteção contra lipoperoxidação. Por outro lado, estes autores observaram que o selênio fornecido pela selenometionina foi

incorporado pelos hepatócitos, mas não teve efeito como citoprotetor nem atividade GSH-Px. A selenometionina é uma forma orgânica de selênio que pode ser incorporada ao acaso em proteínas quando a quantidade de metionina disponível no organismo estiver baixa, ou ser catabolizada liberando o selênio. A selenocisteína não é estocada, e sim diretamente catabolizada com liberação do selênio. A selenocisteína pode também ser incorporada em selenoproteínas (Levander & Burk, 1994). Conseqüentemente os níveis de GSH-Px são principalmente regulados pelos níveis de selenocisteína ou de formas inorgânicas de selênio. (Burk, 1986, Hassan et al., 1990; Ekholm et al., 1991; Lane et al., 1991).

A biodisponibilidade de selênio é bastante variável, dependendo de sua forma química. Experimentos *in vivo* demonstraram uma maior biodisponibilidade do selênio oriundo de fontes orgânicas (carne bovina) do que do selenito ou selenato (Shi & Spallholz, 1994). No entanto, a maioria dos estudos indica que a biodisponibilidade do selênio em fontes orgânicas (carnes, peixes, produtos lácteos, etc) é menor do que na forma de selenito (Cantor et al., 1975; 1982; Levander, 1983; Diaz et al., 1994; 1996; Shen et al., 1993).

2.4.5. Disseleneto de difenila

O disseleneto de difenila (PhSe)₂ é um organocalcogênio empregado como intermediário em síntese orgânica (Zeni et al., 2003). A partir da década de 30, os organocalcogênios têm sido alvo de interesse para os químicos orgânicos em virtude da descoberta de aplicações sintéticas (Petraghani et al., 1976; Comasseto, 1983), sendo importantes intermediários e reagentes muito utilizados

em síntese orgânica (Paulmier, 1986; Braga et al., 1996; 1997) e de propriedades biológicas desses compostos (Parnham e Graf, 1991; Kanda et al., 1999)

Conseqüentemente, o risco de contaminação ocupacional por organocalcogênios tem motivado estudos toxicológicos. Outro aspecto relevante é a tentativa crescente de desenvolvimento de compostos organocalcogênios que possuam atividades biológicas e aplicações farmacológicas (Parnham e Graf, 1991; Nogueira et al., 2003b).

Conforme alguns estudos, o disseleneto de difenila possui atividade antiinflamatória e antinociceptiva, quando administrado de forma aguda em ratos e camundongos (Nogueira et al., 2003b). Recentemente, tem sido descrito que este composto orgânico de selênio apresenta propriedades antiúlcera (Savegnago et al., 2006) e hepato-protetora (Borges et al., 2005; 2006). Além disto, diversos trabalhos têm demonstrado que o disseleneto de difenila possui efeito protetor contra a lipoperoxidação em ratos e camundongos (Meotti et al. 2004; Santos et al., 2004; 2005). De fato, Nogueira et al. (2004) sugerem que, pelo fato de o disseleneto possuir atividades semelhantes as da glutathione peroxidase, este composto é um bom candidato a ser um agente antioxidante. Parte destes efeitos protetores estão ligados com a capacidade dos mesmos em decompor peróxidos na presença de tióis e de reduzir a peroxidação lipídica em diversos modelos experimentais.

Em doses farmacológicas o disseleneto de difenila apresenta baixa toxicidade tanto para ratos como para camundongos (Perottoni et al., 2005; Fachineto et al., 2006). No entanto, a DL_{50} do disseleneto de difenila (via intraperitoneal e subcutânea) para estes animais é maior que a do ebselen (Meotti

et al., 2003). Por outro lado, o tratamento crônico (14-21 dias) ou agudo com altas doses de disseleneto de difenila, acarreta na inibição da atividade da enzima δ -ALA-D e na depleção de grupos tióis de moléculas endógenas de baixo peso molecular (Maciel et al., 2003). Tais efeitos também parecem estar correlacionados com a atividade pró-oxidante do composto.

Alguns estudos, relatam que quando administrado de forma crônica e em altas doses, o disseleneto de difenila pode causar danos cerebrais em camundongos (Maciel et al., 2000; Jacques-Silva et al., 2001). De fato, Nogueira et al (2003c) demonstraram que o disseleneto de difenila pode causar efeitos neurotóxicos em ratos e camundongos. Além disso, o disseleneto de difenila pode causar inibição da Na^+ , K^+ -ATPase cerebral de ratos (Borges et al., 2005) e afetar o sistema glutamatérgico em plaquetas humanas (Borges et al., 2004) e em ratos (Nogueira et al., 2001). Dados da literatura também indicam que o disseleneto de difenila possui efeito teratogênico, causando má-formação óssea e outras anomalias em fetos de ratas tratadas com este composto (Fávero et al., 2005).

2.5. Enzima δ -ALA-D

2.5.1. Histórico e função

Isolada nos anos 50 (Gibson et al., 1955), a metalo-proteína citoplasmática δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D, E.C. 4.2.1.24), também conhecida como porfobilinogênio sintase ou 5-aminolevulinato hidrolase é a enzima que catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido delta-aminolevulínico (ácido 5-aminolevulínico, ALA), com perda de 2 moléculas de água, para formar o

composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG) (Figura 3) (Jaffe, 2004). Esta reação catalisada pela δ -ALA-D faz parte da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofilas e hemes), sendo esta via biossintética semelhante em bactérias, vegetais e animais (Rodrigues, 1989). Nos mamíferos, os tecidos que apresentam maior atividade desta enzima são o hepático, o renal e os tecidos hematopoiéticos (Gibson et al., 1955).

Os compostos tetrapirrólicos têm importância metabólica baseada, principalmente, na sua função como grupos prostéticos de proteínas. O heme (ferroprotoporfirina), por exemplo, faz parte da estrutura de proteínas que participam do transporte e armazenamento de oxigênio (hemoglobina e mioglobina, respectivamente); do transporte de elétrons (citocromos a, b e c); da biotransformação de xenobióticos (citocromo P450) e do sistema de proteção contra peróxidos (catalases e peroxidases) (Timbrell, 1991).

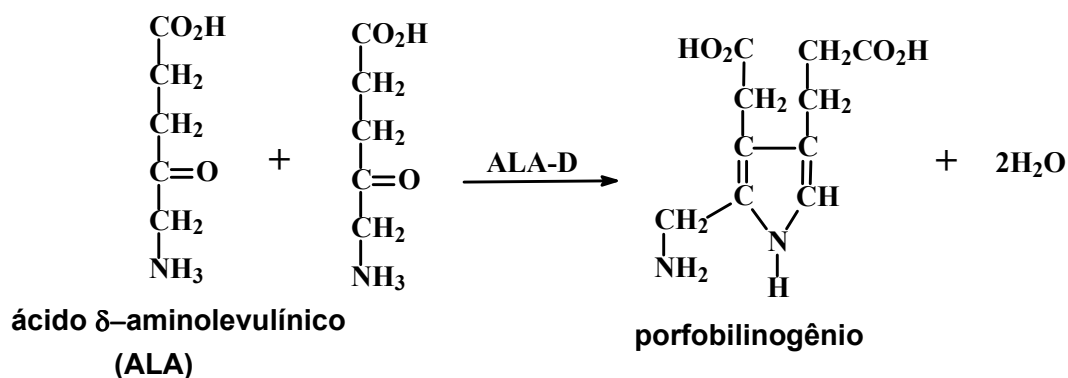


Figura 3: Condensação assimétrica de 2 moléculas do ALA, catalisada pela enzima δ -aminolevulinato desidratase.

2.5.2. Características estruturais

A δ -ALA-D, independente da sua fonte, é uma enzima sulfidrídica (Bevan et al., 1980), sendo, portanto, inibida por agentes bloqueadores de grupos sulfidrídicos, tais como N-etilmaleimida, iodoacetato (Jordan et al., 1976; Barnard et al., 1977), para-cloromercúriobenzoato, monoiodoacetamida e DTNB (Barreiro, 1967; Barnard et al., 1977; Tamai et al., 1979) e por metais pesados que possuam elevada afinidade por grupamentos sulfidrídicos, como o chumbo, o cobre e o mercúrio (Gibson et al., 1955; Rocha et al., 1995; Emanuelli et al., 1996).

A maioria das enzimas δ -ALA-D isoladas até o momento requer um íon metálico bivalente para estarem ativas, mas, dependendo de sua fonte, requerem metais diferentes para sua ativação. A δ -ALA-D, de animais, leveduras e bactérias, é dependente de zinco (Chen e Neilands, 1973; Finelli et al., 1974), sendo também demonstrado que resíduos de cisteína da proteína estão envolvidos na união deste metal (Dent et al., 1990; Spencer e Jordan, 1994). Por outro lado, a enzima proveniente de vegetais, apesar de possuir uma similaridade de 35-50 % com a de outras fontes, não requer zinco, mas sim magnésio (Shibata e Ochiai, 1977; Tamai et al., 1979). A região rica em cisteína presente na enzima de origem animal, e que corresponde à região que supostamente liga zinco, é substituída na enzima de vegetais por uma região rica em aspartato, que caracterizaria o sítio para a união do magnésio (Boese et al., 1991; Schaumburg et al., 1991).

A enzima δ -ALA-D de mamíferos é inibida por quelantes como EDTA e 1,10-fenantrolina (Chen e Neilands, 1976; Sommer e Beyersmann, 1984), sendo

esta inibição revertida pela adição de zinco (Bevan et al., 1980). Isto mostra que o zinco faz parte da estrutura da enzima e, possivelmente, tenha um papel fundamental no seu mecanismo catalítico. Entretanto, o papel do zinco na atividade da δ -ALA-D não está, ainda, completamente elucidado. Algumas evidências sugerem uma função catalítica direta, enquanto outras apontam para uma função estrutural do zinco na enzima, ou ambas (Tsukamoto et al., 1979; Dent et al., 1990; Spencer e Jordan, 1995). Após a remoção do zinco pelo EDTA, os grupos $-SH$ da enzima são facilmente oxidados, com concomitante perda da atividade enzimática. A apoenzima oxidada obtida então, apenas incorporará zinco novamente na presença de um ativador sulfidrílico (Tsukamoto et al., 1979; Bevan et al., 1980).

2.5.3. Importância toxicológica

A inibição da δ -ALA-D pode prejudicar a rota biossintética do heme, resultando em conseqüências patológicas (Sassa et al., 1989; Goering, 1993). Além da redução na síntese do heme, a inibição desta enzima pode resultar no acúmulo do substrato ALA no sangue, com conseqüente aumento na excreção urinária do mesmo. O acúmulo de ALA pode estar relacionado com a superprodução de espécies reativas de oxigênio (Pereira et al., 1992; Bechara et al., 1993). Além disso, o ALA gerado no fígado e medula óssea pode atravessar a barreira hemato-encefálica, apresentando efeitos neurotóxicos (Becker et al., 1971; Cutler et al., 1979).

3. OBJETIVOS

Atualmente as espécies reativas de oxigênio (EROs) são responsáveis pela maioria das doenças mundiais. Estando um organismo em descompasso entre as suas defesas endógenas e a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio um estresse oxidativo é formado desencadeando uma série de transformações metabólicas, ocasionando assim uma possível injúria. Na busca por uma melhor condição de vida da população, pesquisadores de todo o mundo tentam sintetizar compostos que possam minimizar esses descompassos. Nessa classe encontram-se os compostos orgânicos de selênio, que já demonstraram apresentar uma série de propriedades benéficas aos organismos testados.

Considerando estas abordagens, o presente estudo tem como objetivos investigar os seguintes aspectos: (1) estudar o efeitos do composto E-1,1-metiltio-selenofenil-2-pirrolidinona-hepteno, composto **1**, em diferentes tecidos de ratos e camundongos; (2) investigar a atividade antioxidante *in vitro* do composto **1** em fígado e cérebro de ratos; (3) avaliar a toxicidade apresentada pelo composto **1** em cérebro, fígado e plasma de camundongos expostos a diferentes doses do composto e (4) analisar por meio de parâmetros bioquímicos os possíveis efeitos desse composto em camundongos.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual encontra-se aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito está disposto da mesma forma que será submetido para publicação.

