

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO  
COMPOSTO SALICILALDEÍDO-4-  
FENILTIOSSEMICARBAZONA (SPTS)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Taiane Piccini Teixeira**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

# **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO COMPOSTO SALICILALDEÍDO-4- FENILTIOSSEMICARBAZONA (SPTS)**

**Taiane Piccini Teixeira**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marli Matiko Anraku de Campos**

**Co-orientador: Ricardo Brandão**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

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

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO COMPOSTO  
SALICILALDEÍDO-4-FENILTIOSSEMICARBAZONA (SPTS)**

Elaborada por  
**Taiane Piccini Teixeira**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Marli Matiko Anraku Campos, Dr<sup>a</sup>.**  
(Presidente/Orientador)

**Simone Pinton, Dr<sup>a</sup>.** (Unipampa – campus Uruguaiana)

**Gustavo Oriane Puntel, Dr.**(UFSM)

Santa Maria, 11 de março de 2015.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais

**Valdemar Teixeira e Jucelaine Teixeira.**

Pelo apoio, dedicação, amor e  
compreensão, compartilho com vocês esta conquista.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus. É Nele que busquei toda paz e força que precisei para encarar as dificuldades que aparecem no meu caminho durante este trajeto.

Aos meus pais Valdemar e Jucelaine, pelo apoio e compreensão em todos os momentos. Obrigado por sempre me apoiarem de forma incondicional e por terem me dado todo amor que precisei para levar de forma mais agradável estes dois anos. Vocês são os melhores pais que alguém pode sonhar, e agradeço a Deus todos os dias por tê-los na minha vida.

Ao professor Ricardo, pela disponibilidade de me co-orientar, pelos ensinamentos e paciência ao longo destes anos. O senhor é um exemplo de sabedoria, simplicidade e coleguismo.

A professora Marli, pela disponibilidade de ser minha orientadora e me auxiliar nesta etapa.

A bizi Lílian, que foi uma colega excepcional. Uma ajuda enorme para enfrentar os dias difíceis, os problemas de percurso, aos dias esgotantes e as minhas loucuras. Você foi incrível, levarei você para sempre no meu coração!

A Michelli e a Paula, que sabem mais do que ninguém da enorme importância delas na minha trajetória. Nunca conseguirei ser suficientemente grata a vocês.

Ao laboratório como um todo, pela disponibilidade em todos os momentos, pelas brincadeiras, pelo coleguismo e por tornarem estes anos mais alegres.

Ao laboratório de Biogenônica, principalmente a professora Ivana da Cruz e a doutoranda Fernanda Barbisan, pelos auxílio nos experimentos e ensinamentos ofertados.

A banca avaliadora, pelo tempo e atenção disponibilizados para avaliar meu trabalho.

Aos meus amigos em geral, a Equipe, as do fundamental, e a aquelas que surgiram durante estes anos. Vocês souberam me distrair nas horas certas e me dar apoio nos momentos difíceis.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade e informações oferecidas.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO COMPOSTO SALICILALDEÍDO-4-FENILTIOSEMICARBAZONA (SPTS)**

AUTORA: TAIANE PICCINI TEIXEIRA

ORIENTADOR: MARLI MATIKO ANRAKU CAMPOS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 11 de março de 2015.

As tiossemicarbazonas são compostos de considerável interesse científico, devido as suas importantes propriedades químicas e biológicas, tais como antitumoral, antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, citotóxica, dentre outras. O composto salicilaldeído-4-feniltiossemicarbazona (SPTS), da classe das tiossemicarbazonas, possui atividades farmacológicas promissoras como atividade antioxidante e antitumoral, deste modo são necessários estudos prévios para avaliar a sua toxicidade. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade *in vitro* do composto SPTS, através do bioensaio da *Artemia salina* com a finalidade de determinar a concentração letal média (CL<sub>50</sub>), atividade da  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D), atividade tiol oxidase e ensaios de viabilidade celular e genotoxicidade. Testes de toxicidade aguda e subaguda do composto SPTS também foram realizados, utilizando como metodologia as diretrizes da Organização para a Coordenação e Desenvolvimento Econômico (OECD diretrizes 423 e 407). Na análise da toxicidade aguda, uma única dose de 300 e, posteriormente, 50 mg/kg de SPTS foi administrada por via subcutânea em ratos machos, para avaliar a dose letal média estimada (DL<sub>50</sub>). No estudo de toxicidade subaguda, o composto SPTS foi administrado por via subcutânea nos animais em doses de 5, 10 e 20 mg/kg/dia durante 14 dias. Parâmetros bioquímicos, de estresse oxidativo e hematológicos foram analisados nos estudos de toxicidade aguda e subaguda, utilizando amostras de sangue, rins, fígado e cérebro. Alterações comportamentais foram analisadas na toxicidade subaguda. Nos resultados obtidos nos experimentos *in vitro*, foi verificada uma CL<sub>50</sub> de 69,11  $\mu$ g/ml, sendo considerado um composto biologicamente ativo, mas não houve efeito tiol oxidase e nem inibição da  $\delta$ -ALA-D. Em relação aos testes de viabilidade celular e genotoxicidade, foi verificado que a concentração de 100  $\mu$ M diminuiu significativamente a viabilidade celular e causou efeitos genotóxicos frente a cultura de células. Em relação a toxicidade aguda, a DL<sub>50</sub> estimada foi de 50-300mg/kg. Além disso, a exposição aguda a 50 mg/kg de SPTS não causou alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, mas causou elevação nos níveis hepáticos de ácido ascórbico. Na avaliação da toxicidade subaguda, entretanto, inúmeras alterações foram observadas, como o aumento na peroxidação lipídica e nos níveis de vitamina C e tióis não-proteicos em diferentes tecidos, bem como alterações nas atividades da glutathione S-transferase e catalase. Também foram observadas alterações comportamentais no teste do *open field*, diminuição no ganho de peso corporal e aumento nos níveis de triglicerídeos. Desta forma, nós concluímos que o composto SPTS apresentou especialmente toxicidade subaguda, uma vez que causou alterações comportamentais, nos parâmetros de estresse oxidativo e no perfil lipídico.

Palavras-chave: tiossemicarbazonas, SPTS, toxicidade.

## ABSTRACT

Master Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### ASSESSMENT OF THE EFFECTS OF COMPOUND TOXICOLOGICAL SALICYLALDEHYDE-4-FENILTIOSEMICARBAZONE (SPTS)

AUTHOR: TAIANE PICCINI TEXEIRA

ADVISOR: MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS

Place and Date of Defense: Santa Maria, March 11<sup>th</sup>, 2015.

The thiosemicarbazone compounds are of considerable scientific interest because of their important biological and chemical properties, such as antitumor, antibacterial, antiviral, antiprotozoal, cytotoxic, among others. The compound salicylaldehyde-4-phenylthiosemicarbazone (SPTS), of the class of thiosemicarbazone, has promising pharmacological activities such as antioxidant and antitumor, thereby previous studies are needed to evaluate its toxicity. Thus, this study aimed to evaluate the toxicity *in vitro* of SPTS compound, through bioassay of *Artemia salina* in order to determine the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>), activity of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase ( $\delta$ -ALA-D), thiol oxidase activity and assays of cell viability and genotoxicity. Acute and subacute toxicity tests of SPTS compound were also performed, using as methodology the Organization's guidelines for Coordination and Economic Development (OECD guidelines 423 and 407). In the analysis of acute toxicity, a single dose of 300 and, thereafter, 50 mg/kg SPTS was administered subcutaneously in rats, to evaluate the estimated mean lethal dose (LD<sub>50</sub>). In the study of subacute toxicity, SPTS compound was administered subcutaneously in animals at doses of 5, 10 and 20 mg/kg/day for 14 days. Biochemical, hematological and oxidative stress parameters were examined in the studies of acute and sub-acute toxicity, using samples of blood, kidney, liver and brain. Behavioral changes were analyzed in the subacute toxicity. In the results obtained *in vitro* experiments, was verified a LC<sub>50</sub> of 69,11  $\mu$ g/ml, being considered a compound active biologically, but there was no thiol oxidase effect or inhibition of  $\delta$ -ALA-D. With respect to cell viability and genotoxicity assays, it was found that the concentration of 100  $\mu$ M significantly decreased cell viability and showed genotoxicity effects against cell culture. With regard to acute toxicity, the estimated LD<sub>50</sub> was of 50-300 mg/kg. Moreover, acute exposure to 50 mg/kg of SPTS did not cause changes in biochemical and hematological parameters, but caused an increase in hepatic levels of ascorbic acid. In the assessment of subacute toxicity, however, numerous changes were observed as an increase in lipid peroxidation and in vitamin C and non-protein thiols levels in different tissues, as well as changes in glutathione S-transferase and catalase activities. We also observed behavioral changes in the open field test, decrease in body weight gain and increased levels of triglycerides. Thus, we conclude that the compound SPTS provided particularly subacute toxicity, since presented behavioural alterations, as well as changes in oxidative stress parameters and in the lipid profile.

Keywords: thiosemicarbazone, SPTS, toxicity

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\delta$ -ALA-D	$\delta$ -aminolevulinatodesidratase
ALT	alaninaaminotransferase
AST	aspartatoaminotransferase
ANOVA	Análise de variância
CAT	Catalase
CL <sub>50</sub>	Concentração letal média
DL <sub>50</sub>	Dose letal média
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EO	Estresse oxidativo
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>FoodandDrugsAdministraion</i>
GPx	Glutationaperoxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GST	Glutaciona S-transferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPO	Lipoperoxidação
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
MDA	Malondialdeído
MTT	93-[4,5dimetiliazol 2-yl]-2,5-brometo difeniltetrazolico)
NPSH	Tióis não proteicos
OECD	<i>Organization for Economic Cooperationand Development</i>
OFT	<i>Open field test</i>
RLO	Radicais livres de oxigênio
S1	Sobrenadante
SPTS	Salicilaldeído-4-feniltiossemicarbazona
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
VIT C	Ácido ascórbico



## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1 - Procedimento de teste com uma dose inicial de 300mg/kg de peso corporal...	19
Figura 2 - Estrutura genérica de semicarbazonas e tiossemicarbazonas.....	22
Figura 3 - Estrutura química do composto SPTS.....	24
Figura 4 - Etapas da peroxidação lipídica (adaptado de HALLIWELL& GUTTERIDGE,1989).....	27

### MANUSCRITO

Figure 1 - Chemical structure of the compound Salicylaldehyde-4-phenylthiosemicarbazone.....	71
Figure 2 - Test procedure with a starting dose of 300mg/kg body weight by Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 423.....	71
Figure 3 - Effects of the compound SPTS in MTT assay.....	72
Figure 4 - Effects of the compound SPTS in dsDNA assay.....	72
Figure 5 - Effects of SPTS on hepatic (A), renal (B) and cerebral (C)GSTactivitiesof rats.....	73
Figure 6 - Effects of SPTS on hepatic (A), renal (B) and cerebral (C)ascorbic acid levelsof rats.....	73
Figure 7 - Effects of SPTS on hepatic (A), renal (B) and cerebral (C) NPSH levels of rats.....	73
Figure 8 - Effects of SPTS on hepatic (A), renal (B) and cerebral (C) lipid peroxidation levels of rats.....	74
Figure 9 - Effects of SPTS on triglycerides levels of rats.....	74
Figure 10 - Effects of SPTS on weight gain body of rats.....	75
Figure 11 - Effects of SPTS on open field (rearings and crossings)of rats.....	75

## **LISTA DE TABELAS**

### **MANUSCRITO**

Table 1 – Effects of SPTS on hematological analysis of rats exposed to SPTS.....	68
--	----

## SUMÁRIO

<b>I REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Estudos de toxicidade.....</b>	<b>11</b>
1.1.1 Toxicidade <i>in vitro</i> .....	11
1.1.2 Toxicidade <i>in vivo</i> .....	14
1.1.2.1 Toxicidade aguda.....	15
1.1.2.2 Toxicidade subaguda.....	17
<b>1.2 Tiossemicarbazonas.....</b>	<b>19</b>
1.2.1 Salicilaldeído-4-feniltiossemicarbazona (SPTS).....	21
<b>1.3 Radicais livres, estresse oxidativo e defesas antioxidantes.....</b>	<b>22</b>
1.3.1 Espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio.....	22
1.3.2 Estresse oxidativo.....	22
1.3.3 Peroxidação lipídica.....	22
1.3.4 Mecanismos de defesa antioxidante.....	24
<b>II OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>2.3 Objetivo geral.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4 Obetivos específicos.....</b>	<b>26</b>
<b>III MANUSCRITO.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Evaluation of <i>in vitro</i>, acute and sub-acute toxicological effects of salicylaldehyde-4-phenylthiosemicarbazone.....</b>	<b>28</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>30</b>
1. Introduction.....	31
2. Material and Methods.....	32
3. Results.....	41
4. Discussion.....	45
References.....	52
<b>IV CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>74</b>

# I REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 Estudos de toxicidade

Testes de toxicidade podem ser definidos como procedimentos nos quais as respostas de organismos-teste são utilizadas para detectar ou avaliar os efeitos adversos ou não de uma ou mais substâncias sobre os sistemas biológicos. Estes testes constituem-se basicamente na exposição de organismos a diferentes condições, as quais tentam simular o ambiente natural, visando assim detectar seus efeitos letais e/ou subletais(LAITANO & MATIAS, 2006).

Os estudos toxicológicos, aplicados em animais de laboratório e sob condições previamente estabelecidas, permitem determinar os possíveis efeitos de substâncias em humanos ou animais expostos às mesmas (OGA, 2008). Os efeitos tóxicos observados no homem encontram-se geralmente, na mesma faixa de concentração daqueles dos animais de laboratório. Soma-se ainda o fato de que a exposição de animais a agentes tóxicos em doses elevadas é um método necessário e válido para a descoberta de possíveis perigos para a espécie humana que é exposta a doses muito menores (KLAASSEN, 2006; OGA, 2008).

A análise de dados toxicológicos de uma substância química permite sua classificação em categorias toxicológicas estabelecidas, seu potencial de letalidade ou toxicidade, além de fornecer também informações a respeito da forma correta e segura de uso, medidas de prevenção e tratamento em caso de intoxicação. Testes de toxicidade aguda avaliam além da letalidade, o potencial tóxico em órgãos específicos, dados sobre a toxicocinética e a relação-dose resposta (VALADARES, 2006).

### 1.1.1 Toxicidade *in vitro*

A finalidade desses ensaios é de substituir os ensaios com animais, ou de poderem servir como prévia de um estudo toxicológico *in vivo*, complementando e melhorando a sensibilidade e especificidade de estudos com animais (FRAZIER, 1992). Estes ensaios geralmente precedem os testes *in vivo* e identificam bem o princípio dos 3Rs, que são a substituição (*replacement*) de experimentos que utilizam animais por outros que não necessitam, a redução (*reduction*) do número de animais e o refinamento (*refinement*) com a diminuição da severidade dos processos (REPETTO, 1995). Os estudos *in vitro* vêm sendo

utilizados com mais frequência, devido ao grande rigor nos laboratórios com o uso de animais devido a questões éticas.

A determinação da atividade da  $\delta$ -aminolevulinatodesidratase ( $\delta$ -ALA-D), é umas das técnicas mais realizadas em experimentos *in vitro*. A  $\delta$ -ALA-D, conhecida como porfobilinogêniosintase, é uma enzima contendo grupos sulfidríla (-SH), que catalisa a condensaçãoassimétrica de duas moléculas de  $\delta$ -aminolevulinato (ácido aminolevulínico,  $\delta$ -ALA) paraproduzir porfobilinogênio, sendo este um precursor da síntese dos tetrapirróis nas células (HEINEMANN et al., 2008).A inibição da  $\delta$ -ALA-D pode prejudicar a rota biossintético do heme, podendo resultar em consequências patológicas (SASSA et al., 1989; GOERING, 1993). Além da insuficiente produção de heme, a inibição da  $\delta$ -ALA-D pode resultar no acúmulo de substrato ALA no sangue, com conseqüente aumento na excreção urinária do mesmo. O acúmulo de ALA está relacionado com a superprodução das espécies reativas de oxigênio (EROs) como OH• (radicalhidroxila), o O<sub>2</sub>•-(ânion superóxido) e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio) (BRITO et al., 2011).

