

Adding diphenyl diselenide in the diets of quails improves the quality of meat

La adición de diseleniuro de difenilo en las dietas de codorniz mejora la calidad de la carne

Lenilson da F. Roza¹ M.Sc; Aleksandro S. Da Silva^{1,2*} Ph.D; Marcos J. Migliorini¹ M.Sc; Nathieli B. Bottari² M.Sc; Patricia Glombowsky¹ M.Sc; Mauricio Baretta¹ M.Sc; Fernando de C. Tavernari^{1,3} Ph.D; Lenita M. Stefani¹ Ph.D; Marcel M. Boiago¹ Ph.D.

¹University of Santa Catarina State, UDESC, Department of Animal Science, Program in Animal Science, Chapecó, SC, Brazil. ²Federal University of Santa Maria, UFSM, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Program in Toxicological Biochemical, Santa Maria, RS, Brazil. ³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Swine and Poultry, Concórdia, SC, Brazil. Correspondence: dasilva.aleksandro@gmail.com

Received: November 2017; Accepted: June 2018.

ABSTRACT

Objective. Diphenyl diselenide (Ph_2Se_2) is an organic selenium compound that is known for its antioxidant characteristics. Thus, the aim of this study was to evaluate whether Ph_2Se_2 in quail (*Coturnix japonica*) diets influences the oxidative/antioxidant status and meat quality. **Materials and methods.** Four diets (0; 0.3; 0.6; 0.9 ppm Ph_2Se_2) were provided to 56 male quails (*Coturnix japonica*) distributed in a completely randomized design with 14 repetitions in order to check whether $(\text{PhSe})_2$ would change their blood and tissue oxidative/antioxidant status, which would lead to an improvement in the meat quality. **Results.** Adding Ph_2Se_2 in diets led to increased antioxidant activity of enzymes such as catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase, which consequently reduced oxidative levels in blood and tissues. Besides that, we observed an improvement in the quail meat quality; in other words, we observed an increased ability to hold water, a reduction in water loss from cooking, and reduced intensity of the yellow color in the breasts of birds that were fed with Ph_2Se_2 . **Conclusions.** Therefore, we concluded that the antioxidant defense improvement in tissues that was provided by Ph_2Se_2 has a beneficial effect on meat quality.

Keywords: Antioxidant; meat quality; organic selenium (*Source: CAB, MeSH*).

RESUMEN

Objetivo. El diseleniuro de difenilo (Ph_2Se_2) es un compuesto de selenio orgánico que es conocido por sus características antioxidantes. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar si Ph_2Se_2 en las dietas de codorniz (*Coturnix japonica*) influye en el estado oxidativo/antioxidante y la calidad de la carne. **Materiales y métodos.** Se proporcionaron cuatro dietas (0; 0.3; 0.6; 0.9 ppm Ph_2Se_2) a 56 codornices machos (*Coturnix japonica*) distribuidas en un diseño completamente aleatorizado con 14 repeticiones para verificar si Ph_2Se_2 cambiaría su sangre y tejido oxidativo/antioxidante, estado, lo que llevaría a una mejora en la calidad de la carne. **Resultados.** La adición de Ph_2Se_2 en las dietas provocó un aumento de la actividad antioxidante de enzimas como la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, lo que redujo los niveles de oxidación en la sangre y los tejidos. Además de eso, observamos una mejora en la calidad de la carne de codorniz; en otras palabras, observamos una mayor capacidad para retener agua, una reducción en la pérdida de agua debido a la cocción y una menor intensidad del color amarillo en las mamas de las aves que fueron alimentadas con Ph_2Se_2 . **Conclusiones.** Por lo tanto, concluimos que la mejora de la defensa antioxidante en los tejidos proporcionada por Ph_2Se_2 tiene un efecto beneficioso sobre la calidad de la carne.

Palabras clave: Antioxidante; calidad de la carne; selenio orgánico (*Fuente: CAB, MeSH*).

INTRODUCTION

Poultry meat quality might be verified by its visual, sensory, chemical, and microbiological aspects that are influenced by several factors such as animal nutrition. Protein oxidation or lipid peroxidation processes in the muscle tissue may lead to reduced meat quality due to changes in color, texture, flavor, or presence of toxic compounds (1). In addition to that, free radicals can be formed, leading to pathologies (2,3). In order to minimize these negative processes, vitamins E and C and microminerals, such as zinc and selenium, can be used in animal feed due to their antioxidant properties (4).