4.1- Antioxidant Activity and Low Toxicity of (E)-1-(1-(methylthio)-1-selenopheny) hept-1-en-2-yl) pyrrolidin-2-one, an Organoselenium Compound

RAFAEL PORTO INEU, MATHEUS DOS SANTOS, CAROLINE SCHNEIDER,
OLGA SOARES BARROS, CRISTINA WAYNE NOGUEIRA, JOÃO BATISTA
TEIXEIRA ROCHA, GILSON ZENI

Manuscrito a ser submetido para publicação

**Antioxidant Activity and Low Toxicity of (E)-1-(1-(methylthio)-1-selenopheny)
hept-1-en-2-yl) pyrrolidin-2-one, an Organoselenium Compound**

RAFAEL PORTO INEU, MATHEUS DOS SANTOS, CAROLINE SCHNEIDER,
OLGA SOARES BARROS, CRISTINA WAYNE NOGUEIRA, JOÃO BATISTA
TEIXEIRA ROCHA, GILSON ZENI*

*Laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de
Organocalcogênicos, Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e
Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, RS, Brazil*

Corresponding author

Dr. Gilson Zeni

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

97105-900 Santa Maria - RS - Brazil

Tel: 55-55-220-8140

Fax: 55-55-220-8978

e-mail: gzeni@quimica.ufsm.br (G. Zeni)

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the potential pharmacological and toxicological properties of (E)-1-(1-(methylthio)-1-(selenopheny) hept-1-en-2-yl) pyrrolidin-2-one (compound **1**), an organoselenium compound. A number of parameters were examined in brain, liver and plasma as an indicator of toxicity, including TBARS levels, ascorbic acid content, δ aminolevulinate dehydratase and catalase activity, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, urea and creatinine levels. In vitro experiments showed that compound **1** had a dose-dependent reduction in lipid peroxidation induced by Fe^{2+} in TBARS production and in the generation of reactive species (RS) caused by Fe^{2+} /malonate in DCFH-DA oxidation. Calculated LD_{50} of compound **1**, administered by oral route, was higher than 500 mg/kg. Ex vivo experiments demonstrated that alanine aminotransferase activity was increased by the highest doses of compound **1** (500 mg/kg) and aspartate aminotransferase did not change significantly from the control values. Urea levels showed a decrease at highest dose and creatinine to increase at middle and high doses. In enzymatic and non-enzymatic parameters, ex vivo experiments demonstrated that compound **1** did not change hepatic δ -aminolevulinate dehydratase activity at 100 and 250 mg/kg. δ -aminolevulinate dehydratase activity in liver was inhibited in mice treated with the highest dose (500mg/kg) of compound **1** but no significant differences to the control values were detected in brain δ -aminolevulinate dehydratase activity at the same concentration. Catalase activity in brain of exposed mice demonstrated a decrease and showed a significant result only at 100mg/kg. In contrast with this, in hepatic tissue, the

catalase activity showed a significant increase in all doses. Hepatic lipid peroxidation in treated mice did not differ from control values otherwise, in brain tissue, all concentrations showed a significant reduction in TBARS levels. Ascorbic acid content was increased only at the highest concentration of compound **1**. This is a promising compound with antioxidant activity and low toxicity but more detailed pharmacological studies involving organoselenium compounds are necessary.

Keywords: organoselenium, antioxidant, selenium, reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress.

1. Introduction

Oxidative stress is characterized by a significantly increased concentration of intracellular oxidizing species, such as reactive oxygen species (ROS) and is often accompanied by the simultaneous loss of antioxidant defense capacity (Arteel and Sies, 2001). Reactive oxygen species (ROS) provoke severe changes at the cellular level leading to cell death because of their extreme reactivity. They attack essential cell constituents, such as proteins, lipids and nucleic acids, leading to the formation of toxic compounds (Kaharaman et al., 2003). Many diseases and degenerative processes can be associated with the overproduction of ROS, including inflammation, brain ischemia, mutagenesis, cancer, dementia and physiological aging (Ren et al., 2001).

Selenium (Se) is recognized as an essential element, structural component of several enzymes involved in peroxide decomposition, including glutathione peroxidase (Flohé et al., 1973; Rotruck et al., 1973) and phospholipids

hydroperoxide glutathione peroxidase (Ursini et al., 1982). To respond to reactive oxygen species (ROS), compounds can be envisaged that combine a range of antioxidant activities in one chemically simple molecule. Organoselenium compounds have found such wide utility because of their effects on an extraordinary number of very different reactions, including many carbon-carbon bond formations, under relatively mild reaction conditions. Furthermore, organoselenium compounds can usually be used in a wide variety of functional groups, thus avoiding protection group chemistry (Nogueira et al., 2004).

Organoselenium compounds have become attractive synthetic targets because of their chemio, regio and stereo selective reactions (Moro et al., 2005) and their useful biological activity (Nogueira et al., 2004). In fact, a variety of organoselenium compounds with potential antioxidant activity, including ebselen analogues, benzoselenazolinones, diaryl diselenides, selenamide and related derivatives have been reported (Sies, 1993; Yamagushi et al., 1998; Saito et al., 1998; Nogueira et al., 2004). Regarding toxicological studies, organoselenium compounds react with thiol groups from biologically important molecules (Nogueira et al., 2004). Accordingly, thiol-containing enzyme, such as δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D), that is responsible for the heme syntheses, (Barbosa et al., 1998; Maciel et al., 2000; Meotti et al., 2003; Nogueira et al., 2003) is inhibited by organoselenium compounds. The prototype of this class of compounds is ebselen, an antioxidant agent with thiol-peroxidase and thioredoxin reductase-like activity that has been used with relative success in the treatment of acute human brain pathologies such as ischemia and stroke (Saito et al., 1998; Kondoh et al., 1999; Imai et al., 2003).

Diphenyl diselenide is an organoselenium compound that shares with ebselen a thiol peroxidase-like activity and other antioxidant properties (Wilson et al., 1989; Rossato et al., 2002a; Meotti et al. 2004; Santos et al., 2005a, b; Barbosa et al. 2006). At anti-inflammatory and antinociceptive doses, this compound has no overt toxicity in mice, rats or rabbits (Nogueira et al., 2001; Zasso et al., 2005, de Bem et al., 2006). Furthermore, diphenyl diselenide has a protective role in a variety of experimental models associated with the overproduction of free radicals (Rossato et al., 2002b; Ghislene et al., 2003; Borges et al., 2005; Barbosa et al., 2006).

Based on the organoselenium chemistry and pharmacological properties presented by synthetic organoselenium compounds, the aim of the present study was to evaluate the potential pharmacological and toxicological properties of (E)-1-(1-(methylthio)-1-(selenopheny) hept-1-en-2-yl) pyrrolidin-2-one (compound **1**), an organoselenium compound, in vitro and ex vivo experiments, a time that this compound presented a promising results.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male adult Wistar rats (200–250 g) and Swiss mice (25-35 g) from our own breeding colony were used. The animals were kept in separate animal rooms on a 12 h light/dark cycle, at a room temperature of 22-24 °C, and with free access to water and food. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, the Federal University of Santa Maria RS, Brazil.

2.2. Materials

Diphenyl diselenide and compound **1** were prepared by the method previously described by Paulmier (1986). Analysis of the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra showed that the compounds presented analytical and spectroscopic data in full agreement with their assigned structures. The chemical purity of diphenyl diselenide and compound **1** (99.9%) were determined by GC/HPLC. Organoselenium compounds were dissolved in DMSO (dimethylsulfoxide) for in vitro and in soy oil for ex vivo experiments. All other reagents were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.3. In vitro experiments

2.3.1. Lipid peroxidation

FeCl_2 was used as classical inductor of lipid peroxidation. Animals were killed by decapitation and whole liver and brain tissues were rapidly homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 (1:10, w/v) and centrifuged at $4000\times g$ at 4°C for 10 minutes to yield a low-speed supernatant fraction (S1). An aliquot of 200 μl of S1 was added to the reaction mixture containing: 10 μM FeCl_2 and compound **1** at different concentrations (50-500 μM). Afterwards, the mixture was pre-incubated for 1 h at 37°C . After the pre-incubation, 500 μl thiobarbituric acid (0.8%), 200 μl SDS (8.1%) and 500 μl acetic acid were added to the reaction medium and the mixture was incubated for 2 h at 95°C . The formation of lipid peroxides in the reaction was measured by the method of Ohkawa et al. (1979) using malondialdehyde (MDA) as an external standard.

2.3.2. RS measurement

Formation of RS was estimated according to a previous report (Ali et al., 1992) and adapted for brain and liver homogenates. To estimate the level of brain and liver reactive species (RS) production, samples were homogenized (1:10, w/v) in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) and incubated with 10 μ l of dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; 10 μ M) in the presence or the absence of a prooxidant (Fe^{2+} /malonate; 0.5 μ M/100 μ M) and compound **1** (1–200 μ M). The reactive species levels were determined by a spectrofluorimetric method, using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. The oxidation of DCFH-DA to fluorescent dichlorofluorescein DCF is measured for the detection of intracellular RS. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation) 30 and 60 minutes after the addition of DCFH-DA to the medium.

In view of the in vitro antioxidant properties presented by compound **1** and to gain better understanding of the toxicity of this organoselenium compound, toxicological parameters were assessed ex vivo.

Acute exposure

Mice were treated with a single oral dose, by gavage, of compound **1** (100, 250 and 500 mg/kg) or vehicle (1 mL/kg, soy oil). After the compound administration, animals were observed up to 72 h to determine the lethal potential of compound **1**.

2.4. Ex vivo experiments

2.4.1. Tissue preparation

After 72 h of exposure, animals were slightly anesthetized for blood collection by heart puncture in tubes containing heparin. Plasma was obtained by centrifugation at 2000×g for 10 min (hemolyzed plasma was discarded). All groups were killed by decapitation and the liver and brain were quickly removed and homogenized in 10 volumes of 50 mM Tris–HCl, pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 4000×g at 4°C for 10 minutes and a low supernatant fraction (S1) was used for ex vivo assays.

2.4.2. Lipid peroxidation

The low supernatant fraction (S1) of liver and brain was used for thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) assay according to Ohkawa et al. (1979). Samples were incubated at 95°C for 120 min. The amount of TBARS produced was measured at 532 nm (Spectrophotometer U-2001 Hitachi), using MDA as an external standard.

2.4.3. δ -ALA-D activity

δ -ALA-D activity from liver and brain was assayed by the method of Sassa (1982) by measuring the rate of product porphobilinogen (PBG) formation. The reaction product was determined using modified Erlich's reagent at 555 nm (Spectrophotometer U-2001 Hitachi).

2.4.4. Ascorbic acid determination

Ascorbic acid determination was performed as described by Jacques-Silva et al. (2001). Brain and liver protein were precipitated in 10 volumes of cold 4% trichloroacetic acid solution. An aliquot of the sample in a final volume of 1mL of the solution was incubated for 3 h at 38°C then 1mL H₂SO₄ 65% (v/v) was added to the medium. The reaction product was determined using color reagent containing 4.5 mg/mL dinitrophenyl hydrazine and CuSO₄ (0.075 mg/mL) at 520nm (Spectrophotometer U-2001 Hitachi).

2.4.5. Catalase activity

The brain and liver samples were homogenized in 50mM Tris-HCl, pH 7.5 (1/10, w/v) and centrifuged at 2400×g for 15 minutes. The supernatant (S1) was assayed spectrophotometrically by the method of Aebi et al. (1995), which involves monitoring the disappearance of H₂O₂ in the presence of cell homogenate at 240 nm (Spectrophotometer U-2001 Hitachi). The enzymatic activity was expressed in pmol catalase/mg of protein.

2.4.6. Biochemical parameters

Plasma enzymes, AST (aspartate aminotransferase) and ALT (alanine amino transferase), were used as the biochemical markers for the early acute hepatic damage and determined by the colorimetric method of Reitman and Frankel (1957). Renal function was analyzed by determining plasma urea (Mackay and Mackay, 1927) and creatinine levels (Jaffe, 1986). (LABTEST, Diagnostic S.A., Minas Gerais, Brazil).

2.4.7. Protein quantification

Protein was measured by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as the standard.

2.4.8. Statistical analysis

The results are presented as means \pm S.E.M. The LD₅₀ value was determined by linear regression from individual experiments using “GraphPad Software” (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by LSD test when appropriate (Statistica for Windows, Version 4.5 StatSoft, Inc.).

3. Results

In vitro

3.1. Effect of compound 1 on lipid peroxidation

The in vitro effect of compound **1** on lipid peroxidation is shown in Figure 3. In rat brain, compound **1** at 100uM protected, around 30%, against lipid peroxidation induced by Fe²⁺ (P<0.05 by LSD test) and at 200 and 400uM was significantly effective in reducing lipid peroxidation to the control level (Figure 3A). Additionally, in hepatic tissue, compound **1** showed a significantly reduction in TBARS levels at 400uM and reduced lipid peroxidation levels to the control values at 500uM final concentration (Figure 3B).

3.2. Effect of compound **1** on RS measurement

As can be observed in Figure 4A, according to one-way ANOVA, compound **1** decreased the production of reactive species (RS) in the fluorimetric assay ($P < 0.05$ by LSD test) in a concentration-dependent manner both after 30 and 60 minutes. Interestingly, compound **1** at all concentrations had a higher effect than diphenyl diselenide at 100 μM . All the values were equal or lower than control values. In figure 4B, from 1 to 50 μM compound **1** decreased the RS production, otherwise the oxidation of DCFH-DA was efficiently protected at 100 and 200 μM . In rat liver tissue the compound **1** had a tendency to decrease the reactive species (RS) in a concentration-dependent manner also.

In vivo

3.3. Animal's survival

It is possible to observe that the lower dose of compound **1** administrated to mice did not alter the lethal index. In contrast, doses at 500 mg/kg caused 33% of death in mice. Calculated LD_{50} for mice treated with compound **1** by oral route was 500 mg/kg (Figure 5).