A avaliação da bioatividadedecompostosorgânicos provenientes desíntese tem sido pouco viável em laboratórios tradicionais de química, pois,geralmente, eles não estão adequadamente equipados para a realização de bioensaios utilizando animais ou tecidos e órgão isolados.A necessidade de realizar ensaios com procedimentos simples e rápidos,levouao bioensaio com *Artemia salina*, quepermite a avaliação da toxicidade geral e é, portanto, considerado essencial como ensaio preliminar no estudo denovos compostos com potencial atividade biológica (CAVALCANTE, 2000).O ensaio de letalidade frente à *Artemia salina*, uma espécie de invertebrado marinho (SANCHEZ FORTUN et al., 1995), é uma metodologia *in vitro* extensamente utilizada na linha de pesquisa de compostos químicos e extratos de plantas para avaliar seu potencial tóxico. A utilização da *Artemia* em estudos toxicológicos preliminares deve-se a simplicidade com que pode ser manuseado, pela sua capacidade para formar cistosdormentes,forneendo, desse modo, material biológico que pode ser armazenado durante longos períodos de tempo (superioresa seis meses) sem perda de viabilidade e sem necessidade de se manteremculturas contínuas de organismo-teste (DIAS, 2002; HARTL, 2000; LHULLIER, 2006).

Os bioensaios com *Artemia salina* são realizados por vários métodos (LOPES, 2002).Este ensaio permite determinar a toxicidade de determinada substância por meio da estimativa da concentração letal média (CL<sub>50</sub>), que é definida como a concentração de uma

substância química que provoca a morte de 50% de um grupo de animais expostos, em um período de tempo definido (LEWAN et al., 1992; LUNA et al., 2005). McLaughlin et al. (1998) relataram que o ensaio utilizando *Artemia salina* tem boa correlação com atividade citotóxica em alguns tumores sólidos humanos e levou à descoberta dos *Annonaceous acetogenins* como nova classe de agentes antitumorais ativos. Esta consideração encontra-se fundamentada em estudos de bioensaios comparativos, com diversas substâncias reconhecidamente citotóxicas, entre o teste de letalidade do camarão e testes *in vitro* efetuados com linhagens de células cancerígenas (ANDERSON, 1991).

Os linfócitos são células responsáveis pela extraordinária especificidade das respostas imunes adaptativas de nosso organismo (ALBERT et al, 2004). Devido a sua grande abundância na corrente sanguínea, os linfócitos em cultura tornaram-se um modelo *in vitro* bastante vantajoso em diversos estudos, como por exemplo os de genotoxicidade, citotoxicidade, entre outros; uma vez que são de fácil obtenção e podem ser obtidos praticamente livres de contaminação. Outra grande vantagem dos linfócitos é a sua facilidade de desenvolvimento em cultura por longos períodos (WNUK et al, 2009). Todas as vantagens citadas justificam a ampla utilização de culturas celulares de linfócitos em estudos citogenéticos, tanto os clássicos (teste de micronúcleo, ensaio do cometa, ensaio MTT), quanto os moleculares (FISH), o que ressalta a utilidade destes modelos em estudos de genotoxicidade.

A redução do MTT (93-[4,5dimetiliazol 2-yl]-2,5-brometo difeniltetrazólico) é um método colorimétrico rápido, que pode ser realizado a partir da cultura de leucócitos, frequentemente usado para medir proliferação celular e citotoxicidade (MOSMANN, 1983). Neste ensaio, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de formazan de cor azul que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. Sendo a endocitose um mecanismo fundamental das células vivas (LIU et al., 1997), o ensaio do MTT tem sido usado frequentemente como ensaio de citotoxicidade celular.

Geralmente danos não reparáveis do DNA eram medidos por ensaios como o Ensaio DNA Cometa (qualitativo), análise de micronúcleos (semiquantitativo) ou através de eletroforese em gel de agarose de DNA isolado. Nos últimos anos, a análise quantitativa de DNA utilizando corantes fluorescentes começou a ser feita. Recentemente, Georgiou, et al. (2009) desenvolveram um protocolo em que análise da quantidade de DNA é medida por

fluorimetria. Nesta técnica, corantes ultrasensíveis como o DNA Picogreen® ligam-se apenas ao DNA que está em dupla-fita (doublestrand ou dsDNA). O corante consegue detectar uma quantidade mínima de dsDNA no meio (25 pg/ml). Para dar uma ideia do quanto esta quantidade é mínima 80 pg de DNA correspondem ao DNA genômico de apenas 120 células. Portanto, se o DNA apresentar algum tipo de fragmentação provocada por fatores endógenos ou exógenos a fluorescência emitida vai diminuir e assim pode ser avaliado efeito genotóxico. Assim, Georgiou et al. (2009) sugeriram que o uso de ensaio de quantificação do DNA medido por fluorimetria utilizando o DNA Picogreen® pode ser um teste quantitativo complementar ao Ensaio DNA Cometa.

### 1.1.2 Toxicidade *in vivo*

Alguns modelos de estudos toxicológicos *in vivo* abordam ensaios de toxicidade aguda, toxicidade subcrônica e toxicidade crônica, onde este deve abordar mutagenicidade, embriofetotoxicidade, alterações de fertilidade, carcinogenicidade e indução de dependência. (BEDNARCZUK, 2010).

Testes de toxicidade *in vivo* sempre foram intensamente criticados por grupos de proteção animal. As reflexões feitas a partir do tema fizeram com que o número de animais utilizados nessas metodologias fosse reduzido. Testes como o de toxicidade aguda onde antes eram utilizados de 20 a 30 animais por grupo com doses chegando a 5000 mg/Kg foram reduzidos para grupos de no máximo 10 animais normalmente utilizando 3 grupos com 5 animais com dose máxima de 2000 mg/Kg (VALADARES, 2006).

Diversos fatores influenciam na toxicidade, tais como fatores biológicos: idade, peso corpóreo, temperatura, fatores genéticos, estados nutricionais e patológicos, e outros como: concentração da amostra testada, estado de dispersão (forma e tamanho das partículas), solubilidade nos fluídos orgânicos, afinidade e sensibilidade ao tecido ou organismo humano e fatores da própria substância (CAZARIN et al., 2004). Diante de tantos fatores que podem influenciar na toxicidade de uma substância, os testes *in vivo* ainda não podem ser substituídos completamente. No entanto, as metodologias podem sofrer redução com a atribuição de testes *in vitro* na triagem, respeitando os 3R's já anteriormente citados (REPETTO & REPETTO, 1995).

#### 1.1.2.1 Toxicidade aguda

A estimativa de toxicidade aguda é uma tarefa importante no planejamento de fármacos e avaliação de risco toxicológico de agentes químicos. Ratos e camundongos são as principais espécies utilizadas nestes estudos. A toxicidade aguda é definida como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto após administração de dose única, ou doses múltiplas, administradas dentro de 24 horas (BARROSet al., 1996). A toxicidade aguda é expressaprincipalmente pela quantidade necessária, em mg/kg de peso corpóreo, para provocar a morte de 50% dos animais estudados, sendo representada pela dose letal média (DL<sub>50</sub>) (EATON&KLAASSEN, 1995; BARROS et al., 1996; VALADARES, 2006; OGA, 2008).

Como descrito por Valadares (2006), para a realização do teste da DL<sub>50</sub> eram empregados mais de 100 animais (normalmente ratos e camundongos) para cada espécie estudada e para cada substância testada. O teste da DL<sub>50</sub> foi inicialmente introduzido em 1927 por Trevan para avaliar substâncias que seriam utilizadas por seres humanos como a *digitallise* a insulina. Entretanto, na década de 1970, este teste, o qual tinha como objetivo encontrar uma única dose letal de uma substância para metade dos animais do grupo teste, começou a ser empregado amplamente como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias. Este teste tornou-se gradativamente um teste pré-requisito para várias agências reguladoras, como a americana *FoodandDrugsAdministration* (FDA), responsáveis pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas (VALADARES, 2006).

Em 1981, a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for EconomicCooperationandDevelopment*; OECD) incorporou o Teste da DL<sub>50</sub> em suas diretrizes, fornecendo testes com estimativas aproximadas de DL<sub>50</sub>, utilizando um número mais reduzido de animais.O método de classificação de toxicidade aguda (OECD 423, 2001), é um procedimento gradual e reprodutível, com o uso de poucos animais do mesmo sexo por etapa (n=3). Dependendo da mortalidade e/ou estado moribundo dos animais, em média 2-4 etapas já são necessárias para permitir avaliar a toxicidade aguda da substância de ensaio. Os animais moribundos, com dor ou mostrando sinais de sofrimento grave e continuado devem ser eutanasiados e são considerados, na interpretação dos resultados do teste, da mesma forma que os animais que morreram durante o ensaio (OECD 423, 2001). Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo de um valor exato de DL<sub>50</sub>, mas permite a determinação de uma faixa de exposição definidas, nas quais a letalidade



é esperada uma vez que a morte de uma proporção dos animais é ainda o ponto principal de extremidade do presente ensaio (VALADARES, 2006).

O nível de dose para ser usada como a dose de partida é selecionada a partir de um dos quatro níveis fixos, 5, 50, 300 e 2000 mg/kg de peso corporal. A dose inicial deve ser a que tem maior probabilidade de induzir mortalidade em alguns dos animais tratados (OECD 423; 2001). A figura 1 descreve o procedimento que deve ser seguido para a dose inicial de 300mg/Kg.

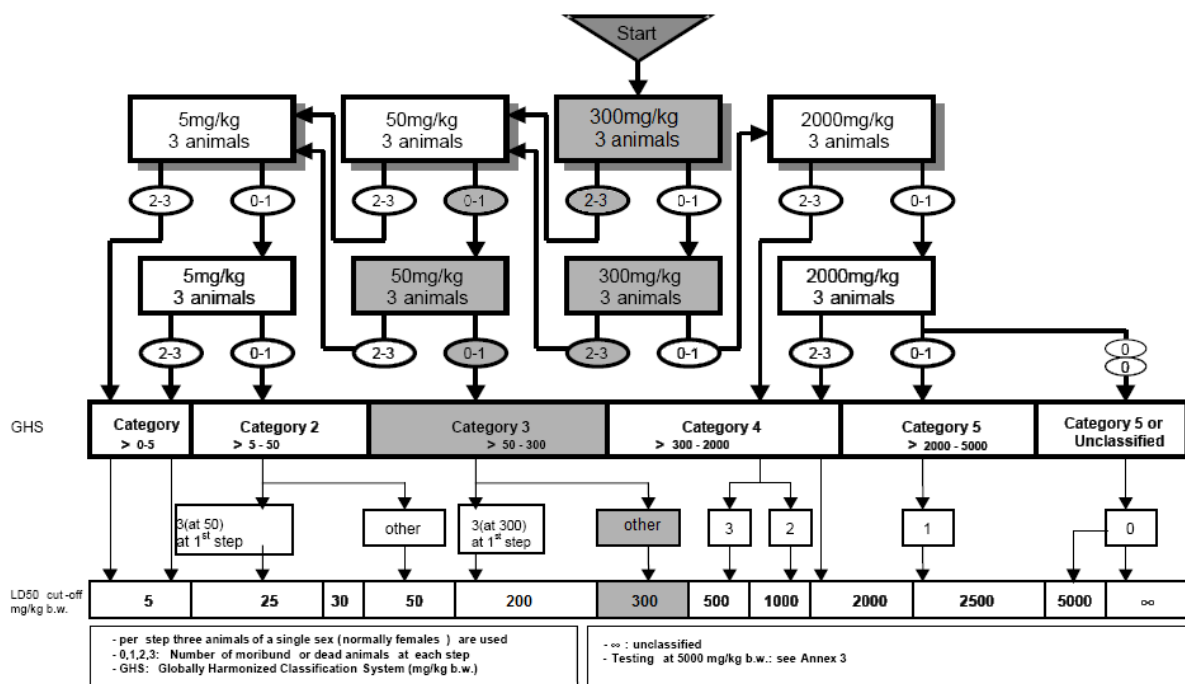


Figura 1- Procedimento de teste com uma dose inicial de 300mg/kg de peso corporal. Fonte: OECD 423, 2001.

Sendo a dose escolhida a de 300mg/kg, como demonstrado na figura acima, e ocorrendo de 2 a 3 mortes ou a observação de sinais clínicos alterados, o protocolo da OECD 423 descreve doses decrescentes a serem administradas em um novo experimento, sendo a dose de 50mg/kg a próxima a ser selecionada. Não ocorrendo mortes ou sinais de toxicidade na dose de 50 mg/kg, a substância é classificada como pertencente à categoria 3, com DL<sub>50</sub> estimada de 50-300mg/Kg.

Além da letalidade, os resultados obtidos a partir dos estudos de toxicidade aguda servem também para identificação do potencial tóxico em órgãos específicos, conhecimento

do mecanismo de ação da substância, informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe, identificação da toxicocinética e a relação-dose resposta. (PURCHASE et al., 1998; BLAAUBOER, 2003; VALADARES, 2006). Os animais são observados individualmente após a administração da substância, pelo menos uma vez durante os primeiros 30 minutos e periodicamente durante as primeiras 24 horas, com especial atenção durante as primeiras 4 horas, e diariamente a partir daí, por um total de 14 dias. As observações incluem alterações na pele e pelos, olhos e mucosas, alterações no aparelho respiratório, circulatório, autônomo e sistema nervoso central e alterações na atividade somatomotora e do comportamento. Atenção especial deve ser dirigida à observação de tremores, convulsões, salivação, diarreia e letargia.

#### 1.1.2.2 Toxicidade subaguda

A toxicidade subaguda refere-se aos efeitos nocivos, cumulativos, decorrentes da exposição repetida, em um período limitado ao longo do tempo. Um dos principais objetivos deste estudo é avaliar mais efetivamente órgãos alvos, determinar aqueles com mais suscetibilidade e prover dados sobre dosagens seletivas para estudo de toxicidade crônica (OGA, 2008).

A OECD 407 estipula um protocolo para o estudo de toxicidade subaguda, o qual utiliza 3 doses crescentes de determinada substância, uma dose por grupo, por 14 ou 28 dias, utilizando-se um número limitado de animais do mesmo sexo. Este estudo fornece informações sobre os possíveis riscos suscetíveis para a saúde que surgem a partir da exposição repetida ao longo de um período relativamente pequeno de tempo onde são observados sinais evidentes de toxicidade em órgãos-alvo, após a administração da substância. Além de poder indicar a necessidade de mais estudos de longo prazo, este teste também pode fornecer informações sobre a seleção das concentrações usadas nesses novos estudos (OECD, 1995).

O estudo de toxicidade subaguda, utilizando o guia da OECD 407 é um método que compreende o estudo de toxicidade de uma dose repetida pré-estabelecida que possam ser utilizados para

produtos químicos em que um estudo de 90 dias não se justifica ou como uma fase preliminar de um estudo de longo prazo (OECD 407, 1995).

A substância é administrada uma vez por dia em doses crescentes (5 machos e 5 fêmeas por dose). Os animais que morrem ou são sacrificados durante o ensaio são submetidos à autópsia e no fim do ensaio os animais sobreviventes são eutanasiados para análise (OECD 407, 1995). Pelo menos três grupos teste e um grupo controle devem ser utilizados durante o experimento. A dose mais elevada do grupo teste deve ser escolhida com o objetivo de induzir efeitos tóxicos, mas não a morte ou sofrimento grave. A partir daí, uma sequência decrescente de doses deve ser selecionadas com objetivo de evidenciar uma dose resposta e a menor dose não deve apresentar quaisquer efeitos tóxicos (OECD 407, 1995).