Selenium is an essential micromineral for the animal's metabolic processes due to its antioxidant potential in tissues. This effect is related to the glutathione peroxidase enzyme (GPx) that has selenium as a co-factor. According to the literature, GPx plays a central role neutralizing peroxides, and it is responsible for the regulation of oxidant levels (5), which may cause harm to cells and tissues.

Selenium exists in two forms: inorganic and organic, and in animal nutrition it is most commonly used as sodium selenite. Diphenyl diselenide (Ph_2Se_2) is an organic selenium compound that is seldom used in animal feed with proved antioxidant effect on laboratory animals (6,7) and fish (8, 9). Knowing that increasing levels of antioxidants in animals is important to reduce the tissue damage caused by oxidative reactions that may decrease meat quality leads to our hypothesis that Ph_2Se_2 in the diet of quails may increase the antioxidant status, and therefore, improve meat quality. Thus, the aim of this study was to evaluate whether Ph_2Se_2 in quail's diet (*Coturnix japonica*) could influence the oxidative/antioxidant status in the blood and tissues, as well as meat quality.

MATERIALS AND METHODS

Diphenyl diselenide. Diphenyl diselenide - Ph_2Se_2 (99.9%) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Local and animals. The experiment was conducted at the University of Santa Catarina State (UDESC/CEO), in the poultry sector. 56 Japanese quails (*Coturnix japonica*), 63 day-old, males, weighing 160 ± 20 grams were housed in metal cages under controlled temperature and ventilation. The study was carried out in the finishing phase of quails, with the purpose of increasing antioxidants in the meat, as well as their quality.

INTRODUCCIÓN

La calidad de la carne de aves de corral puede verificarse por sus aspectos visuales, sensoriales, químicos y microbiológicos, los cuales son influenciados por varios factores como la nutrición animal. Los procesos de oxidación de proteínas o peroxidación de lípidos en el tejido muscular pueden reducir la calidad de la carne debido a cambios en el color, textura, sabor o presencia de compuestos tóxicos (1). Además, se pueden formar radicales libres, lo que causa patologías (2,3). Para minimizar estos procesos negativos, las vitaminas E y C y los microminerales, como el zinc y el selenio, pueden utilizarse en la alimentación animal por sus propiedades antioxidantes (4).

El selenio es un micromineral esencial para los procesos metabólicos debido a su potencial antioxidante en los tejidos. Este efecto está relacionado con la enzima glutatión peroxidasa (GPx) que tiene al selenio como cofactor. Según la bibliografía, GPx desempeña un papel central en la neutralización de peróxidos, y es responsable de la regulación de los niveles de oxidantes (5), que pueden causar daños a las células y los tejidos.

El selenio existe en dos formas: inorgánico y orgánico, y en la nutrición animal se utiliza más comúnmente como selenito sódico. El diseleniuro de difenilo (Ph_2Se_2) es un compuesto orgánico de selenio que rara vez se utiliza en la alimentación animal y que ha demostrado tener un efecto antioxidante en animales de laboratorio (6,7) y peces (8,9). Saber que el aumento de los niveles de antioxidantes en los animales es importante para reducir el daño tisular causado por las reacciones oxidativas que pueden disminuir la calidad de la carne nos lleva a la hipótesis de que Ph_2Se_2 en la dieta de las codornices puede aumentar el estado antioxidante y, por ende, mejorar la calidad de la carne. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar si el Ph_2Se_2 en la dieta de codornices (*Coturnix japonica*) podría influir en el estado oxidativo/antioxidante en la sangre y tejidos, así como en la calidad de la carne.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseleniuro de difenilo. El diseleniuro de difenilo - Ph_2Se_2 (99.9%) fue comprado a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Ubicación y animales. El experimento fue realizado en la Universidad del Estado de Santa Catarina (UDESC/CEO), en el sector avícola. 56 codornices japonesas (*Coturnix japonica*) de 63 días de edad, machos, con un peso de 160 ± 20 gramos, se alojaron en jaulas metálicas a temperatura y ventilación controladas. El estudio se realizó en la fase de acabado de las codornices, con el fin de aumentar los antioxidantes en la carne, así como su calidad.