Ex vivo

3.4. Biochemical parameters

Oral administration of compound **1** (500 mg/kg) to mice increased 1.2-fold plasma AST when compared to the control group and at 250 mg/kg had a decreased in AST activity. At 500 mg/kg ALT activity was significantly higher than control values ($P < 0.05$ by LSD test) (Table 1). One-way ANOVA indicated that

plasma urea and creatinine levels did not change significantly at all doses of compound **1** (Table 1).

3.5. δ -ALA-D activity

One-way ANOVA ($P < 0.05$ by LSD test) revealed that in cerebral δ -ALA-D was a slight increased in mice treated with 100 and 250mg/kg of compound **1**. At the highest dose (500mg/kg) δ -ALA-D activity was inhibited in comparison to the others two doses (Figure 6), but did not change in relation to the control value. At the highest dose (500mg/kg), hepatic δ -ALA-D activity was significantly inhibited in comparison to the control and all others doses ($P < 0.001$ by LSD test) (Figure 7).

3.6. Catalase activity

Catalase activity in brain of exposed mice was significantly inhibited at 100mg/kg ($P < 0.05$). In contrast, in hepatic tissue, the catalase activity showed a significant increased at all doses tested ($P < 0.05$) (Figure 8).

3.7. Lipid peroxidation levels

One-way ANOVA ($*P < 0.01$ by LSD test) revealed that lipid peroxidation in brain exposed mice decreased at all doses otherwise; in hepatic tissue, compound **1** at 100mg/kg had a tendency to diminish TBARS production in comparison to the control levels ($\#P < 0.05$ by LSD test) (Figure 9).

3.8. Ascorbic acid determination

One-way ANOVA of ascorbic acid content yielded a significant result. Compound **1** at 500 mg/kg significantly increased ascorbic acid levels (* $P < 0.006$ by LSD test) in both brain and liver tissues. On the other hands, ascorbic acid levels were not changed by any other dose, in comparison to control (Figure 10).

4. Discussion

The current study demonstrated that (E)-1-(1-(methylthio)-1-(selenopheny) hept-1-en-2-yl) pyrrolidin-2-one has a potent in vitro antioxidant activity and induces minor toxicological effects at doses lower than LD₅₀.

In vitro experiments showed a potent antioxidant property from compound **1** that had a concentration-dependent reduction in lipid peroxidation induced by Fe²⁺ in TBARS production and in the generation of reactive species (RS) caused by Fe²⁺/malonate in DCFH-DA oxidation. The compound **1** showed a higher antioxidant effect in DCFH-DA oxidation when compared to diphenyl diselenide, an extent antioxidant compound.

Calculated LD₅₀ for the compound **1**, administered by gavage, we believe that was higher than 500 mg/kg. Ours results are in accordance with the literature that reported that diphenyl diselenide is a compound that has a thiol peroxidase-like activity and other antioxidant properties with relative low toxicity. (Wilson et al., 1989; Rossato et al., 2002a; Meotti et al. 2004; Santos et al., 2005a, b; Barbosa et al. 2006). In addition, diphenyl diselenide has a protective role in a variety of experimental models associated with the overproduction of free radicals (Rossato et al., 2002b; Ghislène et al., 2003; Borges et al., 2005; Barbosa et al., 2006).

A number of reports present that enhanced serum urea and creatinine levels are indicative of renal injury (Iqbal et al., 1998; Tanaka-Kagawa et al., 1998). As a general rule, enhanced urea levels are indicative of renal injury because urea is a water soluble compound produced by liver that can be accumulated in the plasma only when the capacity of kidney to eliminate this compound is altered. However, measurement of creatinine in the plasma allows the renal clearance of this endogenous compound to be determined, and this will indicate renal dysfunction. Diphenyl diselenide did not change urea and creatinine parameters, suggesting no renal toxicity (Meotti et al., 2003). In accordance with this, our results (Table 1) demonstrated that the compound **1** did not change these biochemical parameters, indicating that the kidney is not a target for this organoselenium compound.

Compounds that oxidize-SH groups have long been known as a potent δ -ALA-D inhibitor (Meredith et al., 1979; Pappas et al., 1995; Barbosa et al., 1998). Administration of compound **1** at the highest dose for mice inhibited hepatic δ -ALA-D activity suggesting that hepatic enzyme activity is a target for this organochalcogen tested. Otherwise, no significant differences were detected in brain δ -ALA-D activity at 500mg/kg in comparison to the control values. At high doses, organochalcogens can be cytotoxic via their ability to catalyze the oxidation of thiols and to generate free radicals (Meotti et al., 2003; Borges et al., 2005). δ -ALA-D is a sensitive enzyme inhibited in pro-oxidant situations (Fernandez-Cuartero et al., 1999; Farina et al., 2003; Santos et al., 2005a) and is an important indicator of organochalcogen (Nogueira et al., 2003) and xenobiotic toxicity (Santos et al., 2005a).

Catalase and peroxidases are the primary antioxidant defenses against the increase of free radicals (Acharya et al, 2004). Catalase activity in brain of exposed mice had an activity decrease and showed a significant result only at 100mg/kg. In contrast with this, in hepatic tissue, the catalase activity showed a significant increase at all doses tested. We believe that this result was pronounced in a compensatory effect of antioxidants defenses.

Here, we determined the activity of various biochemical parameters that are indicators of oxidative stress. For non-enzymatic antioxidant parameters, TBARS and Vitamin C were measured. TBARS levels are assumed to indicate the extent of lipid peroxidation of a given tissue and are strictly linked to oxidative stress found in the organ. Exposure to compound **1** caused a marked decrease in TBARS production measured in the brain, but not in the liver. These results indicate that compound **1** is not causing a state of oxidative stress in the brain and liver of exposed mice. Vitamin C is always considered a marker of oxidative stress and the reduction of its content may indicate an increase in oxidative stress (de Bem et al., 2006). In the current study was possible to demonstrate that in brain ex vivo experiments, ascorbic acid content was normal and increased only at highest dose of compound **1**. It is possible to infer that this result is in compensation with δ -ALA-D activity results that had a decrease at highest dose.

Based on the antioxidant activity and low toxicity properties presented by (E)-1-(1-(methylthio)-1-(selenophenyl) hept-1-en-2-yl) pyrrolidin-2-one we concluded that this is a promising compound with great antioxidant activity and low toxicity but are necessary more detailed pharmacological studies involving organoselenium compound to extent the possible effects from this compound.

5. Acknowledgement

The financial support by CNPq, CAPES and FAPERGS is gratefully acknowledged. J.B.T.R., C.W.N. and G.Z. are the recipients of CNPq fellowships.

Table 1 - Effects of compound 1 on biochemical parameters

Groups(mg/kg)	AST(U/mL)	ALT(U/mL)	Urea(mg/dl)	Creatinine(mg/dl)
Control	167.05±7.16	114.98±1.74	26.45±4.84	1.17±0.72
Compound 1 100	187.52±4.41	112.03±2.23	26.42±1.13	0.97±0.07
Compound 1 250	153.31±14.25*	114.65±2.88	28.12±2.32	1.75±0.27
Compound 1 500	199.46±11.12	125.42±3.96 [#]	23.86±2.53	2.62±0.67

Data are reported as means ± S.E.M. of five animals.

*One-Way ANOVA/LSD test with [#]p<0.05 vs all groups and *p<0.05 vs 100 and 500mg/kg*

References

- Acharya, U.R., Mishra, M., Mishra, I., 2004. Status of antioxidant defense system in chromium-induced Swiss mice tissues, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 17, 117–123.
- Aebi, U., Chiu, W., Milligan, R., 1995. Role of catalase on antioxidative defenses, *J. Struct. Biol.* 2: 117–118.
- Ali, S.F., LeBel, C.P., Bondy, S.C., 1992. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 13, 637–648.
- Arteel, G.E., Sies, H., 2001. The biochemistry of selenium and glutathione system. *Environ Toxicol Pharmacol.* 10: 153–8.
- Barbosa, N.B.V., Rocha, J.B.T., Zeni, G., Emanuelli, T., Beque, M.C., Braga, A. L., 1998. Effect of organic forms of Selenium on delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney and brain of adult rats. *T. A. A. P.* 149: 243–253.
- Barbosa, N.B.V., Rocha, J.B.T., Wondracek, D.C., Perottoni, J., Zeni, G., Nogueira, C.W. 2006. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: Possible relationship with oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions* 163, 230-238.
- Borges, L.P., Borges, V.C., Moro, A.V., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., Zeni, G., 2005. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. *Toxicology* 210, 1–8.
- de Bem, A.F., Portella, R.L., Perottoni, J., Becker, E., Bohrer, B., Paixão, M.W., Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2006. Changes in biochemical

parameters in rabbits blood after oral exposure to diphenyl diselenide for long periods. *Chemico-Biological Interactions* 162, 1-10.

Farina, M., Brandão, R., Lara, F.S., Soares, F.A.A., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., 2003. Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of D-aminolevulinate dehydratase from mouse liver, kidney and brain. *Toxicology Letters* 139, 55–66.

Fernandez-Cuartero, B., Rebollar, J.L., Batlle, A., Salamanca, R.E., 1999. Delta aminolevulinate dehydratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 31, 479–488.

Flohé, L., Gunzler, W.A., Schock, H.H., 1973. Glutathione peroxidase: a selenium enzyme. *FEBS Letters*. 32, 132-134.

Ghislene, G., Porciúncula, L.O., Cimarosti, H., Rocha, J.B.T., Salbego, C.G., Souza, D.O., 2003. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. *Brain Research* 986, 196–199.

Iqbal, M., Rezazadeh, H., Ansar, S., Athar, M., 1998. Alphatocopherol (vitamin-E) ameliorates ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-dependent renal proliferative response and toxicity: diminution of oxidative stress. *Hum. Exp. Toxicol.* 17 (3), 163 - 171.

Imai, H., Graham, D.I., Masayasu, H., Macrae, I.M., 2003. Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. *Free Radical Biology and Medicine* 34, 56–63.

- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice, *Pharmacol. Toxicol.* 3: 119–127.
- Jaffe, M.Z., 1986. Methods determining creatinine. *Physiol. Chem.* 10: 39–40.
- Kaharaman, A., Erkasap, N., Koken, T., Serteser, M., Aktepe, F., Erkasap, S., 2003. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology.* 183: 133–142.
- Kaharaman, A., Erkasap, N., Koken, T., Serteser, M., Aktepe, F., Erkasap, S., 2003. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology* 183, 133–142.
- Kondoh, S., Nagasawa, S., Kawanishi, M., Yamaguchi, K., Kajimoto, S., Ohta, T., 1999. Effects of ebselen on cerebral ischemia and reperfusion evaluated by microdialysis. *Neurological Research* 21, 682–686.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randell, R.J., 1951. Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
- Maciel, E.N., Bolzan, R.C., Braga, A., Rocha, J.B.T., 2000. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney and brain of mice. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14: 310–319.
- Mackay, E.M., Mackay, L.L., 1927. Methods determining urea. *J. Clin. Invest.* 4: 295–296.
- Meotti, F.C., Borges, V.C., Zeni, J.B.T., Nogueira, C.W., 2003. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen for rats and mice. *Toxicology Letters* 143: 9–16.

- Meotti, F.C., Stangerlin, E.C., Zeni, G., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2004. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environmental Research* 94, 276–282.
- Meredith, P.A., Moore, M.R., Goldberg, A., 1979. Erythrocyte ALA dehydratase activity and blood protoporphyrin concentrations as indices of lead exposure and altered haem biosynthesis. *Clin. Sci. Mol. Med.* 56, 61–69.
- Moro A.V., Nogueira C.W., Barbosa N.B.V., Menezes P.H., Rocha J.B.T., Zeni G. 2005. Highly stereoselective one-pot producers to prepare bis- and tris chalcogenide alkenes via addition of disulfides and diselenides to terminal alkynes. *J. Org. Chem.*70: 5257–68.
- Nogueira, C.W., Rotta, L.N., Perry, M.L., Perry, M.L., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Research* 906, 157–163.
- Nogueira, C.W., Borges, V.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003. Organochalcogens effects on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. *Toxicology* 191: 169–178.
- Nogueira C.W., Zeni G., Rocha J.B.T. 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: pharmacology and toxicology. *Chem. Rev.* 104: 6255–86.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351–358.
- Pappas, J.B., Ahlquist, J.T., Allen, E.M., Banner, W., Jr., 1995. Oral dimercaptosuccinic acid and ongoing exposure to lead: effects on heme synthesis and lead distribution in a rat model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133, 121-129.

- Paulmier, C., 1986. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier C. Selenium reagents and intermediates in organic synthesis. 1 ed. Pergamon Press, Oxford 25-51.
- Reitman, S., Frankel, S., 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *A. J. Clin. Path.* 28: 56–63.
- Ren X, Yang L, Liu J, Su D, You D, Liu C., 2001. A novel glutathione peroxidase mimic with antioxidant activity. *Arch Biochem Biophys.*, 25: 250.
- Rossato, J.I., Zeni, G., Mello, C.F., Rubin, M.A., Rocha, J.B.T., 2002a. Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations produced by intrastriatal quinolinic acid administration in the rat. *Neuroscience Letters* 318, 137–140.
- Rossato, J.I., Ketzer, L.A., Centuriao, F.B., Silva, S.J.N., Ludtke, D.S., Zeni, G., Braga, A.L., Rubin, M.A., Rocha, J.B.T., 2002b. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochemical Research* 27, 297–303.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., Hoestra, W.G., 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 558-560.
- Saito I., Asano T., Sano K., Takakura K., Abe H., Yoshimoto T., 1998. Neuroprotective effect of an antioxidant, Ebselen, in patients with delayed neurobiological deficits after aneurismal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 42: 269–77.