A observação e a administração da dose aos animais devem ser feitas pelo menos uma vez por dia, no mesmo horário, sendo registrada qualquer alteração de comportamento, sinais de toxicidade, morbidade e mortalidade causados pela administração da substância. Os sinais anotados devem incluir alterações na pele, olhos, mucosas, ocorrência de secreções, excreções ou atividade autônoma (por exemplo, lacrimação, ereção pilosa, alterações nas pupilas e respiração anormal). Alterações da atitude, postura e reação à manipulação, além da ocorrência de movimentos tônicos ou clônicos, estereotípias (por exemplo, de higiene excessiva) ou estranhos (automutilação, andar para trás) também devem ser registrados. Todos os animais devem ser pesados pelo menos uma vez por semana. As medições do consumo de alimentos devem ser realizadas pelo menos semanalmente. Se a substância for administrada através da água de beber, o consumo de água também deve ser medido pelo menos semanalmente.

Além disso, no final do período de ensaio, vários parâmetros devem ser analisados, dentre eles parâmetros hematológicos como hematócrito, hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos e contagem de plaquetas. Análises bioquímicas como glicose, colesterol total, triglicerídeos, ureia, creatinina, pelo menos, duas enzimas indicativas dos efeitos hepatocelulares (tais como alanina aminotransferase (ALT), aspartatoaminotransferase (AST) e fosfatase alcalina) entre outros. Determinações destinadas a investigar os principais efeitos tóxicos nos tecidos, especificamente, os efeitos sobre rins e fígado, devem ser realizados em amostras de sangue. Exame histopatológico deve ser realizado sobre os órgãos e tecidos de todos os animais do grupo controle e da dose mais alta. Estes exames devem ser realizados em todos os outros animais dos grupos que receberam doses menores se as mudanças relacionadas ao tratamento são observadas no grupo que recebeu a dose mais elevada.

## 1.2 Tiossemicarbazonas

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de compostos sintetizados em laboratório que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Isto pode ser claramente observado pelo aumento de trabalhos publicados nesta área. Existem vários trabalhos enumerando os benefícios de compostos semicarbazonas e tiossemicarbazonas. Semicarbazonas e tiossemicarbazonas (figura 2) apresentam uma ampla gama de atividades biológicas, e sua composição química e aplicações farmacológicas têm sido amplamente estudadas. Este interesse pode ser atribuído a fatores significativos, tais como a sua grande utilidade farmacológica, incluindo a atividade antimicrobiana (KASUGA, 2003), antitumoral (BERALDO, 2004; FEUN, 2002), antiviral (TEITZ, 1994), antiprotozoária (BHARTI, 2002), citotóxica (KARAH, 2002), dentre outras (PRATHIMA et al. 2010).

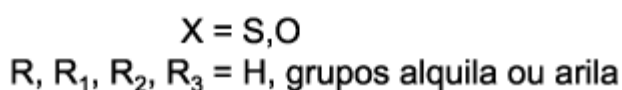
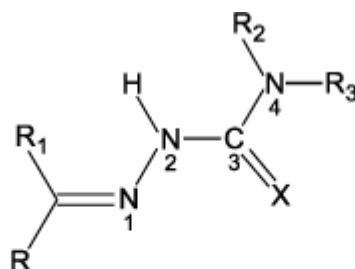


Figura 2 - Estrutura genérica de semicarbazonas e tiossemicarbazonas

Apesar da ampla versatilidade farmacológica desses compostos como uma classe, especificidades estruturais podem levar a manifestação de atividades específicas. Para os

complexos metálicos, em alguns casos é possível modular a atividade através do desenho do ligante. A sua capacidade de quelar íons de metais depende da presença do sistema de coordenação tridentado de N, N, S (doador leve) (DECONTI et al., 1972; YU et al. 2009; KALINOWSKI & RICHARDSON, 2005; BERALDO, 2004) De modo geral pode-se dizer que tiossemicarbazonas e semicarbazonas, seja como inibidores de enzimas, através da complexação de metais endógenos ou através de reações redox, seja através de interações com o DNA e da inibição da síntese de DNA. Esta propriedade confere às tiossemicarbazonas a possibilidade de serem aplicadas na busca por novas substâncias terapêuticas em diversos campos de pesquisa (BERALDO, 2004; KALINOWSKI & RICHARDSON, 2005; PEDRIDO, 2008), sendo as atividades antitumorais e antiprotozoárias as que aparecem, sem dúvida, como as mais relevantes (TENÓRIO et al. 2005).

Em alguns estudos demonstrou-se que compostos derivados das tiossemicarbazonas foram capazes de proteger e reativar acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase inibida por organofosforados (BARCELOS et al., 2012; WOREK et al., 2004). E pode-se observar atividade antioxidante e anti-inflamatória em intoxicações por metais pesados como cádmio (FREITAS et al., 2012). Além disso, estudos relatam atividade *scavenger* de radicais livres, podendo ser atribuídos também a esses compostos a propriedade antioxidante (PRATHIMA et al., 2010).

No entanto, suas propriedades redox têm sido controversas, alguns estudos relatam que as tiossemicarbazonas são compostos antioxidantes (GHOSH et al., 2009), enquanto outros relatam que elas são compostos oxidativos (KARATAS et al., 2006). Do ponto de vista sintético, estas moléculas apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada na sua síntese, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final (DU et al., 2002).

### 1.2.1 Salicilaldeído-4-feniltiossemicarbazona (SPTS)

O composto SPTS (figura 3) é um composto pertencente à classe das tiossemicarbazonas, classe que vem sendo amplamente estudada por apresentar diversas atividades farmacológicas. Dessa forma torna-se importante avaliar a toxicidade do composto em mamíferos.

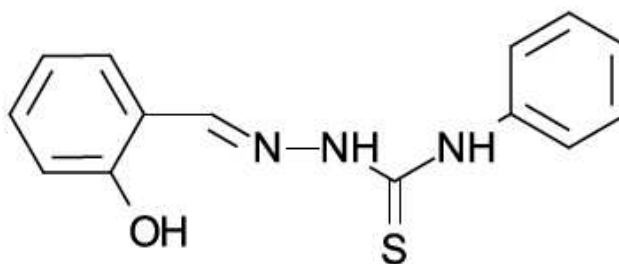


Figura 3 - Estrutura química do composto SPTS.

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa com o composto SPTS, observou-se a sua atividade antioxidante contra a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e soro induzidas por  $\text{Cu}^{2+}$  e 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) dihidroclorato. O composto também apresentou significativa atividade *scavenger* de radicais e preveniu a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico induzidas por nitroprussiato de sódio em diferentes tecidos de ratos (fígado, rim e cérebro). Estes resultados foram sugestivos do efeito antioxidante do SPTS que pode ser causado pela combinação de uma possível atividade quelante do composto e a atividade *scavenger* de radicais livres (dados não publicados).

Sabe-se que tiossemicarbazonas derivadas da piridina, que contém o sistema quelante tridentado (N-N-S), como por exemplo o SPTS, são mais ativas como antitumorais que os derivados bidentados (N-S). Sabe-se ainda que tiossemicarbazonas com grupos volumosos no nitrogênio terminal apresentam maior atividade antitumoral do que aquelas não substituídas (BORGES, 1997). Em um estudo realizado por Divolic et al. (2008), onde compostos tiossemicarbazonas foram testados contra cinco linhagens celulares derivadas de carcinoma diferentes, pode-se verificar que o composto SPTS apresentou atividade antiproliferativa perceptível, quando comparada com outros compostos diferentemente substituídos.

### 1.3 Radicais livres, Estresse oxidativo e defesas antioxidantes

#### 1.3.1 ↓

Os radicais livres de oxigênio (RLO) são produzidos naturalmente em nosso organismo através de processos metabólicos oxidativos e, muitas vezes, são de extrema

utilidade, como nas situações em que há necessidade de ativação do sistema imunológico (como exemplo, os macrófagos utilizam o peróxido de hidrogênio para destruir bactérias e outros elementos estranhos); na desintoxicação de drogas; e na produção do fator relaxante derivado do endotélio, o óxido nítrico, extremamente importante nos processos que desencadeiam o relaxamento dos vasos sanguíneos (MONCADA & HIGGS, 2001).

Espécies reativas são espécies químicas que geralmente apresentam um elétron desemparelhado na sua órbita externa. Estas moléculas, também chamadas de radicais livres, caracterizam-se por serem instáveis e por terem um tempo de vida muito curto, o que as tornam altamente oxidantes. Todos os organismos aeróbicos produzem continuamente espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) durante os seus processos metabólicos. Entre as espécies químicas geradas, se destacam o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, o óxido nítrico e o radical hidroxila (FREI, 1994; FINKEL & HOLBROOK, 2000). Em condições fisiológicas, tais espécies são detoxificadas por um sistema antioxidante complexo presente nas células, composto por antioxidantes enzimáticos (ex: catalase, glutatinoxidase e superóxido dismutase) e antioxidantes nãoenzimáticos (ex: Vitamina A, C, E e Glutona) (NORDBERG & ARNER, 2001; KOHEN & NYSKA, 2002)

### 1.3.2 Estresse oxidativo

O termo estresse oxidativo é utilizado em circunstâncias nas quais a ação das espécies reativas resulta em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos ou danosos aos tecidos. Pode-se dizer que um organismo encontra-se sob estresse oxidativo (EO) quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (SIES, 1986). Um dos principais mecanismos de lesão é a lipoperoxidação (LPO), ou seja, a oxidação da camada lipídica da membrana celular. Além disso, o EO pode gerar danos a proteínas e ao DNA, provocando diversas alterações na função celular e, portanto, tecidual (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

### 1.3.3 Peroxidação lipídica

As membranas celulares consistem em um envoltório composto por fosfolipídios e proteínas, as quais são encontradas em todas as células vivas. Esta membrana é composta por uma dupla camada de fosfolipídios, que apresentam uma cabeça polar e duas caudas hidrofóbicas compostas por ácidos graxos, que podem apresentar uma ou mais duplas ligações (insaturação) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).↓

Quando ocorre um desequilíbrio metabólico, as EROs atacam os ácidos graxos insaturados das membranas celulares num processo chamado peroxidação lipídica. Este mecanismo resulta em modificação nos lipídeos de membrana e esta perde suas características arquitetônicas, tornando-se mais firme e menos flexível. Com isso criam-se fendas iônicas, que alteram a permeabilidade da membrana e favorecem o fluxo indiscriminado de metabólitos e detritos celulares. Este desequilíbrio hidroeletrólítico leva a ruptura e lise com necrose (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 2000).

A peroxidação lipídica ocorre por meio de uma série de reações em cadeia (figura 4) que são divididas em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Decorrente da peroxidação lipídica ocorre a formação de hidroperóxidos lipídicos e produtos secundários da oxidação, incluindo peróxidos cíclicos como o malondialdeído (MDA) (JANERO, 1990). O MDA por sua vez pode ser detectado e analisado em amostras biológicas através do método de determinação de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) descrito por Ohkawa e colaboradores (1979), onde o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um complexo colorido (TBA-MDA), o qual pode ser quantificado espectrofotometricamente, sendo este teste bastante utilizado para quantificar a peroxidação lipídica, que é um dos principais marcadores de EO.



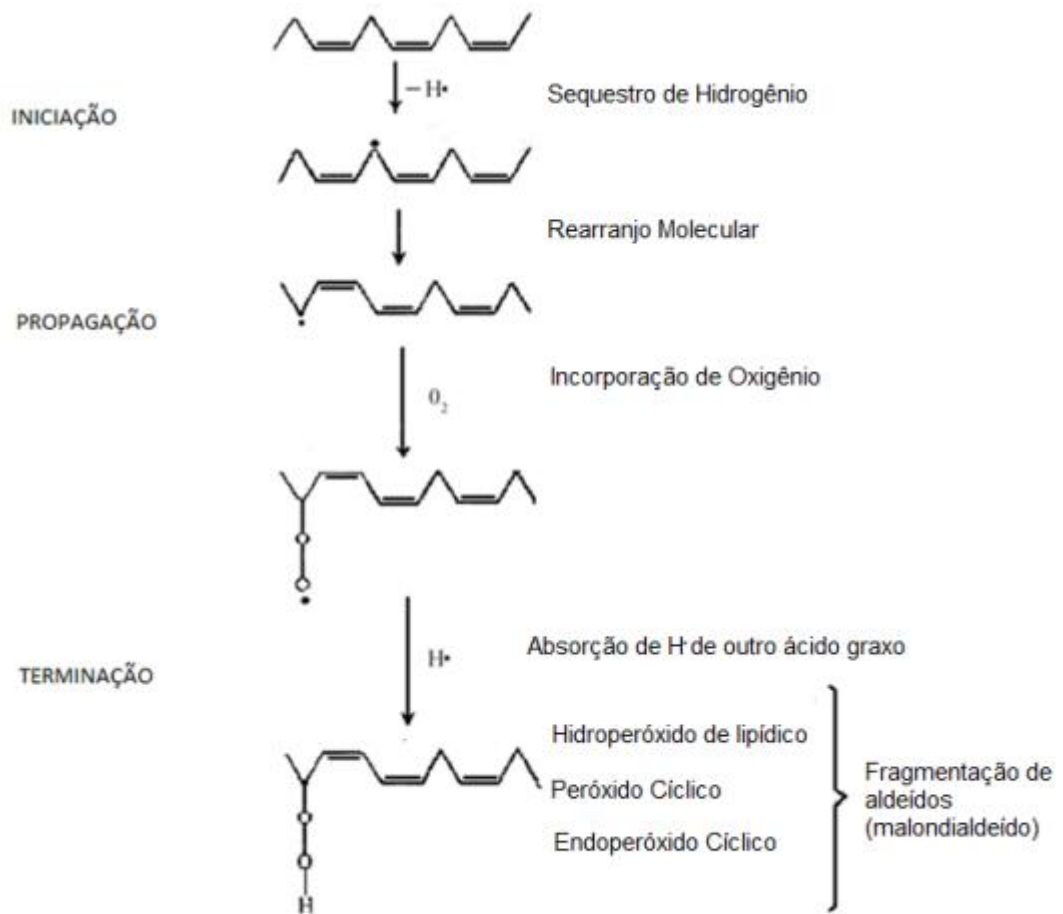


Figura 4 - Etapas da peroxidação lipídica (adaptado de HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

#### 1.3.4 Mecanismos de defesa antioxidante

A célula possui uma série de defesas capazes de evitar o efeito deletério destas EROs. Estas defesas são comumente chamadas de defesas antioxidantes, e podem ser produzidas endogenamente ou adquiridas pela dieta (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Os organismos possuem um complexo sistema de defesa antioxidante, com uma parte enzimática e uma não-enzimática, que agem de forma conjunta e dinâmica em sua defesa. Entre as principais defesas antioxidantes não-enzimáticas da célula estão o ácido ascórbico, carotenóides, flavonóides, pigmentos biliares, urato e a glutatona reduzida (GSH), todos sendo estabilizadores de radicais. A GSH tem papel importantíssimo, pelo seu grupamento tiol (SH), atua contra a formação de radicais livres, na homeostase tiólica, na

manutenção do balanço redox da célula e na defesa contra agentes eletrolíticos (REISCHL et al., 2007).

As defesas antioxidantes enzimáticas também são fundamentais. Entre as principais estão as enzimas catalase (CAT) e a glutathione-S-transferase (GST). A CAT age decompondo diretamente o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e  $\text{O}_2$ , o qual resulta da dismutação do  $\text{O}_2\cdot^-$  (NIKI, 2004; STOCKER & KEANEY-JR, 2004). A GST é uma enzima responsável pela conjugação de xenobióticos eletrofílicos com a GSH, reduzindo sua toxicidade, além de torná-los mais hidrofílicos, permitindo que o sistema de transporte elimine estes conjugados para o meio extracelular, metabolizados pela via do ácido mercaptúrico (BUCHELI & FENT, 1995). A GSH formada pelos aminoácidos glicina, cisteína e glutamato, é o cofator para a GST. A GST é considerada a principal enzima detoxificante da fase II, esta desempenha papel fisiológico na iniciação da detoxificação de xenobióticos através de reação de conjugação destes com a GSH, tornando os produtos da reação menos tóxicos e hidrossolúveis, facilitando a excreção (LAM et al., 1982; LAM et al., 1994; WATTENBERG, 1983; WHEATLEY et al., 1994).