Experimental design and diets. The experimental design was randomized with four treatments (0; 0.3; 0.6; and 0.9 ppm of organic selenium (Se) in the form of diphenyl diselenide), and 14 repetitions (quails) divided in two cages (with 7 animals each). All treatments provided to the animals contained 0.3 ppm of inorganic Se in the form of sodium selenite (Na_2SeO_3) mixed into the vitamin-mineral premix. The experiment lasted 28 days, with half of the birds humanely euthanized on day 14 and the other half on day 28.

The experimental diets were prepared according to Rostagno et al (10), and had corn and soybean as the main ingredients. PhSe_2 was initially mixed with soybean in a Y mixer of 3 kg. This mixture and the remaining ingredients were mixed in another y mixer with 150 kg of capacity. The feed intake was controlled all treatment, being offered 25 g/quail/day.

Sampling. Seven birds from each treatment were humanely euthanized by cervical dislocation on days 14 and 28 of the experiment. Blood samples were collected by cardiac puncture and placed in tubes with anticoagulant (sodium citrate) for enzymatic analyzes, and in tubes without anticoagulant to obtain serum after centrifugation (3500 g for 10 min) for the remaining analyses. Liver and breast samples were also collected. The left liver lobe was homogenized in Tris-HCl buffer and centrifuged, and the supernatant was separated for further analyses. The left breast was used for biochemical analyses after being homogenized in Tris-HCl buffer using a methodology similar to the one used for liver samples. All samples were stored at -20°C . The right breast was used to evaluate meat quality after *rigor mortis* was set in.

Meat quality analyses. The meat quality was evaluated using deboned breast (*Pectoralis major*) meat regarding the following parameters: pH, water-holding ability, cooking loss, shear force, and color. To measure the pH, samples were analyzed in triplicate using a portable digital pH meter (Testo 205) with an electrode for piercing the meat.

Water-holding ability (WHA) was measured applying 10 kg pressure through a device for 5 min on 2 g of meat sample (11). After this procedure, the sample was weighed again, in order to determine water loss. Meat color was determined in three internal points of the *Pectoralis major* using a Minolta Chrome Meter CR 400 digital meter that measures the luminosity index (L), red intensity (a^*), and yellow intensity (b^*).

Meat cooking loss was evaluated according to the methodology proposed by Cason et al (12). Briefly, breast samples previously weighed and

Diseño experimental y dietas. El diseño experimental fue aleatorizado con cuatro tratamientos (0; 0.3; 0.6; y 0.9 ppm de selenio orgánico (Se) en forma de diseleniuro de difenilo), y 14 repeticiones (codornices) divididas en dos jaulas (con 7 animales cada una). Todos los tratamientos administrados a los animales contenían 0,3 ppm de Se inorgánico en forma de selenito sódico (Na_2SeO_3) mezclado con la premezcla de vitaminas y minerales. El experimento duró 28 días, con la mitad de las aves sacrificadas humanamente el día 14 y la otra mitad el día 28.

Las dietas experimentales fueron preparadas de acuerdo con Rostagno et al (10), y tenían como ingredientes principales el maíz y la soja. El PhSe_2 se mezcló inicialmente con soja en una mezcladora Y de 3 kg. Esta mezcla y los ingredientes restantes se mezclaron en otra mezcladora Y de 150 kg de capacidad. La ingesta de alimento fue controlada durante todo el tratamiento, ofreciéndoseles 25 g/codorniz/día.

Muestreo. Siete aves de cada tratamiento fueron sacrificadas humanamente por dislocación cervical en los días 14 y 28 del experimento. Se recogieron muestras de sangre mediante punción cardíaca y se colocaron en tubos con anticoagulante (citrato de sodio) para análisis enzimático, y en tubos sin anticoagulante para obtener suero después de la centrifugación (3500 g durante 10 min) para los análisis restantes. También se tomaron muestras de hígado y de pechuga. El lóbulo hepático izquierdo fue homogeneizado en tampón Tris-HCl y centrifugado, y el sobrenadante fue separado para análisis adicionales. El seno izquierdo se utilizó para análisis bioquímicos después de ser homogeneizado en tampón Tris-HCl utilizando una metodología similar a la utilizada para muestras de hígado. Todas las muestras se almacenaron a -20°C . Se utilizó la pechuga derecha para evaluar la calidad de la carne después de fijar el *rigor mortis*.