- Santos, F.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Weis, S.N., Fachinetto, J.M., Favero, A.M., Nogueira, C.W., 2005a. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chemical Biological Interactions* 151, 159–165.
- Santos, F.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nascimento, P.C.D., Marques, M.S., Nogueira, C.W., 2005b. Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. *Food and Chemical Toxicology* 43, 1723–1730.
- Sassa, S., 1982. Delta aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28: 133–145.
- Sies H., 1993. Ebslen, a selenoorganic compounds as glutathione peroxidase mimic. *Free Radic Biol Med.* 14: 313–23.
- Tanaka-Kagawa, T., Suzuki, M., Naganuma, A., Yamanaka, N., Imura, N., 1998. Strain difference in sensitivity of mice to renal toxicity of inorganic mercury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 335 - 341.
- Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, K., Gregolin, C., 1982. Purification of pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxidase. *Biochemical Biophysics Acta* 710, 197-211.
- Wilson, S.R., Zucker, P.A., Huang, R.R.C, Spector, A., 1989. Development of synthetic compound with glutathione peroxidase activity. *Journal American Chemical Society* 111, 5936–5939.

Yamagushi T., Sano K., Takakura K., Saito I., Shinohara Y., Asano T., 1998.

Ebslen in acute ischemic stroke: a placebo controlled, double-blind clinical trial. *Stroke*. 29: 12–7.

Wilson, S.R., Zucker, P.A., Huang, R.R.C, Spector, A., 1989. Development of synthetic compound with glutathione peroxidase activity. *Journal American Chemical Society* 111, 5936–5939.

Zasso, F.B., Gonçalves, C.E.P., Jung, E.A.C., Araldi, D., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005. On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide. *Environmental Toxicology Pharmacology* 19, 283–289.

Legends for Figures

Figure 1 – Structure of (*E*)-1-(1-(methylthio)-1-(selenopheny) hept-1-en-2-yl) pyrrolidin-2-one.

Figure 2 - Structure of diphenyl diselenide

Figure 3 – In vitro effects of compound **1** on TBARS production in rat **A)** brain; **B)** liver. Animals were killed by decapitation and whole liver and brain tissues were rapidly homogenized in 50 mM Tris–HCl, pH 7.5 (1:10, w/v) and centrifuged at 4000×g at 4°C for 10 minutes to yield a low-speed supernatant fraction (S1). An aliquot of 200 µl of S1 was added to the reaction mixture containing: 10 µM FeCl₂ and compound **1** at different concentrations (50-500µM). Data are reported as means ± S.E.M of five independent experiments. *One-Way/ANOVA LSD test and #p<0.05 as compared to induced and DMSO groups.*

Figure 4 – In vitro effects of compound **1** on reactive species in rat **A)** brain; **B)** liver. The samples were homogenized (1:10, w/v) in 10 mM Tris–HCl (pH 7.4) and incubated with 10 µl of dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; 10uM) in the presence or the absence of a prooxidant (Fe²⁺/malonate; 0.5uM/100uM) and compound **1** (1–200 µM). The reactive species levels were determined by a spectrofluorimetric method, using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. Data are reported as means ± S.E.M of five independent experiments. *One-Way/ANOVA LSD test and #p<0.05 as compared to induced and DMSO groups, *p<0.05 as compared with induced.*

Figure 5 – Dose–response of animal’s survival. Mice received a single dose of compound **1** by oral route. Data are reported as mean of animals/group.

Figure 6 - Effect of compound **1** on δ -ALAD activity in the brain of experimental mice. Data are reported as mean \pm S.E.M. *One-Way ANOVA/LSD test with * $p < 0.05$ vs control, # $p < 0.05$ vs 100 and 250mg/kg and + $p < 0.05$ vs 100mg/kg.*

Figure 7 - Effects of compound **1** on δ -ALAD activity in the liver of experimental mice. Data are reported as mean \pm S.E.M. *One-Way ANOVA/LSD test with * $p < 0.001$ vs all groups.*

Figure 8 - Effects of compound **1** on catalase enzyme activity in both, brain and liver in experimental mice. Data are reported as mean \pm S.E.M. *One-Way ANOVA/LSD test with # $p < 0.05$ vs 500 mg/kg and * $p < 0.05$ vs control.*

Figure 9 - Effects of the compound **1** on lipid peroxidation (TBARS) in both, brain and liver of the LD₅₀ experimental mice. Data are reported as means \pm S.E.M. *One-Way ANOVA/LSD test with * $p < 0.01$ vs control and # $p < 0.05$ vs 500mg/kg.*

Figure 10 - Effects of the compound **1** on ascorbic acid content in both, brain and liver of the LD₅₀ experimental mice. Data are reported as means \pm S.E.M. *One-Way/ANOVA LSD test with * $p < 0.006$ vs control and # $p < 0.008$ vs 500mg/kg.*