## II OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* do composto salicilaldeído-4-feniltiosemicarbazona (SPTS).

### 2.2 Objetivos específicos

Tendo em vista que não existem estudos de toxicidade sobre o composto, este trabalho tem como objetivos específicos:

2.2.1 Avaliar a toxicidade *in vitro* do composto SPTS, através do ensaio das *Artemias salinas*, atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D e testes de cito e genotoxicidade.

2.2.2 Avaliar a toxicidade aguda do composto SPTS em ratos, através de parâmetros hematológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo

2.2.3 Avaliar a toxicidade subaguda do composto SPTS em ratos, através de parâmetros hematológicos, bioquímicos, de estresse oxidativo e comportamentais.

### **III MANUSCRITO**

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 avaliação na revista *Journal of Applied Toxicology*.

### 3.1 Manuscrito

*Teixeira, T.P.<sup>1</sup>, Fleck, M.A.<sup>1</sup>, Pagliarini, P.<sup>1</sup>; Freitas, M.L.<sup>1</sup>; Moreira, L.R.<sup>1</sup>; Brum, E.<sup>1</sup>;  
Campos, M.M.A.<sup>1</sup>; Barbisan, F.<sup>2</sup>; Teixeira, C.F.<sup>2</sup>, Cruz, I.B.M.<sup>2</sup>; Soares, F.A.A.<sup>3</sup>; Brezolin, L.<sup>4</sup>;  
Brandão, R.<sup>5</sup>*

O presente artigo será submetido ao periódico *JournalofAppliedToxicology*.

**EVALUATION OF *IN VITRO*, ACUTE AND SUB-ACUTE TOXICOLOGICAL EFFECTS OF SALICYLALDEHYDE-4-PHENYLTHIOSEMICARBAZONE**

*Teixeira, T.P.<sup>1</sup>, Fleck, M.A.<sup>1</sup>, Pagliarini, P.<sup>1</sup>; Freitas, M.L.<sup>1</sup>; Moreira, L.R.<sup>1</sup>; Brum, E.<sup>1</sup>; Campos, M.M.A.<sup>1</sup>; Barbisan, F.<sup>2</sup>; Teixeira, C.F.<sup>2</sup>, Cruz, I.B.M.<sup>2</sup>; Soares, F.A.A.<sup>3</sup>; Brezolin, L.<sup>4</sup>; Brandão, R.<sup>5</sup>*

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, campus UFSM, Santa Maria, RS, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, campus UFSM, Santa Maria, RS, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, campus Santa Maria, RS, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de, Campus Carreiros, Rio Grande, RS, Brasil.

<sup>5</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brasil

\*Correspondence should be sent to:

Ricardo Brandão

Departamento de Ciências Farmacêuticas, centro de ciências da saúde, UFPE, Recife, CEP 50740-521, PE, Brasil

Phone: 55-81-2126-8511

FAX: 55-81-2126-8510

E-mail: [ricardo\\_br79@yahoo.com.br](mailto:ricardo_br79@yahoo.com.br)

## Abstract

The compound salicylaldehyde-4-phenylthiosemicarbazone (SPTS) belongs to the class of thiosemicarbazone. This compound possesses considerable scientific interest because of their important biological and chemical properties, such as antitumor and antioxidant and, thus, previous studies to assess the toxicity of SPTS are necessary. In the present study, *in vitro* assays were verified, such as *Saline Arteminas* test, to determine the median lethal concentration ( $LC_{50}$ ) of the compound, as well as determination of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase. We also performed the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction test and PicoGreen assay, in order to check the cell viability and the presence of double-strand (dsDNA) fragments indicating cytotoxicity and genotoxicity, respectively. Acute and subacute toxicological tests were performed also, *in vivo*, to evaluate oxidative parameters in brain, kidney, and liver tissue, as well as hematological and biochemical analysis. In addition, behavioral parameters were analyzed in subacute protocol. The  $LC_{50}$  resulted in a value considered biologically active ( $69,11 \mu\text{g/ml}$ ), confirming the *in vitro* toxicity of the compound. In the MTT and PicoGreen assays, we verified that SPTS, at  $100 \mu\text{M}$ , presented cytotoxic and genotoxic effects. The results of acute studies demonstrated an estimated median lethal dose ( $DL_{50}$ ) between 50-300 mg/kg. In the studies of sub-acute toxicity, we verified that SPTS induced oxidative alterations in liver, kidney and brain of rats. Behavioral alterations and hypertriglyceridemia were observed also. Thus, in this study we verified toxic effects of SPTS *in vitro*, highlighting the cytotoxic and genotoxic effects. In addition, significant toxic effects were observed in subacute exposure protocol, such as changes in lipid profile and in oxidative and behavioral parameters.

## 1 Introduction

Semicarbazones and thiosemicarbazones present a wide range of bioactivities, and their chemistry and pharmacological applications have been extensively investigated. This interest can be attributed to significant factors, such as its extensive pharmacological utility, including antimicrobial and antineoplastic activity (Beraldo, 2004), as well as versatility as a binder, which enables it to rise to a wide variety of forms of coordination (Pedrido, 2008). In fact, the thiosemicarbazones are excellent chelators of transition metals such as iron, copper and zinc (DeConti et al. 1972). Its ability to chelate metal ions is dependent on the presence of coordination system tridentate N, N, S (mild donor) (Yu et al. 2009) therefore the ability to chelate metals is an attractive strategy in developing drugs (Kalinowski et al. 2005). Moreover, studies have reported scavenger activity free radical, which may also be attributed to the antioxidant properties of these compounds (Prathima et al. 2010).

The compound salicylaldehyde-4-phenylthiosemicarbazone (SPTS; Figure 1) was recently synthesized, therefore, little is known about its pharmacological and toxicological properties. In previous studies with the compound SPTS, it was noted their antioxidant activity against the oxidation of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and serum induced by  $\text{Cu}^{2+}$  and 2,2'-azobis (2-ethylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) (Barcelos et al., 2011). This compound also showed significant activity free radical scavenger (Zhong et al., 2010). These results are suggestive that the SPTS antioxidant effect may be caused by a possible combination of the chelating activity and free radicals scavenger activity. In addition, Divolic et al. (2008) verified that SPTS presented anti proliferative effects against five different cell lines derived from carcinomas.



The guideline of Organization for Economic Cooperation and Development(OECD) 423 stipulates a stepwise procedure with the use of 3 animals of a single sex per step. Depending on the mortality and/or the moribund status of the animals, on average 2-4 steps may be necessary to allow judgement on the acute toxicity of the test substance (OECD, 2001). The OECD 407 stipulates the evaluation of toxicological effects after repeated exposure to test substance. The duration of exposure should normally be 28 days although a 14-day study may be appropriate in certain circumstances. Behavioural, biochemical and hematological analyses are recommended to assess the subacute toxicity of compound (OECD, 1995). Thus, the aim of this study was evaluated the *in vitro*, acute and sub-acute toxicity of SPTS, through behavioural, hematological, biochemical and oxidative parameters.

## **2 Material and methods**

### *2.1 Animals*

Adult male Wistar rats from our own breeding colony (250-350g) were used. The animals were kept on a 12 h light/dark cycle, with lights on at 7:00 a.m., at a room temperature of  $22 \pm 2$  °C, with free access to food (Guabi, RS, Brazil) and water. Animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, the Federal University of Santa Maria, Brazil. The number of approval protocol is 111/2014.

### *2.2 Chemicals*

The compound was prepared by a mixture of equimolar amounts of salicylaldehyde and 4-phenylthiosemicarbazone described by Klayman et al. (1979). Spectral analysis of SPTS was proposed in a previous article (Seena et al., 2008).

### 2.3 *In vitro* experiments

To  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity, thiol oxidase, *Artemia salina*, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction and PicoGreen assay, we used ethanol 100% as vehicle.

#### 2.3.1 $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) activity

Three untreated rats were sacrificed by dislocation of the cervical spine and were removed their kidneys, liver and brain. The tissue samples were homogenized in 50 mM Tris/HCl, pH 7.4 (1/10, w/v) and centrifuged at  $2.400\times g$  for 10 min to obtain the supernatants. The activity of the enzyme  $\delta$ -ALA-D was evaluated through method of Sassa (1989), by measuring the rate of product porphobilinogen (PBG) formation, except that 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8 and 2.4 mM of aminolevulinic acid (ALA) were used (Barbosa et al. 2008). An aliquot of 200  $\mu$ l of  $S_1$  was incubated, in the presence of different concentrations of SPTS (50, 100, 200, 300 and 400  $\mu$ M), at 37°C for 60 min for the liver and kidney, and 180 min for brain. The reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm.  $\delta$ -ALA-D activity was expressed as nmol PBG/mg protein/hour.

#### 2.3.2 Thiol oxidase activity

The rate of thiol oxidation was determined in the presence of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, and SPTS at different concentrations (50–400  $\mu$ M). Incubation at 37 °C was initiated by the addition of the thiol compound: reduced glutathione (GSH) (10.0 mM). At 120 min, aliquots of the reaction mixture (200  $\mu$ l) were checked for the amount of -SH groups at 412 nm. The rate of thiol oxidation was evaluated by measuring the disappearance of -SH groups. Free-SH groups were determined according to Ellman (1959). Results were reported as % of control.

### *2.3.3 Artemiasalina lethality test*

Different concentrations of the compound (50, 100, 200, 300 and 400  $\mu$ M) were evaluated in the brine shrimp larvae lethality assay, based on procedure described by Meyer et al. (1982). Briefly, dried shrimp eggs were obtained in saline medium (35 g of sea salt, pH 8.0), under controlled conditions of aeration and lighting. After 24 h of hatching, the larvae (10 per vial) were transferred to 10 ml vials containing the extract dilutions and saline solution, the number of survivors was counted after 24 h of incubation and the percentage of death calculated, were performed double of each concentration. The number of dead larvae was recorded and used to calculate the 50% lethal concentration ( $LC_{50}$ ) by trimmed Spearman-Kärber, the conventional Spearman-Kärber method is described in Finney.

### *2.3.4 Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro culture*

The human blood samples were collected from people in our research group by venipuncture using heparinized vials and then transferred to tubes with Ficoll histopaque (1:1). The tubes were centrifuged for 30 min at 252xg and PBMCs were positioned in the interphase, PBMCs were centrifuged again (10 minutes at 2000 rpm) and transferred to culture medium containing 1 ml RPMI 1640 (GIBCO) with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin/ streptomycin. Culture tubes for each subject were prepared at a final concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL. The PBMC cultures were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 24 h before performing the experiments. The concentrations of the SPTS compound used for the PBMC viability assays and Double-stranded DNA (dsDNA) levels cytotoxicity assay were: 5, 10, 30 and 100 µM.

#### *2.3.4.1 Cell viability assays*

The MTT bioassay was performed to monitor cell viability. The MTT assay is based on the cleavage of tetrazolium salts via the activity of mitochondrial succinate dehydrogenase in metabolically active cells that yield a colored formazan product (Mosmann, 1983). Briefly, treated cells were incubated for 4 h with MTT reagent. After the formazan salt was dissolved, the absorbance was measured at 570 nm. The cells were photographed before the addition of DMSO in order to observe the formazan crystals. The MTT assay was performed using a 96-well plate in three independent replications. The results were expressed as a percentage of the untreated control values. Since the conversion takes place in living cells, the amount of formazan produced directly corresponds to the number of viable cells.

#### *2.3.4.2 Double-stranded DNA (dsDNA) levels genotoxicity assay*

The PicoGreen fluorescence assay measures the presence of dsDNA fragmentation, which is also an indicative of cytotoxicity (Swarup et al., 2011). To evaluate the cytotoxic effect of SPTS in PBMCs *in vitro* culture, the presence of double-stranded DNA (dsDNA) in supernatant was determined, using a Quant-IT™ PicoGreen® dsDNA kit (Invitrogen-Life Technologies) according to manufacturer's instructions. Briefly, the assay is based on quantifications of cell death. Because of that, when the cell dies the membrane is disrupted and dsDNA fractions are released into the extracellular medium (Swarup et al., 2011). The DNA PicoGreen® dye presents high affinity with the dsDNA and is able to quantify the dsDNA released. In relation to the dsDNA, it was measured by using 50 µl of the sample and 50 µl of the DNA PicoGreen® dissolved in TE buffer, 1× (1:1; v/v), following the incubation for 5 min in a dark room. The fluorescence was measured at an excitation of 485 nm and an emission of 520 nm recorded at room temperature.

### 2.3 *In vivo experiments*

#### 2.5.1 *Acute exposure*

Initially, the estimated LD<sub>50</sub> was determined by test procedure with a starting dose of 300 mg/kg subcutaneous injection (s.c.) body weight, following determinations of OECD 423. The animals that received 300 mg/kg presented evident signals of toxicity and were sacrificed as recommended by the OECD. As there was no mortality and no apparent signs of toxicity at 50 mg/kg, the SPTS was classified in category 3, with a LD<sub>50</sub> of 50-300mg/kg (Figure 2). Thus, the dose of 50 mg/kg was used to further analysis.

Following determinations of OECD 423, six rats were assigned uniformly to two groups tagged as vehicle (ethanol 100%, 1mL/kg body weight), and 50mg/kg body weight

of SPTS. The rats were subjected to fasting throughout the night (food but not water was absent)

before death. The animals received a single subcutaneous injection of SPTS and were sacrificed after 14 days by cardiac puncture from the left ventricle of the heart. Blood samples were collected with or without anticoagulant (EDTA). The blood samples, without anticoagulant, were centrifuged for 10 min at  $2.400\times g$  and, thus, serum was obtained. Hematological analysis were performed, in total blood samples with anticoagulant EDTA, in automatic counter veterinary Mindray BC 2800. Subsequently, were removed kidney, liver and brain of rats. The tissue samples were homogenized in 50 mM Tris/HCl, pH 7.4 (1/10, w/v) and centrifuged at  $2.400\times g$  for 10 min. The low-speed supernatants ( $S_1$ ) were separated and used for biochemical analyses.

#### 2.5.2 Subacute exposure

Following determinations of OECD 407, twenty-two rats were divided into four groups (5-6 animals per group). They received a subcutaneous injection/day during 14 days of SPTS (dissolved in ethanol at 50%) or vehicle.

The exposure protocol is given below:

Group 1: ethanol at 50%; 1mL/kg body weight (s.c.)

Group 2: 5 mg/kg body weight of SPTS (s.c.)

Group 3: 10 mg/kg body weight of SPTS (s.c.)

Group 4: 20 mg/kg body weight of SPTS (s.c.)

After the last administration, on the fourteenth day, we performed the open field test (OFT) in the rats, to assess the possible effects of SPTS on the locomotor and exploratory

activities. The floor of the OFT, 45 cm in length and 45 cm in width, was divided by masking tape markers into 09 squares (three rows of three). Each animal was placed individually at the center of the apparatus and observed for 5 min to record the locomotor (number of segments crossed with the four paws) and exploratory activities (expressed by the number of time rearing on the hind limbs) (Walsh and Cummins, 1976). In addition, the body weight gain was verified, where the animals were weighed at the beginning and at the end of treatment. On the fifteenth day, the animals were sacrificed and the blood, liver, kidney and brain were collected. The samples preparation was conducted in accordance with item 2.4.1

#### *2.4 Parameters used in the experiment in vivo*

##### *2.6.1 $\delta$ -aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) activity*

$\delta$ -ALA-D activity was assayed according to the method of Sassa (1989), which was described in item 2.3.1, without adding SPTS to the incubation medium.