Figure 1

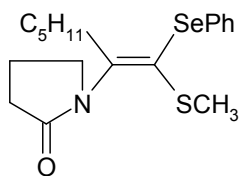


Figure 2

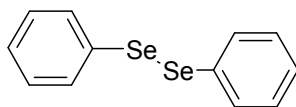


Figure 3A

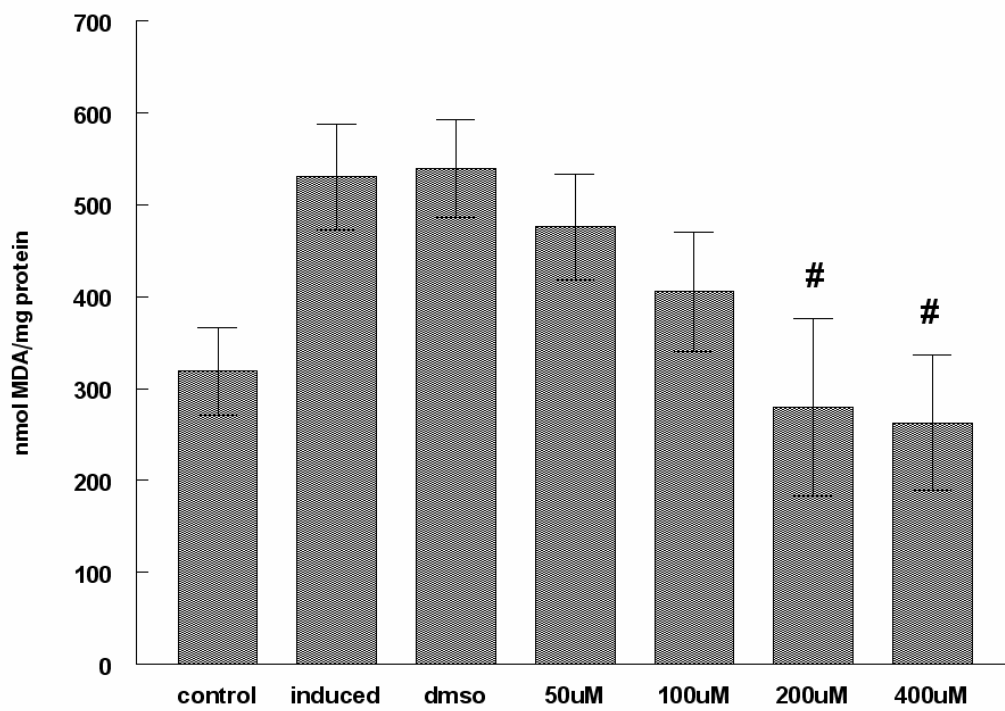


Figure 3B

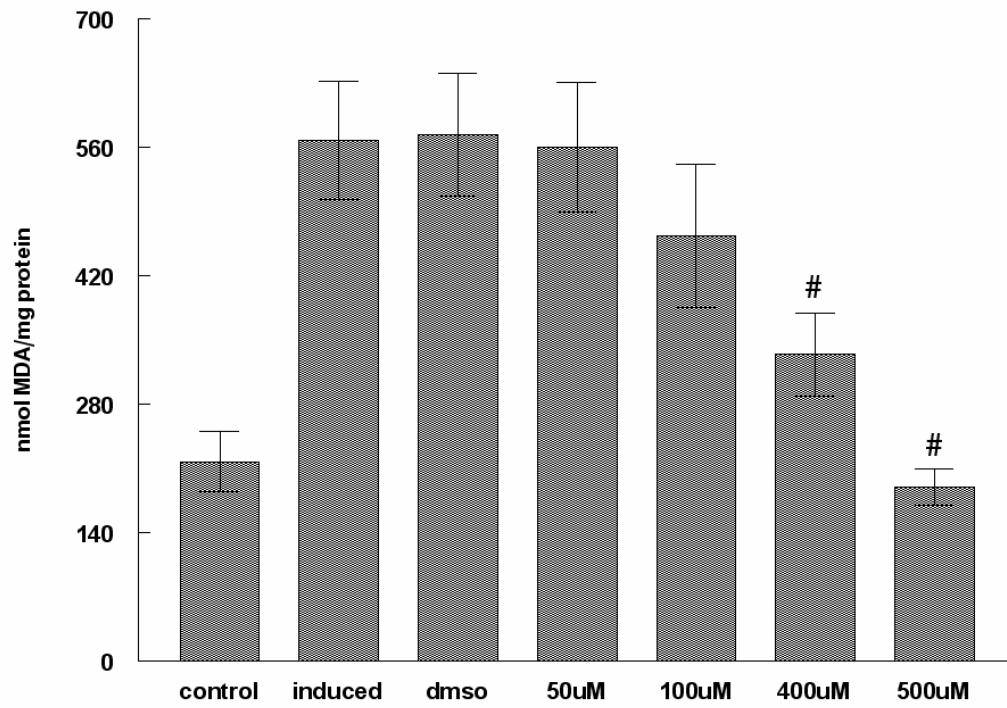


Figure 4A

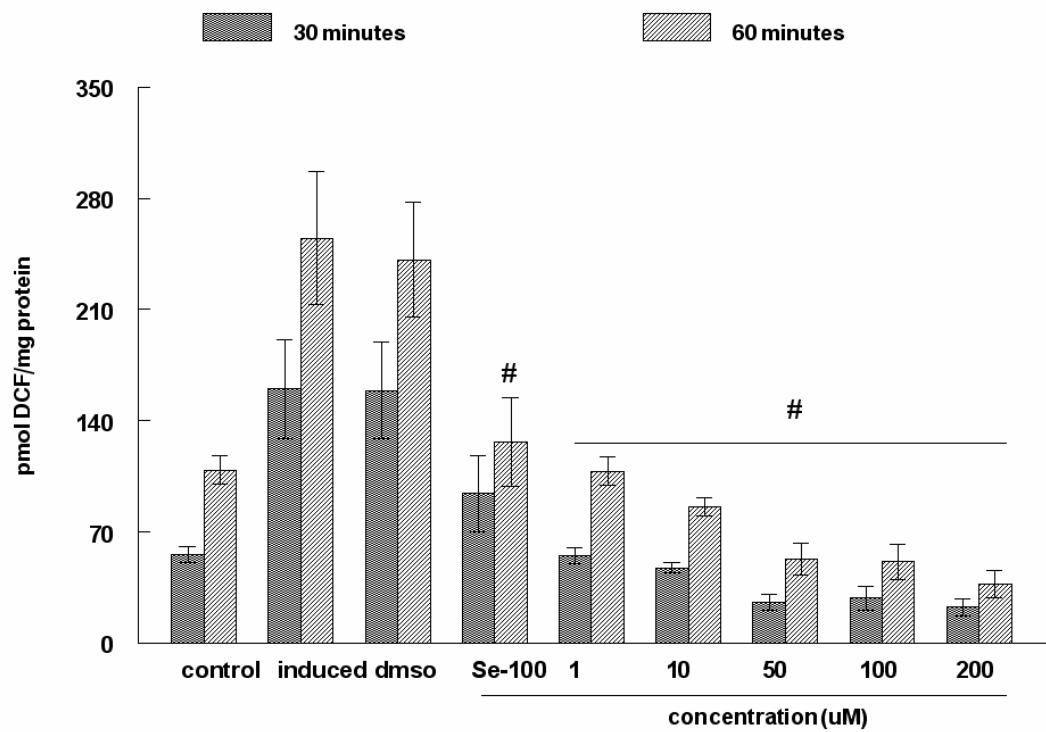


Figure 4B

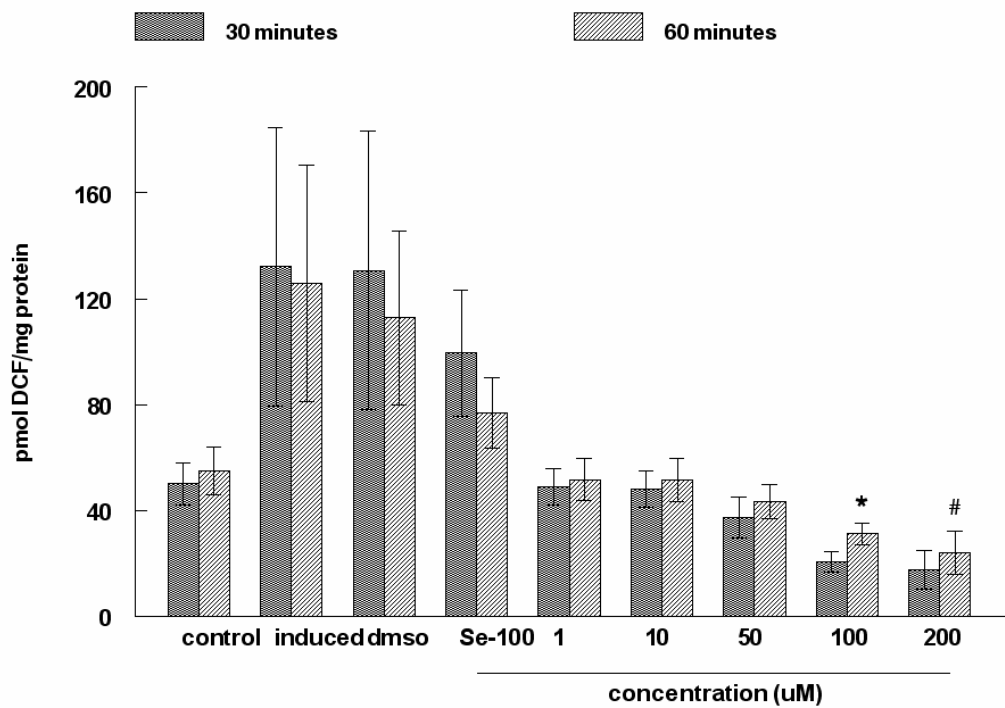


Figure 5

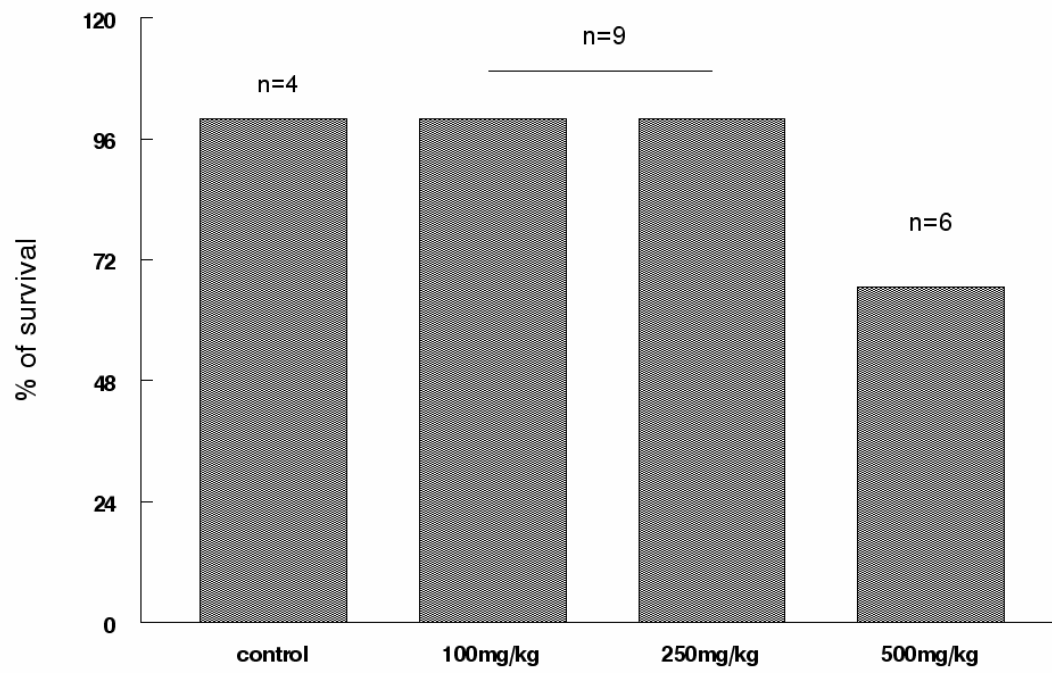


Figure 6

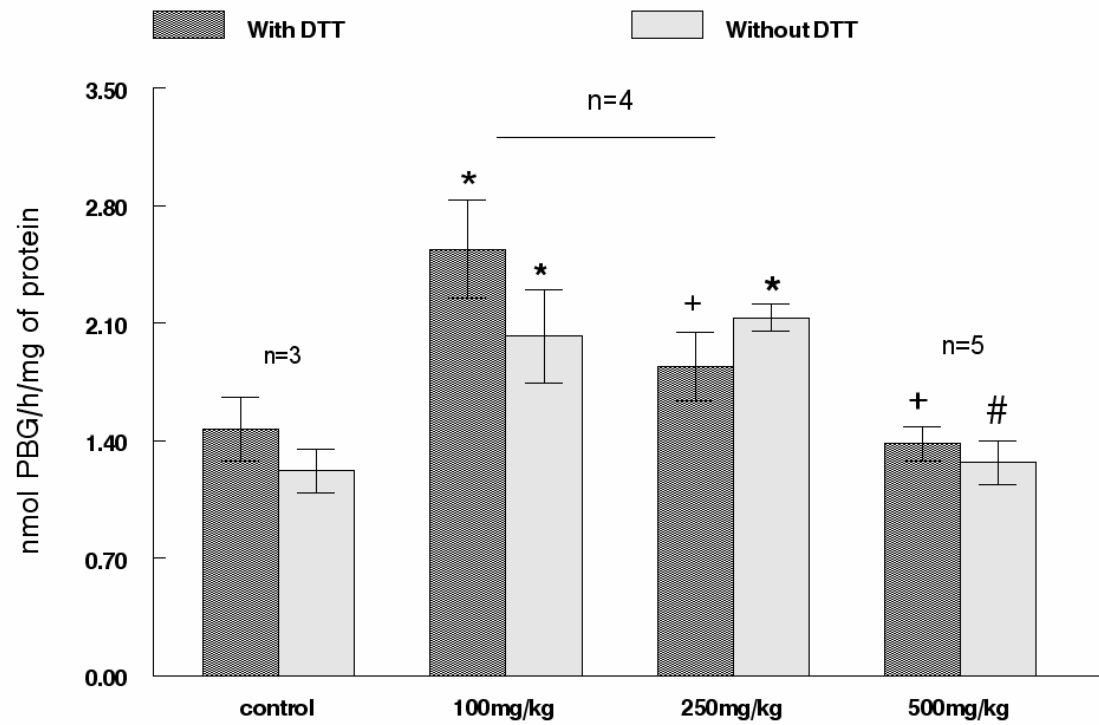


Figure 7

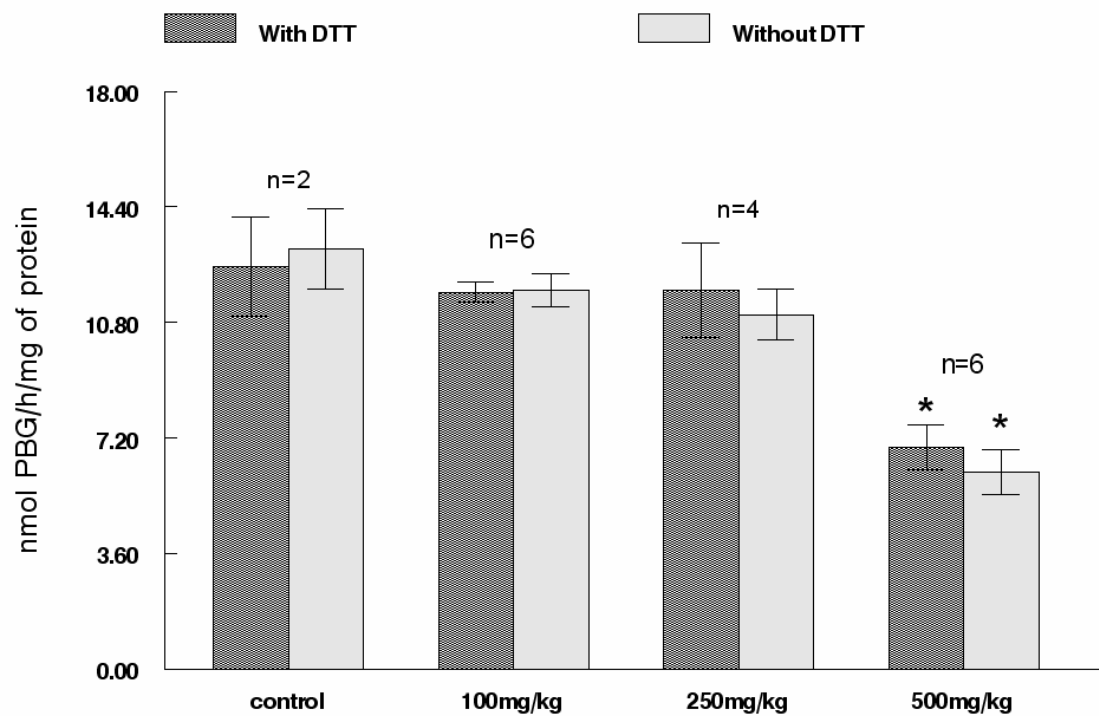


Figure 8

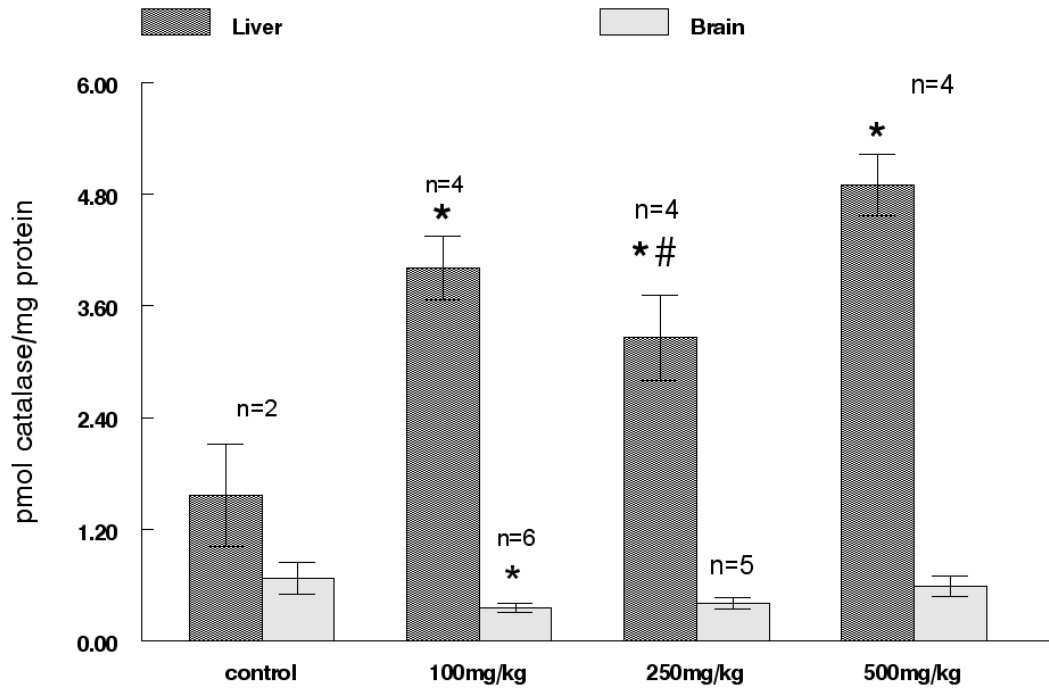


Figure 9

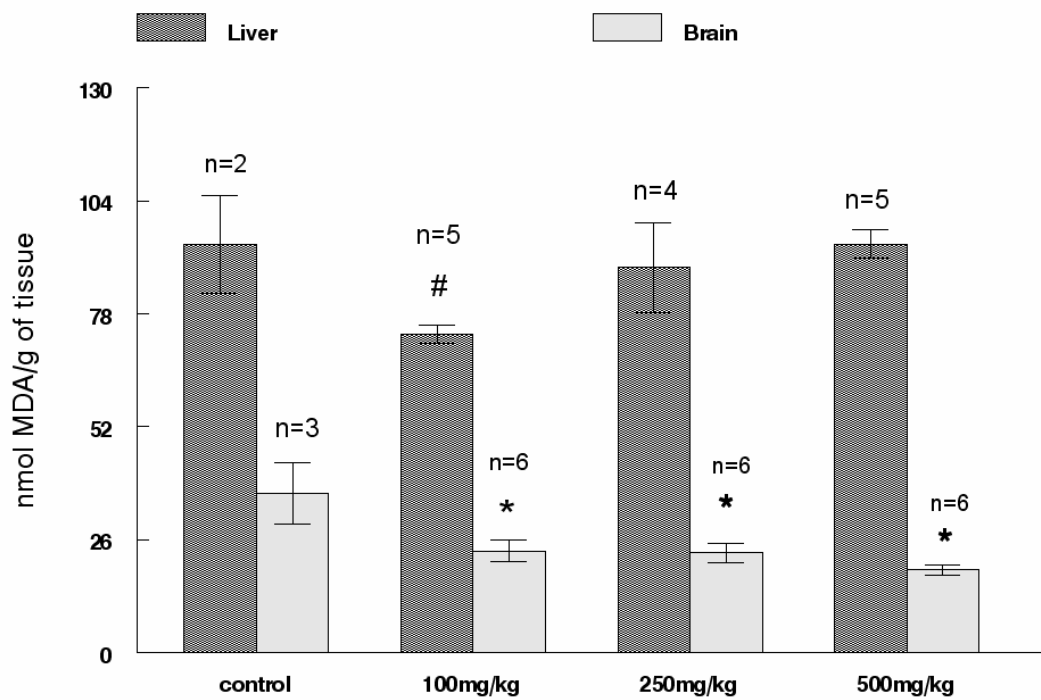
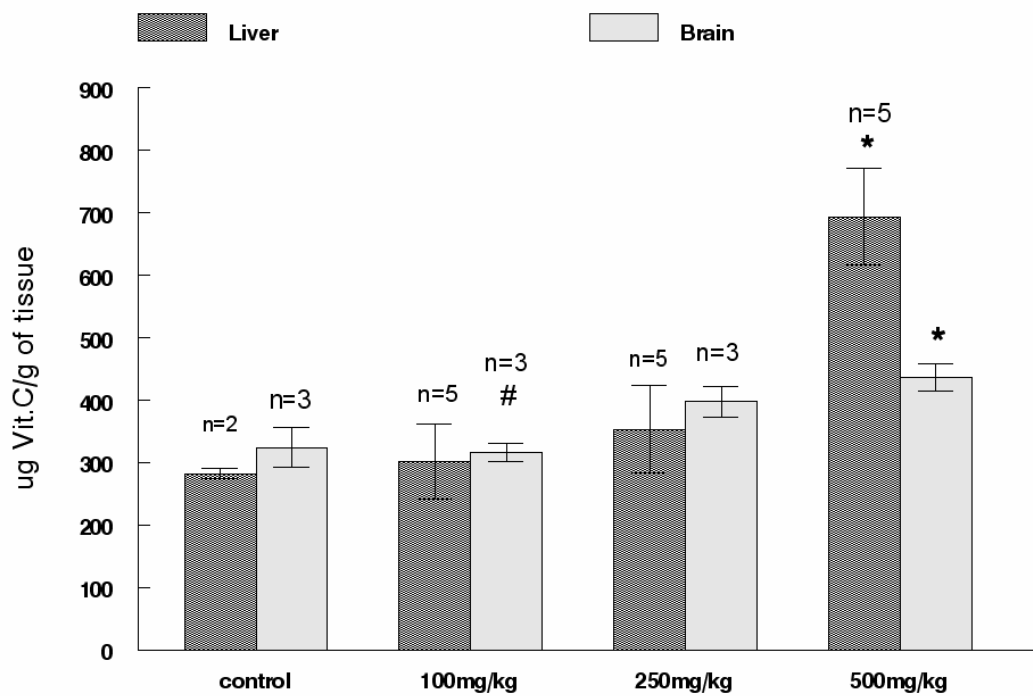


Figure 10



5. DISCUSSÃO

Esse estudo demonstrou que o composto E-1,1-metiltio-selenofenil-2-pirrolidinona-hepteno tem uma potente atividade antioxidante *in vitro*, inclusive sendo maior do que o disseleneto de difenila que é um composto orgânico de selênio bastante estudado e com inúmeras atividades comprovadas, bem como apresentou ser um composto com baixa toxicidade para camundongos.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento significativo na concentração de espécies oxidantes intracelulares, entre elas espécies reativas de oxigênio (ROS) e simultaneamente está acompanhada pela perda da capacidade das defesas antioxidantes endógenas (Arteel and Sies, 2001). As espécies reativas de oxigênio (ROS) provocam severas mudanças a nível celular, levando essas à morte devido a sua extrema reatividade. Essas espécies reativas atacam os constituintes celulares essenciais, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, levando a formação de compostos tóxicos (Kaharaman et al., 2003). Várias doenças e processos degenerativos podem ser associados com a superprodução de espécies reativas de oxigênio incluindo nessas; inflamações isquemia cerebral, mutagêneses, câncer, demência e envelhecimento (Ren et al., 2001).

Nossos experimentos *in vitro* utilizando ratos, mostraram uma potente atividade antioxidante do composto **1** apresentando esse uma redução dependente da concentração na peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} medidos pela produção de TBARS bem como na geração de espécies reativas causadas pelo Fe^{2+} /malonato na oxidação fluorimétrica da diclorofluorisceína diacetato.

A dose letal estabelecida para o composto **1** ficou acima de 500mg/kg pois nessa dose somente 33% dos animais morreram. Nossos resultados estão em sintonia com a literatura a qual relata que o disseleneto de difenila apresenta atividade tipo-tiol peroxidase bem como outras propriedades antioxidantes (Wilson et al., 1989; Rossato et al., 2002a; Meotti et al. 2004; Santos et al., 2005; Barbosa et al. 2006). Além disso, o composto disseleneto de difenila apresenta um papel protetor em diversos modelos associados com a superprodução de radicais livres (Rossato et al., 2002b; Ghislene et al., 2003; Borges et al., 2005; Barbosa et al., 2006). Entretanto o mecanismo molecular envolvendo a toxicidade do Se ainda não está completamente entendido; à cerca de 60 anos atrás Painter propôs que a toxicidade do Se poderia estar relacionada com a oxidação de grupos tióis biologicamente importantes (Painter, 1941). Mais recentemente, Seko et al. (1989) sugeriram que o selenito reage com GSH formando superóxidos reativos ($O_2^{\cdot-}$). Essa observação foi estendida por Spallholz (1994) que mostrou que outros tióis reagem com selenito e selenocistina produzindo superóxido e hidroperóxidos. De acordo com esses autores, a toxicidade do Se pode ser manifestada agudamente ou cronicamente quando os danos excederem as defesas antioxidantes.

Numerosos estudos têm relatado que um aumento dos níveis séricos de uréia e de creatinina são indicativos de injúrias renais (Iqbal et al., 1998; Tanaka-Kagawa et al., 1998). De maneira geral, o aumento dos níveis de uréia estão relacionados com lesões renais devido à solubilidade dessa substância em água podendo ficar acumulada no plasma quando os rins não conseguirem mais

eliminar o seu excesso. O composto de selênio, desseleneto de difenila, não apresenta alterações nas dosagens de uréia e creatinina segundo Meotti et al. 2003. De acordo com esses dados, nossos resultados (Tabela 1) demonstram que o composto **1** não foi capaz de alterar esses parâmetros bioquímicos, indicando que o rim não é um órgão alvo para esse composto orgânico de selênio.

A δ -ALA-D é uma enzima sulfidrílica (Bevan et al., 1980) que pode ser inibida por agentes bloqueadores de grupos sulfidrílicos. A sua inibição pode prejudicar a rota biossintética do heme, resultando em conseqüências patológicas (Sassa et al., 1989; Goering, 1993). E também pode levar a um acúmulo do substrato ALA no sangue, com conseqüente aumento na excreção urinária do mesmo. O acúmulo de ALA pode estar relacionado com a superprodução de espécies reativas de oxigênio (Pereira et al., 1992; Bechara et al., 1993). Nesse trabalho quando administrado na maior dose, o composto **1** inibiu a atividade da δ -ALA-D, sugerindo que nessa dose o fígado seja um órgão alvo desse composto. Já para o tecido cerebral, nessa mesma dose não foi possível detectar diferenças significantes na atividade dessa enzima em relação ao grupo controle. Esse resultado para o fígado está de acordo com a literatura que indica que compostos organocalcogênios quando administrados em altas concentrações catalisam a oxidação de grupos tióis gerando radicais livres (Meotti et al., 2003; Borges et al., 2005).

Mecanismos endógenos são os meios de defesa do organismo humano em proteger-se frente a agentes invasores, esses mecanismos podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. A catalase (CAT) é a mais eficiente das enzimas de defesa

conhecidas, tanto que ela não pode ser saturada pelo peróxido de hidrogênio (Lledías et al., 1998). A catalase reage com o peróxido de hidrogênio formando água e oxigênio molecular. Em homogenatos de cérebros de camundongos, constatamos que a atividade da catalase teve um leve decréscimo e apresentou um resultado significativo somente em 100mg/kg. Em contraste a isso, no tecido hepático a atividade da catalase aumentou significativamente em todas as doses do composto **1** administradas.

Entre os parâmetros antioxidantes não enzimáticos testados, demos ênfase para a medida de TBARS e Vitamina C. Os níveis aumentados de TBARS estão relacionados com a peroxidação lipídica e estreitamente ligados à formação de espécies reativas de oxigênio encontradas no órgão. Os nossos resultados indicam que o composto **1** não apresenta um estado de estresse oxidativo tanto em cérebro quanto em fígado de camundongos, uma vez que os níveis de TBARS diminuíram. Esses resultados estão de acordo com os experimentos realizados *in vitro* nesse mesmo trabalho.

A Vitamina C é considerada um marcador de estresse oxidativo e a redução do seu conteúdo pode indicar um aumento do estresse oxidativo (de Bem et al., 2006). Nesse trabalho foi possível constatar que nos tecidos cerebral e hepático houve um aumento dos níveis de ácido ascórbico na maior dose do composto **1**. Com isso, é possível dizer que esse resultado está em compensatório estado com a atividade da enzima δ -ALA-D onde ocorreu um decréscimo na sua atividade na maior dose testada.

Baseados nesses resultados, podemos ressaltar a potente atividade antioxidante apresentada pelo composto **1** assim como a sua baixa toxicidade.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- O composto **1** apresentou uma boa atividade antioxidante em cérebro e fígado de ratos.

- O composto **1** foi efetivo pois impediu a formação de espécies reativas pelo método de oxidação fluorimétrica da diclorofluoresceína diacetato de maneira dependente da concentração, tanto em fígado e cérebro de ratos, e com uma potência maior do que o disseleneto de difenila.

- Na maior dose testada o composto **1** é hepatotóxico (medido pela ALT e AST) e não parece apresentar nefrototoxicidade (medido pela uréia e creatinina).

- A atividade da δ -ALA-D do cérebro de camundongos foi inibida pelo composto **1** somente em 500mg/kg quando comparada com as outras doses (100 e 250mg/kg). E ocorreu também inibição da atividade da enzima δ -ALA-D hepática em 500mg/kg, em relação ao controle e as outras duas doses.

- O composto **1** levou a uma diminuição da atividade da catalase em cérebro de camundongos, já para o tecido hepático houve um aumento da atividade da catalase para todas as doses testadas.

- Constatamos que o composto **1** diminuiu a peroxidação lipídica em cérebro de camundongos mas não se mostrou eficiente no tecido hepático, pois não houve alterações no níveis de TBARS hepático.

- O conteúdo de vitamina C mostrou-se aumentado pelo composto **1** somente na maior dose (500mg/kg) tanto em cérebro quanto em fígado de camundongos.

7. PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- Realizar mais estudos *in vitro*, visando elucidar a atividade antioxidante do composto **1** em diferentes tecidos de ratos e camundongos;

- Realizar estudos sub-crônicos *in vivo* com o objetivo de verificar a toxicidade do composto **1** comparando com o disseleneto de difenila administrado de forma intraperitoneal em camundongos;

- Investigar se outras propriedades farmacológicas (anti-inflamatória, neuroprotetora e antinociceptiva), já descritas para os outros compostos, podem também serem aplicadas para o composto **1**;

- Testar os mesmos compostos em: concentrações, via de administração e tempo de tratamento diferentes, afim de comparar a efetividade destes e estabelecer uma relação dose/resposta;

- Investigar se o composto **1** apresenta regulação de algum mecanismo de expressão gênica, como reparo celular ou cascata apoptótica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARCÓN, M.N.; MARTÍNEZ, M.C.L. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **The Sci Total Environm** 249: 347-371, 2000.

AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLAASEN, C. D. - Casareth and Doull's Toxicology- The basic science of poison. 5º ed., New York: Pergamon Press, 1996.

ARMSTRONG, A. M., CHESTNUTT, J. E., GORMLEY, M. J., YOUNG FREE, I. S. The effect of dietary treatment on lipid peroxidation and antioxidant status in newly diagnosed noninsulin dependent diabetes. **Radic. Biol. Med.** 21, 719-726, 1996.

ARTEEL, G.E. and SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environ.Toxicol.Pharmacol.** 10, 153-158, 2001.

BANHEGYI, G.; BRAUN, L.; CSALA, M.; PUSKÁS, F.; MANDL, J. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. **Free Radic Biol Med** 23: 793-803., 1997.

BARBOSA, N.B.V., ROCHA, J.B.T., WONDRACEK, D.C., PEROTTONI, J., ZENI, G., NOGUEIRA, C.W., Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: Possible relationship with oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions** 163, 230-238., 2006.