##### *2.6.2 Catalase (CAT) activity*

The activity of CAT was assayed spectrophotometrically by the method of Aebi et al. (1995), which involve monitoring the disappearance of  $H_2O_2$  in the presence of cell homogenate at 240 nm. Enzymatic reaction was initiated by adding an aliquot of 20  $\mu$ l of the S1 and the substrate ( $H_2O_2$ ) to a concentration of 0.3 mM in a medium containing 50 mM phosphate buffer, pH 7.0. The enzymatic activity was expressed in Units (1 Unit decomposes 1  $\mu$ mol of  $H_2O_2$  per min at pH 7 at 25 °C).mg protein<sup>-1</sup>.



### 2.6.3 *Glutathione S-transferase (GST) activity*

GST activity was assayed spectrophotometrically at 340 nm by the method previously described by Habig (1974). The reaction mixture contained an aliquot of S1, 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4, 100 mM GSH and 100 mM of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). The enzymatic activity was expressed as  $\mu\text{mol CDNB conjugated}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ .

### 2.6.4 *Ascorbic acid levels*

Ascorbic acid determination was performed as described by Jacques-Silva et al. (2001). S1 was precipitated in 10 volumes of a cold 4% trichloroacetic acid solution. An aliquot of homogenized sample (300  $\mu\text{l}$ ), in a final volume of 1 ml of the solution, was incubated at 38 °C for 3 h, then 1 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  65% (v.v<sup>-1</sup>) was added to the medium. The reaction product was determined using color reagent containing 4.5 mg.ml<sup>-1</sup> dinitrophenyl hydrazine and 0.075 mg/ml  $\text{CuSO}_4$ . The ascorbic acid levels were expressed in  $\mu\text{g AA}\cdot\text{g tissue}^{-1}$ .

### 2.6.5 *Non-protein thiols (NPSH) levels*

NPSH levels were determined by the method of Ellman (1959). To determine NPSH, S1 was mixed (1:1) with 10% trichloroacetic acid. After the centrifugation, the protein pellet was discarded and free thiols (-SH) groups were determined in the clear supernatant. An aliquot of supernatant was added in 1 M potassium phosphate buffer pH 7.4 and 10 mM (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) DTNB. The color reaction was measured at 412 nm. NPSH levels were expressed as  $\mu\text{mol NPSH}\cdot\text{g tissue}^{-1}$ .

### *2.6.6 Lipid Peroxidation levels*

The levels of lipid hydroperoxides (LOOH) were measured by FOX assay. The tissue homogenate was added to a test tube together with the FOX reagent (88 mg of butylated hydroxy toluene, 7.6 mg xylenol orange and 9.8 mg of ammonium iron(II) sulfate in 90 ml methanol and 10 ml of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). According to the method of Manna et al. (2008) modified, the mixed was incubated at 37°C for 30 min, after was centrifuged at 2.400×g for 10 min and the absorbance of the supernatant was read at 560 nm.

### *2.6.7 Protein levels quantification*

Protein concentration was measured by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin (1 mg.ml<sup>-1</sup>) as the standard.

### *2.6.8 Serum biochemical parameters*

Serum creatinine, triglycerides and cholesterol levels were measured using commercial Kits of Gold Analisa, Diagnostica LTDA, Minas Gerais, Brazil. Serum ureia levels and alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured using commercial Kits of Wiener Laboratórios S.A.I.C, Rosario, Argentina.

### *2.6.9 Hematological Analysis*

For the hematological analysis (mensuration of hemoglobin, erythrocytes, hematocrit, platelet and total leukocyte count), the blood samples with anticoagulant (EDTA at 10%),

were separated without preliminary preparation to measurement in automatic counter veterinary Mindray BC 2800.

## 2.7 Statistical Analysis

All experimental results are given as the mean (s)  $\pm$  standard derivation (S.D.). The statistical analysis was performed using One-way (ANOVA) followed by the Duncan's test when appropriate.  $p$  values  $< 0.05$  were considered significant. To assays of MTT and dsDNA levels, the statistical analysis was performed using One-way (ANOVA) followed by the Dunnet post hoc test. The results with  $p < 0.05$  were considered significant. The data were pooled from three independent experiments, and the results were expressed as the mean  $\pm$  S.D.

## 3 Results

### 3.1 *In vitro* experiments

The results showed that hepatic, renal and cerebral  $\delta$ -ALA-D activities were not inhibited by SPTS, at concentrations used. Moreover, SPTS did not present thiol oxidase effect in this protocol (data not shown). The results obtained in *Artemiasalina* test showed a  $LC_{50} = 69,11 \mu\text{g/ml}$ .

In relation to cytotoxicity assays, we can check a significant decrease ( $\sim 21\%$ ) in cell viability, at the concentration of  $100 \mu\text{M}$  of SPTS, compared to the control in the MTT assay (Figure 3). We demonstrated also a significant increase ( $\sim 21\%$ ) in dsDNA levels, at  $100 \mu\text{M}$ , when compared to the control group (Figure 4).

### 3.2 *In vivo* experiments

#### 3.2.1 *Acute exposure*

Initially, the estimated LD<sub>50</sub> was determined by test procedure with a starting dose of 300 mg/kg body weight. The animals that received 300 mg/kg presented evident signals of toxicity and were sacrificed. As there was no mortality and no apparent signs of toxicity at 50 mg/kg, the SPTS was classified in category 3, with a LD<sub>50</sub> of 50-300mg/kg.

Hepatic, renal and cerebral GST,  $\delta$ -ALA-D and CAT activities were not modified in rats exposed to 50 mg/kg of SPTS (data not shown). We did not verify also significant changes in NPSH and lipid peroxidation values in all tissues analyzed. The results showed that renal and cerebral ascorbic acid levels were not modified, while that hepatic ascorbic acid levels were increased (~15%) in animals exposed to SPTS at 50 mg/kg, when compared to the control group (data not shown).

Biochemical parameters (creatinine, ureia, triglycerides and cholesterol levels) and hematological parameters (mensuration of hemoglobin, erythrocytes, hematocrit, platelet and total leukocyte count) were not modified in rats exposed to 50 mg/kg of SPTS (data not shown).

#### 3.2.2 *Sub-acute exposure*

##### 3.2.2.1 $\delta$ -ALA-D activity

Hepatic, renal and cerebral  $\delta$ -ALA-D activities were not modified by SPTS at all dose used (data not shown).

#### 3.2.2.2 CAT activity

Hepatic and renal CAT activities were not modified in rats treated with SPTS. However, rats exposed to SPTS at 20 mg/kg presented an increase (~32%) in cerebral CAT activity, when compared with those of the control group ( $p < 0,05$ ) (data not show).

#### 3.2.2.3 GST activity

Rats exposed to SPTS at 10 and 20 mg/kg presented an inhibition (~57% and 37%, respectively) in hepatic GST activity, when compared with those of the control group ( $p < 0,05$ ) (Figure 5A). Rats exposed to SPTS at 20 mg/kg presented an increase (~48%) in renal GST activity, when compared to the control group ( $p < 0,05$ ) (Figure 5B). Cerebral GST activity was also increased by SPTS administration, in rats that received 10 and 20 mg/kg (~46% and 73%, respectively), when compared to the control group ( $p < 0,05$ ) (Figure 5C).

#### 3.2.2.4 Ascorbic acid levels

Animals exposed to 5, 10 and 20 mg/kg of SPTS presented an increase (~97%, 92% and 115%, respectively) in hepatic ascorbic acid levels, when compared with those of the control group ( $p < 0,05$ ) (Figure 6A). In contrast, renal ascorbic acid levels were not modified in rats exposed to SPTS (Figure 6B). Rats exposed to SPTS at 10 and 20 mg/kg presented an increase (~26% and 25%, respectively) in cerebral ascorbic acid levels, when compared to the control group ( $p < 0,05$ ) (Figure 6C).

#### 3.2.2.5 NPSH levels

Hepatic NPSH levels were not modified in rats exposed to SPTS (Figure 7A). However, rats exposed to SPTS at 10 and 20 mg/kg presented an increase (~36% and 44%, respectively) in renal NPSH levels, when compared to the control group ( $p < 0,05$ ) (Figure 7B). Rats exposed to SPTS at 5, 10 and 20 mg/kg presented an increase (~150%, 153% and 156%, respectively) in cerebral NPSH levels, when compared with those of the control group ( $p < 0,05$ ) (Figure 7C).

#### *3.2.2.6 Lipid Peroxidation levels*

Rats exposed to SPTS at 20 mg/kg presented an increase in hepatic (~88%) (Figure 8A) and renal (~32%) (Figure 8B) lipid peroxidation levels, when compared with those of the control group ( $p < 0,05$ ). Rats exposed to SPTS at 5, 10 and 20 mg/kg presented an increase (~35%, 72% and 74%, respectively) in cerebral lipid peroxidation levels, when compared to the control group ( $p < 0,05$ ) (Figure 8C).

#### *3.2.2.7 Serum biochemical parameters*

One-way ANOVA revealed that serum ALT and AST activities and creatinine, ureia, and cholesterol levels were not modified in rats treated with SPTS (data not shown). In contrast, the results demonstrated that rats exposed to SPTS, at 20 mg/kg, presented an increase (~40%) in triglycerides levels, when compared to the control group ( $p < 0,05$ ) (Figure 9).

#### *3.2.2.8 Body weight gain*

Rats exposed to SPTS at 20 mg/kg presented a decrease (~34%) in body weight gain, when compared with those of the control group ( $p < 0,05$ ) (Figure 10).

#### *3.2.2.9 Open Field*

Number of rearings was not modified after SPTS exposure. Rats exposed to SPTS at 10 and 20 mg/kg presented a decrease (~31% and 32%, respectively) in number of crossings, when compared to the control group ( $p < 0,05$ ) (Figure 11).

#### *3.2.2.10 Hematological Analysis*

Hematological parameters (mensuration of hemoglobin, erythrocytes, hematocrit, platelet and total leukocyte count) were not modified in rats treated with SPTS (Table 1).

## **4 Discussion**

The evaluation of toxicity is necessary for predicting the possible adverse effects that can manifest when have human exposure to a particular chemical. For this reason, these studies are always required in research processes, and animal models can be used for this purpose (Koeter, 1993; Ecobichon, 1997; Stokes, 2002; Meyer, 2003). The thiosemicarbazone derived from pyridine and containing tridentate chelating bulky groups on the terminal nitrogen. The action mechanism of the biological thiosemicarbazone, in many cases, involves metal complexes of these compounds. Moreover, in some cases the complex is more active than the free ligand (Rigol et al., 2005).

In our study, the compound belonging to the thiosemicarbazone class, SPTS, showed no changes in the *in vitro* activity of the enzyme  $\delta$ -ALA-D at concentrations of 50-400  $\mu$ M. The  $\delta$ -ALA-D is a marker of toxicity, that catalyzes the condensation of two molecules of delta-aminolevulinic acid to form porphobilinogen, a precursor of heme (Jaffe, 1995). Inhibition of  $\delta$ -ALA-D may adversely affect the heme biosynthetic pathway which, in turn, may have pathological consequences (Sassa et al., 1989). The  $\delta$ -ALA-D is a sulfhydryl enzyme and numerous compounds can oxidize sulfhydryl groups, modifying its activity (Emanuelli et al., 1996). Therefore,  $\delta$ -ALA-D is inhibited by substances that oxidize the thiol (-SH) groups (Nogueira, 2003), and it is linked to situations associated with oxidative stress (Luchese, 2007). In this context, we verified also that SPTS did not present thiol oxidase effect in this study. This is consistent with the lack of inhibition of ALA-D, since the main mechanism of inhibition of this enzyme is the oxidation of SH groups.

*Artemiasalinais* an invertebrate component of the fauna of saline aquatic and marine ecosystems (Sanchez Fortun et al., 1995) and it can be used in a laboratory bioassay in order to determine toxicity through the estimation of the medium lethal concentration ( $LC_{50}$  values) (Lewan et al., 1992), which have been reported for a series of compound and plant extracts (Meyer et al., 1982). According to the literature (David et al., 2001; Anderson et al., 1991; Meyer, 1982), substances with  $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$  are considered inactive. Substances with  $LC_{50}$  between 100 and 900  $\mu\text{g/mL}$  are considered moderately active (Meyer, 1982) and those with  $LC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$  are considered very active. In our study,  $LC_{50}$  of SPTS was lower than 100  $\mu\text{g/mL}$ , demonstrating that this compound presented important toxicity in this protocol of toxicity.

In the presence of living cells, the MTT tetrazolium salt [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide] is enzymatically reduced to a crystalline water-insoluble purple/blue formazan compound, the amount of which is proportional to the number of viable



cells in the tested samples (Lupu & Popescu, 2013). Currently the use of fluorescent dyes, such as the fluorimetric assay for quantification of DNA using the Picogreen reagent has been increasing. This is an objective and highly sensitive technique, which detects small amounts of DNA in solution. Besides, it plays an increasingly important role in many research and biological applications, being quite employed in molecular biology may also be used to analyze the genoprotector or genotoxic effect of a given compound (Dragan et al., 2010; Swarup et al., 2011). The MTT reduction method provides information on mitochondrial function by assessing the activity of succinate dehydrogenase (Mosmann, 1983), showing that in the concentration of 100  $\mu$ M cell viability was decreased in comparison with the control, showing that this concentration is cytotoxic. This result is in agreement with the dsDNA levels genotoxicity assay, where there was increased dsDNA levels when compared to the control, which indicated augmented cellular mortality. The dsDNA assay result strengthens the MTT assay, since it has a direct damage to the cell nucleus, in order that the assay is performed by detecting binding of the dye to the DNA itself (Ahn et al., 1996).

The acute toxicity test estimates the median lethal dose ( $LD_{50}$ ) and is important to classify the toxicants in different categories. The OECD 423 guide provides 4 dose levels (5, 50, 300 and 2000 mg/kg - reaching up to 5000 mg/kg) (OECD, 2001). In this experiment, the assays were initiated at the dose of 300 mg/kg. In this dose there was no mortality, but the animals presented evident signals of toxicity, like loss of body weight and locomotor impairment. Thus, the dose of 50 mg/kg was tested, as recommended by the guide, and no deaths and no apparent signs of toxicity were observed, therefore the SPTS was classified in the category 3, with a  $LD_{50}$  of 50-300 mg/kg. In acute protocol of exposure, hepatic ascorbic acid levels were increased in animals exposed to SPTS. An antioxidant compensatory mechanism may be the explanation for the increased levels of ascorbic acid in response to acute exposure to compound SPTS. Ascorbic

acid is a powerful non-enzymatic antioxidant due to the presence of the strongly reducing group in its structure, called reductone, which also refers to the hydroxyl group of the C=C (Bobbio and Bobbio, 1992). The another parameters of oxidative stress, as well as biochemical and hematological analyses, were not modify by SPTS. Thus, we believe that a single administration of 50 mg/kg of SPTS did not causes significant toxic effects.

Regarding the study of subacute toxicity, hematological parameters were evaluated. Hematological tests are essential in the investigation of hematological diseases. The diversity of the information that the hemogram can provide, although generally rather unspecific, makes this one of the most requested examination in clinical and surgical practice (Garcia-Navarro, 2005). In this study, the subacute treatment with SPTS did not induce changes in hematological profile of rats in all tested doses.

The OECD 407 stipulates that biochemical analyses can be interesting to evaluate the subacute toxicity of different compounds. Hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia are important risk factors for cardiovascular disease and cause of morbidity and mortality. In our study, we observed a significant increase in the levels of triglycerides at dose of 20mg/kg, however cholesterol levels showed no significant changes. One possible explanation to this hypertriglyceridemia can be a hepatic and renal injury. The liver is regarded as one of the central metabolic organs in the body, regulating and maintaining lipid homeostasis (Thilakarathna et al., 2012). End-stage renal disease (ESRD) is associated with accelerated atherosclerosis and a high incidence of cardiovascular morbidity and mortality (Collins et al., 2005). Vaziri (2006) demonstrated that the ESRD-induced dyslipidemia is characterized by hypertriglyceridemia.