BARBOSA, N.B.V., ROCHA, J.B.T., ZENI, G., EMANUELLI, T., BEQUE, M.C., BRAGA, A. L., Effect of organic forms of Selenium on delta-

- aminolevulinatase dehydratase from liver, kidney and brain of adult rats. **T. A. A. P.** 149: 243–253., 1998.
- BARNARD, G.F.; ITOH, R.; HOHBERGER, L.H.; SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase – Possible role of essential thiol groups. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 8965-8974, 1977.
- BARREIRO, O.L.C. 5-Aminolevulinatase hydro-lyase from yeast. Isolation and purification. **Biochim. Biophys. Acta**, 139, 479-486, 1967.
- BECHARA, E.J.H., MEDEIROS, M.H.G., MONTEIRO, H.P., HERMES-LIMA, M., PEREIRA, B., DEMASI, M., COSTA, C.A., ABDALL, D.S.P., ONUKI, J., WENDEL, C.M.A., MASCI, P.D. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Quim. Nova**, 16, 385-392, 1993.
- BECKER, D.M., VILJOEN, J.D., KRAMER, S. The inhibition of red cell and brain ATPase by δ -aminolevulinic acid. **Biochem. Biophys. Acta**, 255, 26-34, 1971.
- BEVAN, D. R., BODLAENDER, P., SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn^{2+} for enzyme activity. **J. Biol. Chem.**, 255, n. 5, 2030-2035, 1980.
- BOESE, Q.F., SPANO, A.J., LI, J., TIMKO, M.P. δ -Aminolevulinic acid dehydratase in pea (*Pisum sativum* L.). Identification of an unusual metal-binding domain in the plant enzyme. **J. Biol. Chem.**, 266, 17060-17066, 1991.
- BORGES, V.C. NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Organochalcogens affect the glutamatergic neurotransmission in human platelets. **Neurochem. Res.**, 29, 1505-9, 2004.

- BORGES, L.P., BORGES, V.C., MORO, A.V., NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B.T., ZENI, G., Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology** 210, 1–8., 2005.
- BORGES, L.P., NOGUEIRA, C.W. ROCHA, J.B.T., ZENI, G. Acute liver damage induced by 2-Nitropopane in rats: Effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chem. Biol. Interact.**, *in press*, 2006.
- BRAGA, A.L., SILVEIRA, C.C., ZENI, G., SEVERO, W.A., STEFANI, H.A. Synthesis of selenocetals from enol ethers. **J. Chem. Res.**, p. 206-207, 1996.
- BRAGA, A.L.; ZENI, G.; ANDRADE, L.H.; SILVEIRA, C.C. Stereoconservative formation and reativity of α -chalcogen-functionalized vinylithium compounds from bromo-vinyllic chalcogens. **Synlett** v. 5, p. 595-596, 1997.
- BURGER, M. E., FACHINETTO R., ZENI G., ROCHA J. B. T. Ebselen attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat brain **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 81, 608-615, 2005.
- BURK, R.F. Selenium and cancer: meaning of serum levels. **J Nutr** 116: 1584-1586, 1986.
- CALVERT, C.C.; NESHEIM, M.C.; SCOTT, M.L. Effectiveness of selenium in prevention of nutritional muscular dystrophy in the chick. **Proc Soc Exp Biol Med** 109: 16-18, 1962.

CANTOR, A.H.; LANGEVIN, M.L.; NOGUCHI, T.; SCOTT, M.L. Efficacy of selenium compounds and feeds for prevention of pancreatic fibrosis in chicks. **J Nutr** 105: 106-111, 1975.

CANTOR, A.H.; MOORHEAD, P.D.; MUSSER, M.A. Biological availability of selenium in selenium compounds and feed ingredients. In: Selenium in biology and medicine **AVI Publishing, Westport**. 192-202, 1982.

CHAKRABORTY, D.; BHATTACHARYYA, A.; MANJUDAR, K.; CHATTERJEE, K.; et al. Studies on ascorbic acid metabolism in rats under chronic toxicity due to organophosphorus insecticides: effects of supplementation of ascorbic acid in high doses. **J Nutr** 108: 973-980, 1978.

CHATTERJEE, G.C.; RUDRA PAL, D. Metabolism of L-ascorbic acid in rats under in vivo administration of mercury: effect of L-ascorbic acid supplementation. **Int J Vit. Nutr Res** 45: 284-292, 1975.

CHEN, A. and NEILANDS, J.B. Zinc, an essential metal ion for beef liver delta-aminolevulinate dehydratase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 55, p. 1060-1063, 1973.

CHEN, A. and NEILANDS, J.B. The delta-aminolevulinate dehydratases: molecular and environmental properties. **Struct. Bonding**, Berlin, 29, 123-169, 1976.

COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann Intern Med** 111: 918-931, 1989.

- COMASSETO, J.V. Vinylic selenides. **J. Organomet Chem.**, v. 253, p. 131-181, 1983.
- COMBS, G. F. AND GRAY, P. G. Chemopreventive Agents: Selenium. **Pharmacol. Ther.**, 79, 179-192, 1998.
- CUTLER, M.G., MOORE, M.R., EWART, F.G. Effects of δ -aminolevulinic acid administration on social behavior in the laboratory mouse. **Psychopharmacolog**, 61, 131-135, 1979.
- de BEM, A.F., PORTELLA, R.L., PEROTTONI, J., BECKER, E., BOHRER, B., PAIXÃO, M.W., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Changes in biochemical parameters in rabbits blood after oral exposure to diphenyl diselenide for long periods. **Chemico-Biological Interactions** 162, 1-10, 2006.
- DENT, A.J., BEYERSMANN, D., BLOCK, C., HASNAIN, S.S. Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinatase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. **Biochemistry**, 29, 7822-7828, 1990.
- DIAZ, A.J.P.; NAVARRO, A.M.; LOPEZ, G.S., LOPEZ, M.C.M. Determination of selenium in fresh fish from southeastern Spain for calculation of daily dietary intake. **J Agric Food Chem** 42: 334-337, 1994.
- DIAZ, A.J.P.; NAVARRO, A.M.; LOPEZ, G.S., LOPEZ, M.C.M. Determination of selenium in cereals, legumes and dry fruits from southeastern Spain for calculation of daily dietary intake. **Sci Total Environ** 100: 183-189, 1996.
- EGGERT, R.G.; PATTERSON, E.; AKERS, W.T.; STOKSTAD, E.L.R. The role of vitamin E and selenium in the nutrition of the pig. **J Anim Sci** 16: 1037, 1957.

EKHOLM, P.; VARO, P.; ASPILA, P.; KOIVISROINEN, P.; SYRJALAQUIST, L.

Transport of feed selenium to different tissues of bulls. **Br J Nutr** 66: 49-55, 1991.

EL-BAYOUMY, K. The role of selenium in cancer prevention In: Cancer prevention,

In: DeVita VT, Hellman S, and Rosenberg SA, (eds), Cancer prevention.

Philadelphia: **J.B. Lippincott Company**, 1-15, 1991.

EMANUELLI, T., ROCHA, J.B.T., PEREIRA, M.E., PORCIUNCULA, L.O.,

MORSCH, V.M., MARTINS, A.F., SOUZA, D.O.G. Effect of mercury chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinate dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. **Pharmacol. Toxicol.**, 79, 136-143, 1996.

EVANS, J.P., WHITEMAN, M., TREDGER, J.M.; HALLIWELL, B. Antioxidant

properties of s-adenosyl-L-methionine: A proposed addition to organ storage fluids. **Free Rad Biol Med** 23: 1002-1008, 1997.

FACHINETTO, R., PIVETTA, L., FARINA, M., PEREIRA, R. P., NOGUEIRA, C. W.,

ROCHA, J. B. T. Effect of ethanol and diphenyl diselenide exposure on the activity of δ -aminolevulinate dehydratase from mouse liver and brain. **Food Chem. Toxicol.**, 00-00, 2006.

FAVERO, A.M., WEIS, S.N., STANGHERLIN, E.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T.,

NOGUEIRA, C.W. Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats. **Reprod. Toxicol.**, 20, 561-8, 2005.

- FINELLI, V.N.; MURHTY, L.; PEIRANO, W.B.; PETERING, H.G. Delta-aminolevulinate dehydratase, a zinc dependent enzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 60, 1418-1424, 1974.
- FLOHE, L.; GUNZLER, W.A.; SCHOCK, H.H. Glutathione peroxidase: A selenium enzyme. **FEBS Lett** 32: 132-134, 1973.
- FLOYD, R.A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **FASEB J** 4: 2587-2597, 1990.
- FOSTER, L.H.; SUMAR, S. Selenium in health and disease: a review. **Crit Rev Food Sci Nutr** 37: 211-228, 1997.
- FOX, M.R.S. Protective effects of ascorbic acid against toxicity of heavy metals. **Ann NY Acad Sci** 258: 144-150, 1975.
- FOSTER, L.H.; SUMAR, S. Selenium in the environment, food and health. **Nutr Food Sci** 5: 17-23, 1995.
- FRANKE, K.W. A new toxicant occurring naturally in certain samples of plants foodstuffs. I. Results obtained in preliminary feeding trials. **J Nutr** 8: 597-608, 1934.
- FUKINO, H.; HIRAI, M.; HSUEH, Y.M. YAMANE, Y. Effect of zinc pretreatment on mercuric chloride-induced lipid peroxidation in the rat kidney. **Toxicol App Pharmacol** 73: 395-401, 1984.

- GHISLENE, G., PORCIÚNCULA, L.O., CIMAROSTI, H., ROCHA, J.B.T., SALBEGO, C.G., SOUZA, D.O. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. **Brain Research** 986, 196–199, 2003.
- GIBSON, K.D., NEUBERGER, A., SCOTT, J.J. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem. J.**, 61, 618-628, 1955.
- GOERING, P.L. Lead–protein interactions as a basis for lead toxicity. **Neurotoxicology**, 14, 45–60, 1993.
- HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. **Biochem Pharm** 49: 1341-1348, 1995.
- HALLIWELL, B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? **Trends Biochem Sci** 24: 255-257, 1999.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Met Enzimol** 186: 1-5, 1990.
- HARTLEY, W.J.; GRANT, A.B. A review of selenium-responsive diseases of New Zealand livestock. **Fed Proc** 20: 679-688, 1961.
- HASSAN, S.; HAKKARAINEN, R.V.; LINDBERG, P.O.; SANKARI, S. Utilization of dietary sodium selenite, barley, oats and meat selenium by the chick. **Zentralbl Veterinar Med** 37: 270-327, 1990.

- IQBAL, M., REZAZADEH, H., ANSAR, S., ATHAR, M. Alphatocopherol (vitamin-E) ameliorates ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-dependent renal proliferative response and toxicity: diminution of oxidative stress. **Hum. Exp. Toxicol.** 17 (3), 163 – 171, 1998.
- JACQUES-SILVA, M.C., NOGUEIRA, C.W., BROCH, L.C., FLORES, E.M., ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and ascorbic changes deposition of selenium and ascorbic in liver and brain of mice. **Pharmacol. Toxicol.** 88, 119-125, 2001.
- JAFFE, E.K. The porphobilinogen synthase catalyzed reaction mechanism. **Bioorg. Chem.**, 32, 316-25, 2004.
- JANSSEN, A.M.; BOSMAN, C.B. SIER, C.F.; GRIFFIOEN, G. et al. SODs in relation to the overall survival of colorectal cancer patients. **Br J Cancer** 78: 1051-1057, 1998.
- JORDAN, P.M.; GORE, M.G.; CHAUDHRY, A.G. Subunit modification of 5-aminolevulinate dehydratase involving cysteine residues. **Biochem. Soc. Trans.**, 4, 762-763, 1976.
- JOURD'HEUIL, D.; MILLS, L.; MILES, A.M.; GRISHAM, M.B. Effect of nitric oxide on hemoprotein-catalyzed oxidative reactions. **Nitric Oxide** 2: 37-42, 1998.
- KAHARAMAN, A., ERKASAP, N., KOKEN, T., SERTESER, M., AKTEPE, F., ERKASAP, S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol- induced gastric lesions. **Toxicology** 183, 133–142, 2003.

KANDA, T., ENGMAN, L., COTGREAVE, I.A., POWIS, G. Novel water-soluble diorganyl tellurides with thiol peroxidase and antioxidant activity. **J. Org. Chem.**, v. 64, p. 8161-8169, 1999.

KESHAN DISEASE RESEARCH GROUP. Epidemiologic studies on the etiologic relationship of selenium and Keshan disease. **Chi Med** 92: 447-482, 1979.

KLAYMAN, D. L. and GÜNTHER, W. H. (eds.). Organic selenium compounds: their chemistry and biology. **New York: John Wiley and sons** 68-157, 1973.

KRISHNA, M.C.; RUSSO, A.; MITCHELL, J.B.; GOLDSTEIN, S. Do nitroxide antioxidants act as scavengers of superoxide or as superoxide dismutase mimics? **J Biol Chem** 271: 26026-26031, 1996.

LANE, H.W.; STRENGTH, R.; JOHNSON, J.; WHITE, M. Effect of chemical form of selenium on tissue glutathione peroxidase activity in developing rats. **J Nutr** 121: 80-86, 1991.

LEIST, M.; MAURER, S.; SCHULTZ, M.; ELSNER, A.; GAWLIK, D.; et al. Cytoprotection against lipid hydroperoxides correlates with increased glutathione peroxidase activities, but not selenium uptake from different selenocompounds. **Biol Trace Elem Res** 68: 159-174. 1999.