In according to exposed above, we observed a significant increase in the levels of LOOH in renal and hepatic tissue, when rats received 20mg/kg of SPTS. This increase may indicate that the compound exhibits pro-oxidant effects on lipid content of kidney and liver.

LOOH are formed during the biochemical processes of peroxidation of unsaturated fatty acids, being basically considered as the initial primary product of lipid peroxidation (Porter et al., 1995). Lipid peroxidation causes structural changes in the lipid bilayer, destabilizing biological membranes and causing loss of barrier function between the intra and extracellular environment, jeopardizing the integrity of organelles and the cell itself (Kühn et al., 2002). However, we verified that serum creatinine and urea levels, which are extensively used to assess renal function by glomerular filtration rate (Cockcroft et al., 1976; Colombeli et al., 2006), were not modified by SPTS exposure. In addition, the serum ALT and AST activities, which are biochemical markers of hepatocytes necrosis and inflammation, were not also modified by SPTS administration. These results demonstrated that SPTS subacute administration, by 14 days, was not sufficient to alter the major markers of renal and hepatic lesion, although it has caused an increase in lipid peroxidation in these tissues.

The increase in oxidative stress can be associated with the alterations in enzymatic or non-enzymatic antioxidant system. Among the main constituents of non-enzymatic antioxidant system are ascorbic acid and GSH. Ascorbic acid is a powerful reducing agent, losing with ease atoms of hydrogen and becoming dehydroascorbic acid. As a water-soluble molecule behaves as oxidizing scavenger elements in the aqueous phase of the organism before they produce attack on other factors such as the lipids of cell membranes (Lenhinger, 1995). Renal ascorbic acid levels were not modified in this protocol of exposure, while that an increase in hepatic levels of ascorbic acid, at all doses of SPTS, was observed. GSH serves as a substrate for antioxidant enzymes such as GST and glutathione peroxidase (GPx) and consists of gamma-glutamyl-cysteinyl-glycine, acting against the formation of free radicals in maintaining the redox balance of the cell and in defense against electrophilic agents (Reischl et al., 2007). In our study, hepatic NPSH levels showed no significant changes

in rats exposed to SPTS, while that a significant increase in the renal NPSH levels was observed, in rats exposed to 10 and 20 mg/kg of SPTS. According to the results, an increase in antioxidant defense system, as observed in ascorbic acid and NPSH levels, is possibly a compensatory response to the presence of oxidative tissue damage (Barbosa et al., 2006; Barbosa et al, 2008), which was observed by the increase in LOOH levels.

In relation to enzymatic antioxidant system, we verified that the activity of renal GST was increased in animals that received 20mg/kg of SPTS. This increase may be associated with the detoxification of endogenous and exogenous substances (Hayes and Pulford, 1995), an adaptive process of the organism to the presence of the compound or with the increase in renal NPSH levels, reported previously. However, hepatic GST activity was reduced after exposure to the SPTS in the rats that received 10 and 20 mg/kg of SPTS. Once GST plays an important role in detoxification, this enzyme could be consumed by catalyzing the conjugation of GSH with xenobiotics. This is supported since the liver is the main organ of biotransformation (Mannervik and Danielson, 1988; Vickers, 1994). In contrast to GST, renal and hepatic catalase and  $\delta$ -ALA-D activities were not modified by SPTS exposure.

Another result observed in the subacute protocol was a reduction in body weight gain, in rats exposed to 20 mg/kg of SPTS, which could be an indicator of adverse effects (Tofovic and Jackson, 1999; Raza et al., 2002; Teo et al., 2002; Hilaly et al., 2004) or may indicate important physiological changes (Antonelli-Ushirobira et al., 2010), such as an anorexigenic effect.

The OECD 407 recommends also the evaluation of comportamental parameters in a model of subacute toxicity. The OFT has evolved as a commonly used tool for the measurement of animal behavior. Regarding the number of rearings, no significant changes were observed in the animals that

received SPTS. Regarding the number of crossings, there was a significant decrease in the animals exposed to 10 and 20mg/kg of SPTS, indicating that this compound, in the doses used, can cause impairment of motor activity in a short period of time (14 days). The test is commonly used to assess qualitatively and quantitatively the general locomotor activity and willingness to explore in laboratory animals. In addition, the OFT is a well characterized rodent model of depression (Brady and Nauta, 1955; Kelly et al., 1997; Slotkin et al., 1999; Ramamoorthy et al., 2008). This demonstrates the central effect of the compound, which may have the psychomotor depressant properties reflected changes (Ross et al., 1991).

The results of this paper demonstrated also cerebral oxidative alterations induced by SPTS. We verified an increase in the cerebral LOOH levels, when animals were treated with 5, 10 and 20mg/kg of SPTS, suggesting pro-oxidant effects of this compound in the brain. In addition, cerebral ascorbic acid levels were increased after exposure to SPTS in rats that received 10 and 20 mg/kg of this compound. We observed also a significant increase in cerebral NPSH levels at 5, 10 and 20 mg/kg of SPTS. According to the results, an increase in antioxidant defense system (ascorbic acid and NPSH levels) has been observed, possibly as a compensatory response to the presence of oxidative tissue damage (Barbosa et al., 2006;. Barbosa et al, 2008). Cerebral GST was also increased in rats treated with SPTS at 10 and 20mg/kg. This increase can be explained since GST plays an important role in the detoxification and may be associated with an adaptive process of the organism to the presence of the compound (Gallagher et al. 2001) or with the increase in cerebral NPSH levels. Another result of this study was the increase in cerebral CAT activity in rats exposed to 20 mg/kg of SPTS. Catalase is an important antioxidant enzyme that catalyzes the dismutation of hydrogen peroxide to water and molecular oxygen (Nelson et al., 2006). According to Cieczot et al. (2009), during exposure of rats to xenobiotics, the activity of antioxidant enzymes in tissues increases, which may denote the attempted adaptation of the cells to the

conditions of strong oxidative stress. Moreover, In all tissues analysed in this study,  $\delta$ -ALA-D activity was not inhibited by SPTS exposure.

With this work, we can conclude that the SPTS compound showed significant cytotoxicity and genotoxicity *in vitro* against normal cells, which is a novelty of this study. We verified also significant toxic effects after exposure subacute to this compound, since were observed changes in lipid profile, in parameters related to oxidative stress and, in addition, behavioral changes.

## References

Aebi U, Chiu W, Milligan R. 1995. Role of catalase on antioxidative defenses. *J Struct Biol.* **2**: 117-118.

Anderson JE, Goetz A, McLaughlin JL, Suffness M. 1991. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumors cell cytotoxicities and antitumor prescreens. *Phytochem Anal.* **2**: 107-111.

Ahn SJ, Costa J, Emanuel JR. 1996. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids research.* **24**: 2623–2625.

Antonelli-Ushirobira TM, Kaneshima EN, Gabriel M, Audi EA, Marques LC, Mello JCP 2010. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guarana (*Paullinia cupana*) in rodents. *Food Chem Toxicol.***48**: 1817-1820.

Barbosa NBV, Rocha JBT, Soares, JCM, Wondracek, DC, Gonçalves JF, Schetinger MRC, Nogueira CW. 2008. Dietary diphenyldiselenide reduces the STZ-induced toxicity. *Food Chem Toxicol.***46**: 186-194.

Barbosa NBV, Rocha JBT, Wondracek DC, Perottoni J, Zeni G, Nogueira CW. 2006. Diphenyldiselenide reduces temporarily hyperglycemia: Possible relationship with oxidative stress. *Chem Biol Interact.***163**: 230-238.

Barcelos RP, Portella RL, Rosa EJF, Fonseca AS, Bresolin L, Carratu V, Soares FAA, Barbosa NV. 2011. Thiosemicarbazone derivative protects from AAPH and Cu<sup>+2</sup> – induced LDL oxidation. *Life Sci.***89**: 20-28.

Beraldo H, Gambino D. 2004. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. *Mini Rev Med Chem.***4**: 31-39.

Beraldo H. 2004. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: perfil farmacológico e usos clínicos. *Quim Nova.* **27**: 461-471.

Bobbio FO, Bobbio PA. 1992. *Introdução à química de alimentos: Vitaminas*. 2.ed. São Paulo: Varela; 163-190.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72**: 248-254.

Brady JV, Nauta WJ. 1955. Subcortical mechanisms in emotional behavior: The duration of affective changes following septal and habenular lesions in the albino rat. *J Comp Physiol Psycho*. **48**:412.

Cockcroft DW, Gault MH. 1976. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*. **16**: 31-41.

Collins AJ, Kasiske B, Herzog C, Chavers B, Foley R, Gilbertson D, Grimm R, Liu J, Louis T, Manning W, Matas A, McBean M, Murray A, St Peter W, Xue J, Fan Q, Guo H, Li S, Li S, Roberts T, Snyder J, Solid C, Wang C, Weinhandl E, Arko C, Chen SC, Dalleska F, Daniels F, Dunning S, Ebben J, Frazier E, Johnson R, Sheets D, Forrest B, Berrini D, Constantini E, Everson S, Frederick P, Eggers P, Agodoa L. 2005. United States Renal Data System. Excerpts from the United States Renal Data System 2004 annual data report: atlas of end-stage renal disease in the United States. *Am. J. Kidney. Dis*. **45**:A5-A7, S1-280.



Colombeli ASS, Falkenberg M. 2006. Comparação de bulas de duas marcas de tiras reagentes utilizadas no exame químico de urina. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* **42**: 2.

Czeczot H, Scibior-Bentkowska D, Skrzycki M, Podsiad M, Karlik W, Bakala A, Grono D, Wiechetek M. 2009. Effect of cadmium on the activity of antioxidant enzymes in isolated rat hepatocytes. *Med Weter.* **65**: 55–60.

David JP, Silva EF, de Moura DL. 2001. Lignanas e Triterpenos do extrato citotóxico de *Eriopeblanchetii*. *Quím Nova.* **24**.

DeConti RC. 1972. Clinical and pharmacological studies with 5-hydroxy-2-formylpyridine thiosemicarbazone. *Cancer Res.* **32**: 1455-1462.

Divolic I, Rubcic M, Vrdoljak V, Pavelic SK, Kralj M, Piantanida I, Cindric M. 2008. Novel thiosemicarbazone derivatives as potential antitumor agents: Synthesis, physicochemical and structural properties, DNA interactions and antiproliferative activity. *Bioorg Med Chem.* **16**: 5189-5198.

Dragan AI, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, Schenerman MA, Geddes CD. 2010. Characterization of PicoGreen Interaction with dsDNA and the Origin of Its Fluorescence Enhancement upon Binding. *Biophys J.* **99**(9):3010-9.

Ecobichon DJ. 1997. *The basis of toxicity testing*. Boca Raton: CRC Press.

Ellman GL. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem.* **82**: 70-77.

Ellman GL. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem. Biophys.* **82** (1): 70-77.

Emanuelli T, Rocha JB, Pereira ME, Porciuncula LO, Morsch VM, Martins AF, et al. 1996. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on deltaaminolevulinate dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. *Pharmacol Toxicol.* **79**:136-43.

Finney DJ, 1971. *Probit Analysis. A statistical treatment of the sigmoid response curve*. Cambridge, at University Press, third ed. Macmillan:New York.

Garcia-navarro CEK. 2005. *Manual de Hematologia veterinária*. São Paulo: Varela

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* **249**: 7130-7139.

Hall CS. 1934. Emotional behavior in the rat: Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J. Comp. Psychol.* **18**: 385-403.

Hayes JD, Pulford DJ. 1995. The glutathione *S*-transferase supergene family: regulation of *GST* and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *CRC Crit Rev Biochem Mol Biol.* **30**: 445–600.

Hilaly JE, Israili ZH, Lyouss B. 2004. Acute and chronic toxicological studies of Ajuva Iva in experimental animals. *J Ethnopharmacol.* **91**: 43–50.

Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EM, Rocha JBT. 2001. Diphenyldiselenide and ascorbic changes deposition of selenium and ascorbic in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol.* **88**: 119-125.

Jaffe EK. 1995. Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. *J Bioenerg Biomembr.* **27**: 169–179.

Kalinowski DS, Richardson DR. 2005. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev.* **57**: 547-583.

Kelly JP, Wrynn AS, Leonard BE. 1997. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: An update. *Pharmacol Ther.* **74**: 299.

Klayman DL. 1979. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. 1. A new class of potential antimalarial agents. *J Med Chem.***22**: 855-862.

Koeter HB. 1993. Test guideline development and animal welfare: regulatory acceptance of *in vitro* studies. *Reprod Toxicol.***7**: 117-123.

Kuhn H, Borchert A. 2002. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic Biol Med.***33**: 154-172.

Lehninger AL. 1995. Vitaminas y coenzimas. En: Lehninger AL, editor. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2nd ed. Barcelona: *Ediciones Omega*, S.A. 341-70.

Lewan L, Andersson M, Morales-Gomez P. 1992. The use of *Artemiasalinain* toxicity testing. *Altern Lab Anim.***20**:297–301.

Luchese C, Zeni G, Rocha JB, Nogueira CW, Santos FW. 2007. Cadmium inhibits deltaaminolevulinate dehydratase from rat lung *in vitro*: interaction with chelating and antioxidant agents. *Chem Biol Interact.* **165**:127–37.

Lupu AR, Popescu T. 2013. The noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO<sub>2</sub> nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays. *Toxicol In Vitro*. **27**: 1445-1450.

Manna P, Sinha M, Sil PC. 2008. Cadmium induced testicular pathophysiology: Prophylactic role of taurine. *ReprodToxicol*.**26**: 282–291.

Mannervik B, Danielson UH. 1988. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem*. **23**:283-337.

Marks DC, Belov L, Davey MW, Davey RA, Kidman, AD. 1992. The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug-resistant human leukemic cells. *Leuk Res*. **16**: 1165-1173.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mc Laughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*. **45**: 31–34.

MeyerO. 2003. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicol Lett*.**140-141**: 21-30.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. **65**: 55–63.

Nelson SA, Bose SK, Grunwald GK, Myhill P, McCord JM. 2006. The induction of human superoxide dismutase and catalase *in vivo*, a fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med*. **40**: 341–347.

Nogueira CW, Borges VC, Zeni G, Rocha JB. 2003. Organochalcogens effects on deltaaminolevulinate dehydratase activity from human erythrocytic cells *in vitro*. *Toxicology*. **191**:169–78.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 1995. OECD Guideline 407 for the testing of chemicals. *Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents*. Adopted by the Council on 27th July 1995. Organisation for Economic Cooperation and Development: Paris.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2001. OECD Guideline 423 for the testing of chemicals. *Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method*. Adopted by the Council on 17th December 2001. Organisation for Economic Cooperation and Development:Paris.

Pedrido R, González-Noyal AM, Romero MJ, Martínez-CalvoM, López MV, Gómez-Fórneas E, Zaragoza G, Bermejo MR. 2008. Pentadentatethiosemicarbazones as versatile chelating systems. A comparative structural study of their metallic complexes. *Dalton Trans.* **47**: 6776-6787.

Porter NA, Caldwell SE, Mills KA. 1995. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids.* **30**: 277-290.

Prathima B, Subba Rao Y, AdinarayanaReddyR, Reddy YP. Varada ReddyA. 2010. Copper(II) and nickel(II) complexes of benzyloxybenzaldehyde-4-phenyl-3-thiosemicarbazone: Synthesis, characterization and biological activity. *Spectrochim Acta AMol Biomol Spectrosc.* **77**: 248-252.

Ramamoorthy R, Radhakrishnan M, Borah M. 2008. Anti- depressant-like effects of serotonin type-3 antagonist, ondansetron: an investigation in behaviour-based rodent models. *Behav Pharmacol.* **19**:29.

Raza M, Al-Shabanah OA, El-Hadiyah TM, Al-Majed AA. 2002. Effect of prolonged vigabatrin treatment on haematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Sci Pharm.* **70**: 135–145.

Reischl E, Dafre A L, Franco JL, Wilhelm Filho D. 2007. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. **146**: 22-53.

Rigol C, Olea-Azar C, Mendizábal F, Otero L, Gambino D, González M, Cerecetto H. 2005. Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs. *Spectrochim Acta A*. **61**: 2933-2938.

Ross CA, Peyser CE, Shapiro I, Folstein MF. 1991. Delirium: Phenomenologic and etiologic subtypes. *IntPsychogeriatr*. **3**:325.

Sanchez-Fortun S, Sanz-Barrera F, Barahona-Gomariz MV. 1995. Acute toxicities of selected insecticides to the aquatic arthropod *Artemiasalina*. *Bull Environ Contam Toxicol*. **54**: 76–82.

Sassa S, Fujita H, Kappas A. 1989. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: Kotyk A, Skoda J, Paces V, Kostka V. (Eds.), *Highlights of Modern Biochemistry*. 329–338.



Seena EB, PrathapachandraKurup MR, Suresh E. 2008. Crystal Study of Salicylaldehyde N(4)-Phenylthiosemicarbazone. *J Chem Crystallogr.* **38**: 93-96.

Slotkin TA, Miller DB, Fumagalli F, McCook EC, Zhang J, Bissette G, Seidler FJ. 1999. Modeling geriatric depression in animals: Biochemical and behavioral effects of olfactory bulbectomy in young versus aged rats, *JPharmacol ExpTher.* **289**: 334.

Stokes WS. 2002. Humane endpoint for laboratory animals used in regulatory testing. *ILAR J*, **43**: S31-S38.

Swarup V, Srivastava AK, Padma MV, Rajeswari MR. 2011. Quantification of circulating plasma DNA in Friedreich's ataxia and spinocerebellar ataxia types 2 and 12. *DNA Cell Biol.* **30**:389–94.

Teo S, Stirling D, Thomas S, Hoberman A, Kiorpes A, Khetani V. 2002. A 90-day oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D,L- methylphenidate in Sprague–Dawley rats. *Toxicology*, **179**: 183–196.

Thilakarathna SH, Wang Y, VasanthaRupasinghe HP, Ghanam K. 2012. Apple peel flavonoid- and triterpeneenriched extracts differentially affect cholesterol homeostasis in hamsters. *J. Funct Foods.* **4**: 963–971.

Tofovic SP, Jackson EK. 1999. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, **33**:360–366.

Vaziri ND. 2006. Dyslipidemia of chronic renal failure: the nature, mechanisms and potential consequences. *Am J Physiol Renal Physiol*. **290**:262–272.

Vickers AEM. 1994. Use of human organ slices to evaluate the biotransformation and drug-induced side-effects of pharmaceuticals. *Cell Biol Toxicol*. **10**: 407-14.

Walsh RN, Cummins RA. 1976. The open-field test: a critical review. *Psychol Bull*. **83**: 482–504.

Yu Y, Kalinowski DS, Kovacevic Z, Siafakas AR, Jansson PJ, Stefani C, Lovejoy DB, Sharpe PC, Bernhardt PV, Richardson DR. 2009. Thiosemicarbazones from the old to new: iron chelators that are more than just ribonucleotide reductase inhibitors. *J Med Chem*. **52**:5271-5294.

Zhong Z, Zhong Z, Xing R, Li P, Mo GL. 2010. The preparation and antioxidant activity of 2-[phenylhydrazine (or hydrazine)-thiosemicarbazone]-chitosan. *Int J Biol Macromol*. **47**: 93-97.

**Table**

Table 1 – Effects of SPTS on hematological analysis of rats exposed to SPTS.

	<b>Control</b>	<b>5mg/kg</b>	<b>10mg/kg</b>	<b>20mg/kg</b>
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	5,92±3,83	8,70±2,38	8,82±2,21	9,32±2,86
<b>Erythrocytes (10<sup>6</sup>/μL)</b>	5,06±2,28	5,19±1,39	5,17±1,05	5,42±1,51
<b>Hematocrit (%)</b>	30,47±13,63	30,80±8,29	31,77±8,01	33,24±9,59
<b>Platelet (10<sup>3</sup>/μL)</b>	528,75±327,29	572,20±147,53	548,00±114,35	687,40±226,38
<b>Leukocytes (10<sup>3</sup>/μL)</b>	5,92±3,61	7,28±1,92	6,67±1,30	7,16±2,38

Data are expressed as means ± S.D. from 5-6 animals in each group.

## Legends

Figure 1 – Chemical structure of the compound Salicylaldehyde-4-phenylthiosemicarbazone.

Figure 2 - Test procedure with a starting dose of 300mg/kg body weight by Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 423. Fonte: OECD 423.

Figure 3 – Effects of the compound SPTS in MTT assay. Data are expressed as means  $\pm$  S.D

\*Denotes  $p < 0.05$  as compared to the control group (One-way ANOVA/Dunnet post hoc test).

Figure 4 – Effects of the compound SPTS in dsDNA assay. Data are expressed as means  $\pm$  S.D. \*Denotes  $p < 0.05$  as compared to the control group (One-way ANOVA/Dunnet post hoc test).

Figure 5 - Effects of SPTS on hepatic (A), renal (B) and cerebral (C) GST activities of rats. Data are expressed as means  $\pm$  S.D. from 5-6 animals in each group. \*Denotes  $p < 0.05$  as compared to the control group (One-way ANOVA/Duncan).

Figure 6 - Effects of SPTS on hepatic (A), renal (B) and cerebral (C) ascorbic acid levels of rats. Data are expressed as means  $\pm$  S.D. from 5-6 animals in each group. \*Denotes  $p < 0.05$  as compared to the control group (One-way ANOVA/Duncan).

Figure 7 - Effects of SPTS on hepatic (A), renal (B) and cerebral (C) NPSH levels of rats. Data are expressed as means  $\pm$  S.D. from 5-6 animals in each group. \*Denotes  $p < 0.05$  as compared to the control group (One-way ANOVA/Duncan).

Figure 8 - Effects of SPTS on hepatic, renal and cerebral lipid peroxidation levels of rats exposed to SPTS. Data are expressed as means  $\pm$  S.D. from 5-6 animals in each group. \*Denotes  $p < 0.05$  as compared to the control group (One-way ANOVA/Duncan).

Figure 9 - Effects of SPTS on triglycerides levels of rats. Data are expressed as means  $\pm$  S.D. from 5-6 animals in each group. \*Denotes  $p < 0.05$  as compared to the control group (One-way ANOVA/Duncan).

Figure 10 - Effects of SPTS on weight gain body of rats. Data are expressed as means  $\pm$  S.D. from 5-6 animals in each group. \* Denotes  $p < 0.05$  as compared to the control group (One-way ANOVA/Duncan).

Figure 11 - Effects of SPTS on open field (rearings and crossings) of rats. Data are expressed as means  $\pm$  S.D. from 5-6 animals in each group. \* Denotes  $p < 0.05$  as compared to the control group (One-way ANOVA/Duncan).