LEVANDER, O.A. Considerations in the design of selenium bioavailability studies. **Fed Proc** 1: 1721-1725. 1983.

LEVANDER, O.A.; BURK, R.F. Selenium: In: Modern nutrition in health and disease. **Lea and Febiger. Philadelphia.** 242-252. 1994.

- LLEDÍAS, F.; RANGEL, P.; HANSBERG, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. **J Biol Chem** 273: 10630-10637. 1998.
- LUND, B.O.; MILLER, D.M.; WOODS, J.S. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. **Biochem Pharmacol** 45: 2017-2024. 1993.
- MACIEL, E.N., BOLZAN, R.C., BRAGA, A., ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney and brain of mice. **J. Biochem. Mol. Toxicol.** 14: 310–319, 2000.
- MACIEL, E. N., FLORES, E. M., ROCHA, J. B. T., FOLMER, V. Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 70, 470-476, 2003.
- MATÉS, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicol** 153: 83-104. 2000.
- MAY, J.M.; COBB, C.E.; MENDIRATTA, S.; HILL, K.E.; BURK, R.F. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. **J Biol Chem** 273: 23039-23045. 1998.
- McKENZIE, R.C.; RAFFERTY, T.S.; BECKETT, G.J. Selenium: an essential element for immune function. **Immunol Today** 19: 324-345. 1998.
- MELOV, S.; SCHNEIDER, J.A.; DAY, B.J.; HINERFELD, D.; COSKUN, P. et al. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. **Nat Genet** 18: 159-163. 1998.

MEOTTI, F.C., BORGES, V.C., ZENI, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen for rats and mice. **Toxicology Letters** 143: 9–16, 2003.

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

MORO A.V., NOGUEIRA C.W., BARBOSA N.B.V., MENEZES P.H., ROCHA J.B.T., ZENI G. Highly stereoselective one-pot producers to prepare bis- and tris chalcogenide alkenes via addition of disulfides and diselenides to terminal alkynes. **J. Org. Chem.**70: 5257–68, 2005.

MUTH, O.H.; OLDFIELD, J.E.; REMMERT, L.F.; SCHUBERT, J.R. Effects of selenium and vitamin E on white muscle disease. **Science** 198: 1090. 1958.

NAMIKI, M. Antioxidants/ antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 29: 273-300. 1990.

NAVARRO-ALARCÓN, M E LOPES-MARTINEZ, M. C. Essentiality of selenium in the human body:relationship with different deseases. **Sci. Tot. Environ.**, 249, 347-371, 2000.

NEVE, J. Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases. **J Cardiovasc Risk** 3: 42-47. 1996.

NOGUEIRA, C.W., ROTTA, L.N., PERRY, M.L., SOUZA, D.O., ROCHA, J.B.T.

Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. **Brain Research** 906, 157–163, 2001.

NOGUEIRA, C.W., BORGES, V.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Organochalcogens

effects on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology** 191: 169–178, 2003a.

NOGUEIRA, C. W., QUINHONES, E. B., JUNG, E. A., ZENI, G., ROCHA, J. B. T.

Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflamm. Res.**, 52, 56-63, 2003b.

NOGUEIRA, C.W., MEOTTI, F.C., CURTE, E., PILISSÃO, C., ZENI, G., ROCHA,

J.B.T. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology**, 183, 29-37, 2003c.

NOGUEIRA C.W., ZENI G., ROCHA J.B.T. Organoselenium and organotellurium

compounds: pharmacology and toxicology. **Chem. Rev.** 104: 6255–86., 2004.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by

thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem** 95: 351-358. 1979.

OHLENDORF, H.M. Selenium was a time bomb. **Human Ecol Risk Assessment**

5; 6: 1181-1185. 1999.

OLDFIELD, J. E. The two faces of selenium (historical commentary). **J. Nutr.**, 117,

2002-2008, 1987.

- ORTUÑO, J.; ROS, G.; PERIAGO, M.; MARTINEZ, C.; LOPEZ, G. Selenium bioavailability and methods of evaluation. **Food Sci Technol Intern** 2: 135-150. 1996.
- PAINTER, E, P. The chemistry and toxicity of selenium compounds which special reference to the selenium problem. **Chem. Rev.**, 2, 179-213, 1941.
- PARKES, T.L.; ELIA, A.J. DICKINSON, D.; HILLIKER, A.J. Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. **Nat Genet** 19: 171-174. 1998.
- PARNHAM, M.J. and GRAF, E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. **Prog. Drug Res.**, v. 36, p. 10-47, 1991.
- PAULMIER, C. Selenium reagents and intermediates. In: **Organic Synthesis**. Oxford: Pergamon, 1986.
- PEREIRA, B., CURI, R., KOKUBUN, E., BECHARA, J.H. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. **J. Appl. Physiol.**, 72, 226-230, 1992.
- PEROTTONI, J., MEOTTI, F. C., FOLMER, V., PIVETTA, L., NOGUEIRA, C. W., ZENI, G., ROCHA J. B. T. Ebselen and diphenyl diselenide do not change the inhibitory effect of lead acetate on delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 19, 239-248, 2005.
- PETRAGNANI, N., RODRIGUES, R., COMASSETO, J.V. **Organomet. Chem.**, p. 114-281, 1976.

- PORCIUNCULA, L. O., ROCHA J. B. T., CIMAROSTI H., VINADE L., GHISLENI G., SALBEGO C. G., Souza D. O. Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immuno-content of inducible nitric oxide synthase. **Neurosci. Lett.**, 346, 101-104, 2003.
- PRUIJN, F.B.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. Interplay between vitamin E, glutathione and dihidrolipoic acid in protection against lipid peroxidation. **Fat Sci Technol** 93; 6: 216-221. 1991.
- REDDI, A. S., BOLLINENI, J. S. Selenium-deficient diet induces renal oxidative stress and injury via TGF-beta 1 in normal and diabetic rats. **Kidney Int.**, 59, 1342-1353, 2001.
- REN X, YANG L, LIU J, SU D, YOU D, LIU C. A novel glutathione peroxidase mimic with antioxidant activity. **Arch Biochem Biophys.**, 25: 250, 2001.
- ROCHA, J.B.T., PEREIRA, M.E., EMANUELLI, T., CHRISTOFARI, R.S., SOUZA, D.O. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. **Toxicology**, 100, 27-37, 1995.
- RODRIGUES, A.L.; BELLINASSO, M.L.; DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus malacatus* Pisces, Pimelodidae. **Com. Biochem. Physiol.**, 94B, 65-69, 1989.
- ROSSATO, J.I., KETZER, L.A., CENTURIAO, F.B., SILVA, S.J.N., LUDTKE, D.S., ZENI, G., BRAGA, A.L., RUBIN, M.A., ROCHA, J.B.T. Antioxidant properties of

- new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. **Neurochemical Research** 27, 297–303. 2002b
- ROSSATO, J.I., ZENI, G., MELLO, C.F., RUBIN, M.A., ROCHA, J.B.T. Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations produced by intrastriatal quinolinic acid administration in the rat. **Neuroscience Letters** 318, 137–140., 2002a.
- ROTRUCK, J.T.; POPE, A.L.; GANTHER, H.E.; SWANSON, A.B.; et al. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science** 179: 558-560. 1973.
- SALONEN, J. T.; ALFTHAN, G.; PIKKARAINEN, J. K. et al. Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched-pair longitudinal study; **Lancet**, 2, 175-179, 1982.
- SANTOS, F.W., ORO, T., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NASCIMENTO, P.C., NOGUEIRA, C.W. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. **Toxicol. Lett.**, 152, 255–263, 2004.
- SANTOS, F.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NASCIMENTO, P.C.D., MARQUES, M.S., NOGUEIRA, C.W. Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. **Food and Chemical Toxicology** 43, 1723–1730., 2005.

- SASSA, S., FUJITA, H., KAPPAS, A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: Kotyk, A. Skoda, J. Paces, V., Kostka, V. (Eds.), **Highlights of Modern Biochemistry**, VSP, Utrecht, 1, 329-338, 1989.
- SAVEGNAGO, L., TREVISAN, M., ALVES, D., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 21, 86–92, 2006.
- SCHAUMBURG, A., SCHNEIDER-POETSH, A.A.W., ECKERSKORN, C. Characterization of placental 5-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D, EC 4.2.1.24) from spinach (*Spinacia oleracea* L.) by sequencing and comparison with non plant ALA-D enzymes. **Z. Naturforsch.**, 45C, 77-84, 1991.
- SCHWARZ, K. A possible site of action for vitamin E in intermediary metabolism. **Amer J Clin Nutr** 9: 71. 1961.
- SEKO, Y., SATIO, Y., KITHARA, J., IMURA, N. Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione in vitro. In: Wendel, **Selenium in Biology and Medicine**. Springer, Berlin Heidelberg, New York, 70-73, 1989.
- SHEN, L.H.; VAN DAEL, P.; DEELSTRA, H. Evaluation of an in vitro method for the estimation of the selenium availability from cow's milk. **Z Lebensm Unters Forsch** 197: 342-345. 1993.
- SHI, B.; SPALLHOLZ, J.E. Bioavailability of selenium from raw and cooked ground beef assessed in selenium deficient Fischer rats. **J Am Coll Nutr** 13: 95-101, 1994.

- SHIBATA, H. and OCHIAI, H. Purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase from radish cotyledons. **Plant Cell Physiol.**, 18, 421-429, 1977.
- SIES, H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. **Free Radic Biol Med** 14: 313-323. 1993.
- SIES, H.; SHAROV, V.S.; KLOTZ, L.O.; BRIVIBA, K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. **J Biol Chem** 272; 44: 27812-27817. 1997.
- SOMMER, R. and BEYERSMANN, D. Zinc and cadmium in 5-aminolevulinic acid dehydratase. Equilibrium, kinetic, and ^{113}Cd -nmr-studies. **J. Inorg. Biochem.**, 20, 131-145, 1984.
- SPALLHOLZ, J. E. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. **Free Rad. Bio.Med.**, 17, 45-69, 1994.
- SPENCER, P. and JORDAN, P.M. Investigation of the nature of the two metal-binding sites in 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. **Biochem. J.**, 300, 373-381, 1994.
- SPENCER, P. and JORDAN, P.M. Characterization of the two 5-aminolevulinic acid binding sites, the A- and P-sites, of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. **Biochem. J.**, 305, 151-158, 1995.
- STADTMAN, T. C. Selenium-dependent enzymes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 49, p. 93-110, 1980.

- STAPLETON, S. R. Selenium: an insulin-mimetic. **Cell. Mol. Life Sci.**, 57, 1874-1879, 2000.
- TAMAI, H., SHIOI, Y., SASSA, T. Purification and characterization of delta-aminolevulinic acid dehydratase from *Chlorella regularis*. **Plant Cell Physiol.**, 20 (2), 435-444, 1979.
- TIMBRELL, J.A. **Principles of biochemical toxicology**. Second edition. Washington DC: Taylor e Francis London, 1991.
- TRELEASE, S.F.; BEATH, O.A. Selenium: its geological occurrence and its biological effects in relation to botany, chemistry, agriculture, nutrition and medicine. **Burlington, VT: The Champlain Printers**. 1949.
- TSEN, C.C.; COLLIER, H.B. Selenite as a relatively weak inhibitor of some sulfhydryl enzyme systems. **Nature**. 183: 1327. 1959.
- TSUKAMOTO, I., YOSHINAGA, T., SANO, S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. **Biochim. Biophys. Acta**, 12, 167-78, 1979.
- URSINI, F.; MAIORINO, M.; VALENTE, M.; FERRI, K.; et al. Purification of pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxidase. **Biochem Biophys Acta** 710: 197-211. 1982.
- WILBER, C. G. Toxicology of selenium. A review clinical. **Toxicology**, 17, 171-230, 1980.

WILSON, S.R., ZUCKER, P.A., HUANG, R.R.C, SPECTOR, A. Development of synthetic compound with glutathione peroxidase activity. **Journal American Chemical Society** 111, 5936–5939., 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Environmental Health Criteria 58: Selenium. World Health Organization, Finland. 1987.

YAN, L.; SPALLHOLZ, J.E. Generation of reactive oxygen species from the reaction of selenium compounds with thiols and mammary tumor cells. **Biochem Pharmacol** 45; 2: 429-437. 1993.

YONAHARA, M.; ITOH, E.; OHBAYASHI, Y.; UCHIYAMA, M. Induction of lipid peroxidation in rats by mercuric chloride. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol** 28: 105-112. 1980.

ZASSO, F.B., GONÇALVES, C.E.P., JUNG, E.A.C., ARALDI, D., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide. **Environmental Toxicology Pharmacology** 19, 283–289., 2005.

ZENI, G., BRAGA, A.L., STEFANI, H.A. Palladium catalysed coupling of sp²-Hybridized tellurides. **Acc. Chem. Res.**, 36, 731-738, 2003.

Demais trabalhos realizados durante o Curso de Mestrado

Ineu R.P., Aschner, M., Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T. Diphenyl Diselenide Reverses Gastric Lesions in Rats: Involvement of Oxidative Stress. Artigo submetido à Revista **Food and Chemical Toxicology** e encontra-se com revisores.