Figures

Figure 1 –

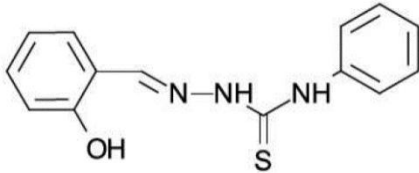


Figure 2 –

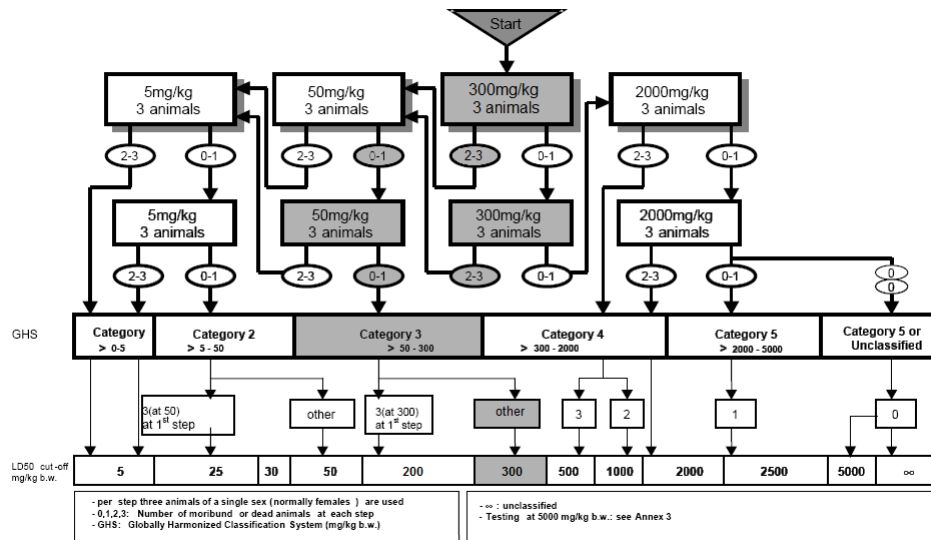


Figure 3 –

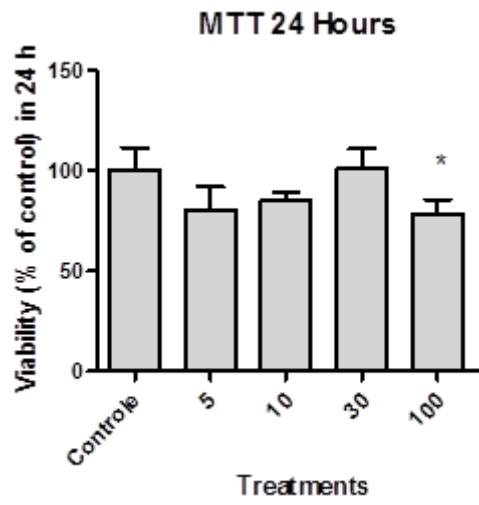


Figure 4 –

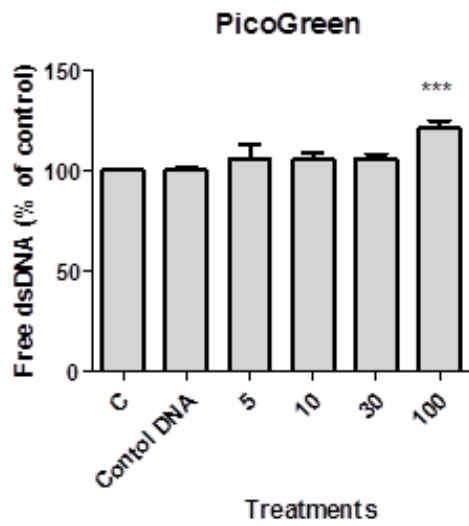


Figure 5–

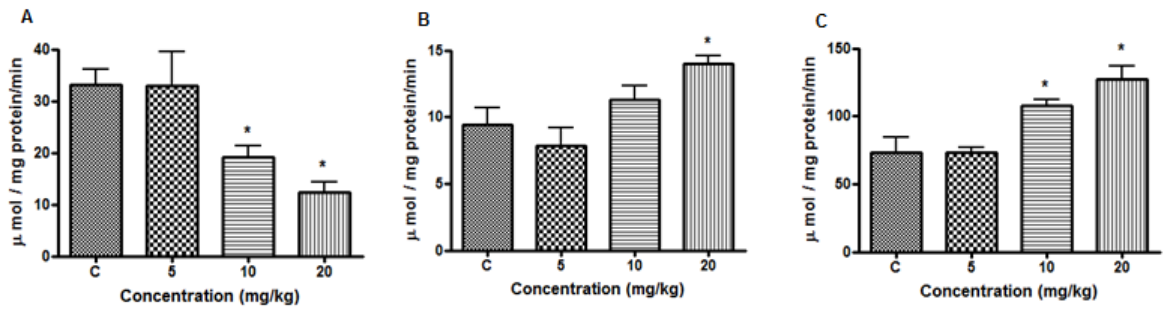


Figure 6–

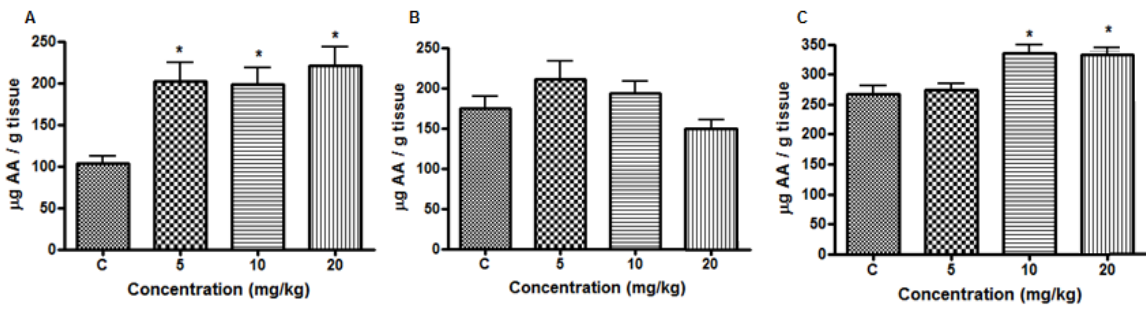


Figure 7 -

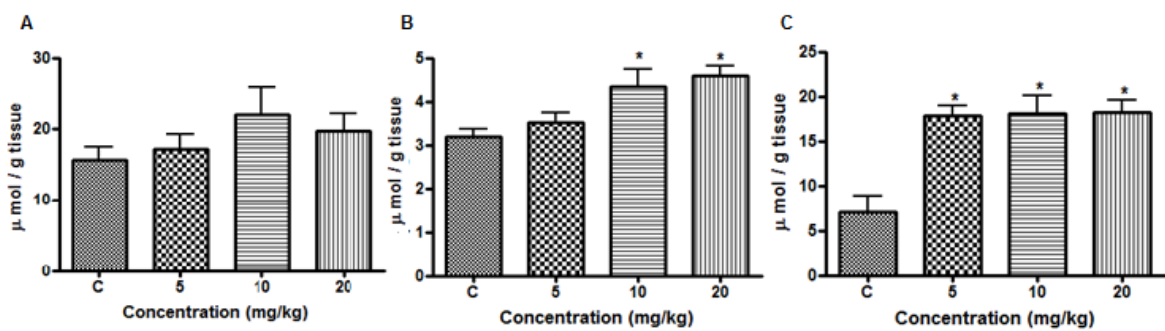




Figure 8 -

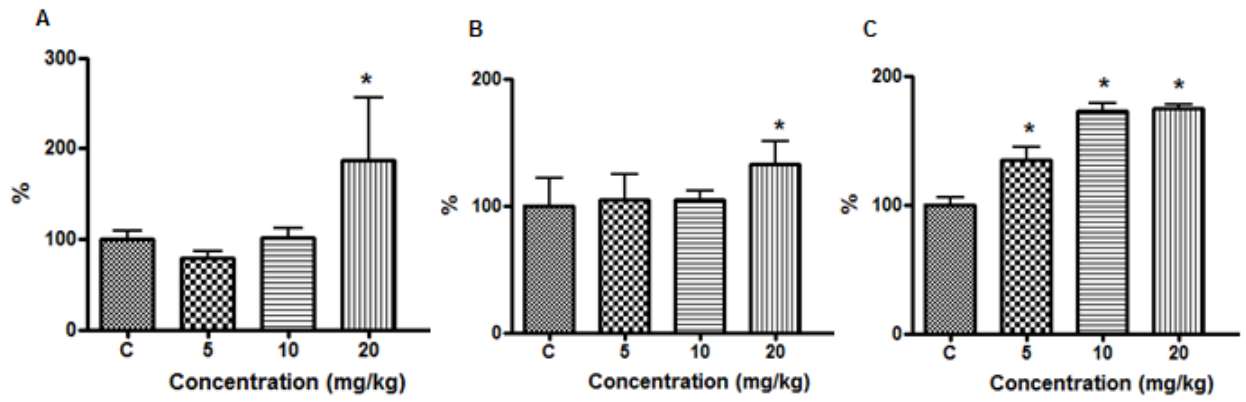


Figure 9-

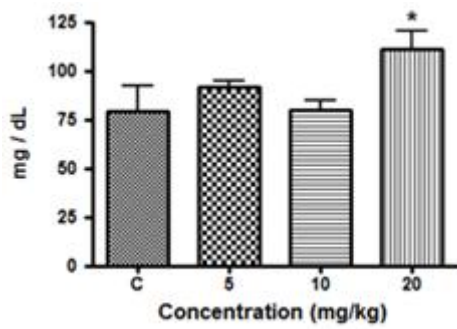


Figure 10-

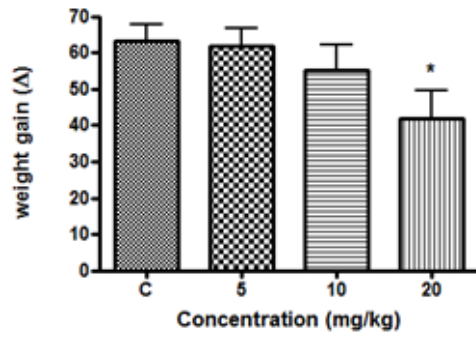
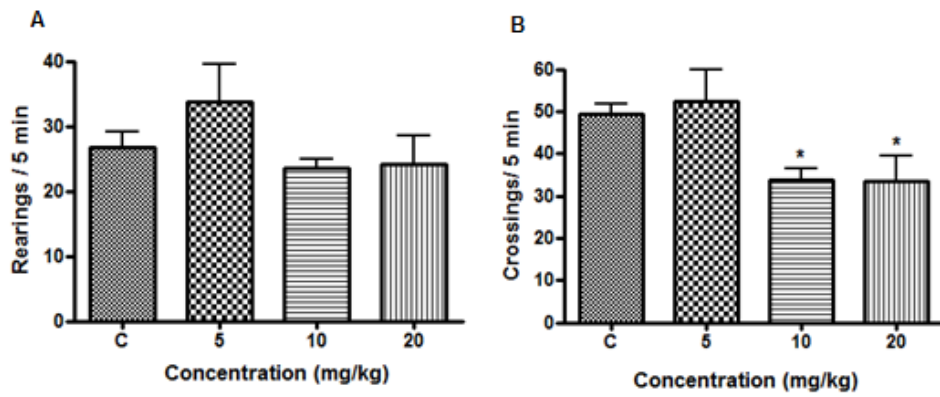


Figure 11 -



## IV CONCLUSÕES

Em relação a exposição ao composto SPTS:

-Na toxicidade *in vitro* verificamos que o composto apresentou uma  $CL_{50}$  baixa, demonstrando um potencial tóxico e, além disso, apresentou alterações na viabilidade celular e efeitos genotóxicos.

- Na toxicidade aguda conseguimos estimar uma  $DL_{50}$  de 50-300mg/kg, indicando que nosso composto apresenta uma taxa de mortalidade intermediária. A exposição aguda ao composto SPTS não causou importantes alterações no perfil oxidativo dos animais, assim como não alterou as análises bioquímicas e hematológicas, demonstrando baixa toxicidade aguda na dose testada.

- Na avaliação da toxicidade subaguda, importantes alterações foram observadas, tais como no perfil lipídico, nos parâmetros de estresse oxidativo e em análises comportamentais, sugerindo um risco maior deste composto ao ser administrado em doses repetidas.

## REFERENCIAS

- ALBERT, B.; JONHSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**, 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 945-1345. 2004.
- ANDERSON, J.E.; GOETZ, A.; MCLAUGHLIN, J.L.; SUFFNESS, M. A blind comparasion of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities and antitumorprescreens. **Phytochem Anal**, v. 2, p. 107-111. 1991.
- BARCELOS, R. P. et al. Isatin-3-N4-benzilthiosemicarbazone, a non-toxic thiosemicarbazone derivative, protects and reactivates rat and human cholinesterases inhibited by methamidophos *in vitro* and in silico. **Toxicol In Vitro**, v. 26, p. 1030-103, 2012.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C.; OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. Ed. Atheneu, São Paulo. p. 61-70. 1996.
- BEDNARCZUK, V.O.; VERDAM, M.C.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 11.
- BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: perfil farmacológico e usos clínicos. **Quím Nova**, v. 27, p. 461-471, 2004.
- BERALDO, H.; GAMBINOD, D. The Wide Pharmacological Versatility of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes. **Mini-Rev. Med. Chem.** v. 4, p. 31-39. 2004.
- BHARTI, N.; HUSAIN, K.; GARZA, M. T. G.; VEGA, D. E. C.; GARZA, J. C.; CARDENAS, B. D. M.; NAQVI, F. Synthesis and *in vitro* antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 12, 3475. 2002.
- BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. **Alternatives to laboratory animals**, v. 31, n. 3, p. 277-281. 2003.
- BORGES, R.; ABRAS, A.; BERALDO, H.J. **Braz. Chem. Soc.**, v.8, p. 33-38, 1997.

BRITO, V. B., DA ROCHA, J. B., PUNTEL, G. O., DA LUZ, S. C., BARBOSA, N. B., DE CARVALHO, N. R., & FOLMER, V. Inhibition of delta-aminolevulinatase is not closely related to the development of hyperglycemia in alloxan-induced diabetic mice. **Exp Toxicol Pathol**, v. 63(5), p. 443-451, 2011.

BUCHELI, T. D.; FENT, K. Induction of Cytochrome-P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Crit Rev Env Sci Tec**, v.25, p.201-268, 1995.

CAVALCANTE, M.F.; OLIVEIRA, M.C.C.; VELANDIA, J.R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina*. **Quím Nova**, v. 23, n. 1, 2000.

CAZARIN, C. C. K. et al. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n. 3, jul/set. 2004.

DECONTI, R.C. Clinical and pharmacological studies with 5-hydroxy-2-formylpyridine thiosemicarbazone. **Cancer Res**, v. 32, p. 1455-1462, 1972.

DIAS, A.; AIRES, C.; SILVA, M.; CATARINO, R.; Testes de toxicidade em *Artemia salina*: Contaminante (K<sub>2</sub>CrO<sub>7</sub>) e Efluentes químicos (Tratado e Não tratado). **Biologia Marinha e Pescas**, 2002.

DIVOLIC, I.;RUBCIC, M.; VRDOLJAK, V.;PAVELIC, S.K.;KRALJ, M.; PIANTANIDA, I.; CINDRIC, M. Novel thiosemicarbazone derivatives as potential antitumor agents: Synthesis, physicochemical and structural properties, DNA interactions and antiproliferative activity. **Bioorg Med Chem**, v. 16, p.5189-5198. 2008.

DU, X. et al. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **J Med Chem**. v.45, p.2695, 2002.

EATON, D. L.; KLAASSEN, C. D. **Principles of toxicology**. In: Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 5<sup>a</sup> ed. McGraw-hill, New York. 1995.

FEUN, L.; MODIANO, M.; LEE, K.; MAO, J.; MARINI, A.; SAVARAJ, N.; PLEZIA, P.; ALMASSIAN, B.; COLACINO, E.; FISCHER, J.; MACDONALD, S. Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. **Cancer Chemother. Pharmacol.** v. 50 (3), p. 223-229. 2002.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FRAZIER, J. M. Applications to safety evaluation. **In vitro Toxicity testing**, New York, Marcel Dekker, Inc. p. 300, 1992.

FREI, B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. **Am J Med**, v. 97(3A), p. 5S-13S, 1994.

FREITAS, M.L. et al. Effects of butane-2,3-dione thiosemicarbazone oxime on testicular damage induced by cadmium in mice. **J Toxicol Sci.**, v. 37, p. 899-910, 2012.

GEORGIU, C.D.; PAPAPOSTOULOU, I.; GRINTZALIS, K. Protocol for the quantitative assessment of DNA concentration and damage (fragmentation and nicks), **Nat. Protoc.** v. 4, p. 125-131. 2009.

GHOSH, S, et al. Syntheses and evaluation of glucosylarylthiosemicarbazide and glucosylthiosemicarbazone derivatives as antioxidant and anti-dyslipidemic agents. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 19, p. 386-389, 2009.

GOERING, P. L. Lead protein interactions as a basis for lead toxicity. **Neurotoxicology**, v. 14, p. 45-60, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 2. ed. New York: Clarendon Press, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4. ed. Oxford University Press, Oxford, 2007.

HARTL, M.; HUMPF, H.; Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 1097-1102.

HEINEMANN, I. U., JAHN, M., & JAHN, D. The biochemistry of heme biosynthesis. **Arch Biochem Biophys**, v. 474(2), p. 238-251, 2008.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radic Biol Med**, v. 9, p. 515-40, 1990.

JOSEPHY, P. D. **Molecular Toxicology**, New York: Oxford University Press, p. 368, 1997.

KALINOWSKI, D.S.; RICHARDSON, D.R. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. **Pharmacol Rev**, v. 57, p. 547-583, 2005.

KARAH, N. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new 5-nitroindole-2,3-dione derivatives. **Eur. J. Med. Chem.** v. 37, p. 909-918. 2002.

KARATAS, F.; KOCA, M.; KARA, H.;SERVI, S. Synthesis and oxidant properties of novel (5-bromobenzofuran-2-yl) (3-methyl-3-mesitylcyclobutyl) ketonethiosemicarbazone. **Eur. J Med Chem**, v. 41, p.664–669, 2006.

KASUGA, N. C.; SEKINO, K.; ISHIKAWA, M.; HONDA, A.; YOKOYAMA, M.; NAKANO, S.; SHIMADA, N.; KOUMO, C.; NOMIYA, K. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 12 zinc(II) complexes with four thiosemicarbazone and two semicarbazone ligands. **J. Inorg. Biochem** v. 96, 298-310. 2003.

KLAASSEN, C.D. Princípios de toxicologia e tratamento do envenenamento. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 11. ed. 2006.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol Pathol**, v. 30, p. 620-50, 2002.

LAITANO, K. S.; MATIAS, W. G. Testes de Toxicidade com *Daphnia magna*: Uma Ferramenta para Avaliação de um Reator Experimental UASB. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1 (1), p. 43-47, 2006.

LAM, L. K. T.; SPARNINS, V.L.; WATTENBERG, L. W. Isolation and identification of kahweolpalmitate and cafestolpalmitate as active constituents of green coffee beans

that enhance glutathione s-transferase activity in the mouse. **Cancer Research**, v. 42, p. 1193-1198, 1982.

LAM, L. K. T. et al. Inhibition of chemically induced carcinogenesis by 2-n-heptylfuran and 2-n-butylthiophene from roast beef aroma In: Mussinan, C. J.; KEELAN, M. E, (Eds). **Sulfur Comp. in Food**. Washington, DC: ACS Symposium Series, p. 278-291, 1994.

LEWAN, L.; ANDERSSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Altern. Lab. Anim**, v. 20, p. 297–301. 1992.

LHULLIER, C.; HORTA, P.A.; FALKENBERG, M.; Avaliação de extratos demacroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*; **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 158-163, 2006.

LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **J Neurochem**, v. 69, p. 581-93, 1997.

LOPES, W.B.; MORONI, F.T.; BRANDEBURGO, M.I.H.; HAMAGUCHI, A. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. **Horizonte científico**, Uberlândia, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2002.

LUNA, J.S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 199-206, 2005.

MCLAUGHLIN, J.L., ROGERS L.L., ANDERSON J.E. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals, **Drug Information Journal**, v. 32, p. 513-524, 1998.

MONCADA, S.; HIGGS, A. Nitric oxide: role in human disease. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2001. Disponível em: [www.els.net](http://www.els.net) em 20 dez 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, p. 55–63. 1983.

NIKI, E. Antioxidants and atherosclerosis. **Biochem. Soc. Trans**, v. 32, p.156-159, 2004.  
NORDBERG, J.; ARNER, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, p. 1287-312, 2001.



OGA, S. (Ed.) - **Fundamentos de Toxicologia**. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu. 2008.  
OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, p. 351-358, 1979.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD).  
Guideline 407. Repeated-dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. 468 Adopted by the Council on 27th July 1995.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD).  
Guideline 423. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 470 Adopted by the Council on 17th, Dec 2001.

PEDRIDO, R. Pentadentatethiosemicarbazones as versatile chelating systems. A comparative structural study of their metallic complexes. **Dalton Trans**, v. 47, p. 6776-6787, 2008.

PRATHIMA, B. Copper(II) and nickel(II) complexes of benzyloxybenzaldehyde-4-phenyl-3-thiosemicarbazone: Synthesis, characterization and biological activity. **Spectrochim. Acta A. Mol Biomol Spectrosc.**, v. 77, p. 248-252, 2010.

PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P.A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences**, v. 43, n. 2, p. 86-101. 1998.

REISCHL, E.; DAFRE, A. L.; FRANCO, J. L.; WILHELM FILHO, D. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiol from vertebrate hemoglobins. **Comp. Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 146, p.22-53, 2007.

REPETTO, G.; REPETTO, M. **Toxicologia Avanzada**. Capítulo 2: Métodos Alternativos: estudios toxicológicos *in vitro*. Madrid: Ediciones Días de Santos. p. 37-45, 1995.

SANCHEZ-FORTUN, S.; SANZ-BARRERA, F.; BARAHONA-GOMARIZ, M.V. Acute toxicities of selected insecticides to the aquatic arthropod *Artemiasalina*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 54, p. 76–82. 1995.

SASSA, S.; FUJITA, H; KAPPAS, A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In.: **Highlights of modern biochemistry**, v. 1, p. 329-338, 1989.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A. R. Raciais livres de oxigênio e exercício: mecanismo de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte*, v. 10, p.308-313, 2004.  
STOKER, R; KEANEY-JR, J. F. Role of oxidative modifications intherosclerosis. **Physiol Rev**, v. 84, p.138-178, 2004.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew Chem Int Ed Engl**, v.25, p.1058-1071. 1986.

TEITZ, Y.; RONEN, D.; VANSOVER, A.; STEMATSKY, T.; RIGGS, J. L. Inhibition of human immunodeficiency virus by *N*-methylisatin- $\beta$ 4':4'-diethylthiosemicarbazone and *N*-allylisatin- $\beta$ -4':4'-diallythiosemicarbazone. **Antiviral Res.** v. 24, 305-314. 1994.

TENÓRIO, R. P.; GÓES, A. J. S.; DE LIMA, J. G.; DE FARIA, A. R.; ALVES, A. J.; DE AQUINO, T. M. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Quím. Nova.** v. 28(6), p. 1030-1037. 2005.

TIMBRELL, J. **Principles of Biochemical Toxicology**, 3 ed, London: Taylor & Francis, 394p, 2000.

VALADARES, M. C. Acute toxicity evaluation: strategies post "DL<sub>50</sub> test era". **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98. 2006.

WATTENBERG, L.M. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. **Cancer Research**, v. 43, p. 2448-2453, 1983.

WHEATLEY, J. B. et al. Examination of glutathione S-transferaseisoenzyme profiles in human liver using high-performance affinity chromatography. **J Chromatogr A**, v. 663, p. 53-63, 1994.

WNUK, M.; LEWINSKA, A.; OKLEJEWICZ, B.; SLOTA, E.; BASTOSZ, G. Evaluations of the Cyto and Genotoxic Activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in Human Lymphocytes. **In Vitro. Mutat Res.** v. 679, p. 18-23. 2009.

WOREK, F. et al. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. **Biochem.Pharmacol**, v.11, p. 2237–2248, 2004.

YU, Y.; KALINOWSKI, D.S.; KOVACEVIC, Z.; SIAFAKAS, A.R.; JANSSON, P.J.; STEFANI, C.; LOVEJOY, D.B.; SHARPE, P.C.; BERNHARDT, P.V.; RICHARDSON,

D.R. Thiosemicarbazones from the old to new: iron chelators that are more than just ribonucleotide reductase inhibitors. **J Med Chem**, v. 52, p. 5271-5294. 2009.