Análisis de calidad de la carne. La calidad de la carne fue evaluada utilizando la pechuga deshuesada (*Pectoralis major*) con los siguientes parámetros: pH, capacidad de retención de agua, pérdida por cocción, fuerza cortante y color. Para medir el pH, las muestras fueron analizadas por triplicado usando un medidor digital portátil de pH (Testo 205) con un electrodo para perforar la carne.

La capacidad de retención de agua (WHA) se midió aplicando 10 kg de presión a través de un dispositivo durante 5 minutos sobre 2 g de muestra de carne (11). Después de este procedimiento, la muestra fue pesada de nuevo, para determinar la pérdida de agua. El color de la carne se determinó en tres puntos internos del *Pectoralis major* usando un medidor de cromo CR 400 de Minolta que mide el índice de luminosidad (L), la intensidad roja (a^*) y la intensidad amarilla (b^*).

packed in plastic bags were placed in a water bath at 85°C for 30 minutes. After that, the samples were weighed again, and the amount of water lost in the cooking process was determined by the differences in initial and final weights. After the meat was taken from the water bath and the breast samples were at room temperature, the procedures for determining the meat shear force started. To do so, the samples were cut into pieces of 3 cm² each, using a texturometer (Texture Analyzer TA-XT plus) coupled with a Warner-Bratzler probe, in which the fibers were placed perpendicularly to the blades. After the samples were cut, the maximum force (gf) applied by the device to cut the sample was recorded. This value was divided by the sample area (cm²), in order to express the shear force as gf/cm².

Protein determination. Protein content was determined by the Coomassie blue method using bovine sera albumin as the standard. The protein supernatant 1 (S1) of tissue was kept as 0.6-0.8 mg/mL of protein until the realization of the analyses.

Dichlorofluoresceine levels. 2'-7'-Dichlorofluorescein (DCFH) levels were determined as an index of the peroxide produced by cellular components to determinate reactive specie oxygen (ROS), based on the deacetylation of the probe DCFH-DA, and its subsequent oxidation by reactive species to DCFH, a highly fluorescent compound (13). The serum (10 µl), liver and muscle (0.8 µg of protein) were added to a medium containing Tris-HCl buffer (10 mM; pH 7.4) and DCFH-DA (1 mM). After DCFH-DA addition, the medium was incubated in the dark for 1 h until the beginning of the procedure to measure the fluorescence (excitation at 488 nm and emission at 525 nm, and both slit with 1.5 nm of widths). The results were expressed as U DCF/mg protein.

Determination of thiobarbituric acid reactive substance levels. The lipid peroxidation was estimated by measuring Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) and expressed in terms of malondialdehyde (MDA) content, an end product of fatty acid peroxidation, that reacts with TBA to form a colored complex. The serum, and muscle and liver tissue (200 µL of S1) were incubated at 95°C for 60 min in acid medium containing 8.1% sodium dodecyl sulfate, 0.5 ml of acetic acid buffer (500 mM, pH 3.4), and 0.6% TBA. TBARS levels were measured at 532 nm, and the absorbance was compared with the standard curve using malondialdehyde (14). The results were expressed as nanomoles of malondialdehyde/mg of protein.

La pérdida por cocción de la carne se evaluó de acuerdo con la metodología propuesta por Cason et al (12). Brevemente, las muestras de pechuga previamente pesadas y empacadas en bolsas de plástico se colocaron en un baño de agua a 85°C durante 30 minutos. Después de esto, las muestras se pesaron de nuevo, y la cantidad de agua perdida en el proceso de cocción se determinó por las diferencias en los pesos inicial y final. Después de tomar la carne del baño de agua y de que las muestras de pechuga estuvieran a temperatura ambiente, se iniciaron los procedimientos para determinar la fuerza cortante de la carne. Para ello, las muestras se cortaron en trozos de 3 cm² cada uno, utilizando un textuómetro (Analizador de Textura TA-XT plus) acoplado a una sonda Warner-Bratzler, en la que las fibras se colocaron perpendicularmente a las cuchillas. Después de cortar las muestras, se registró la fuerza máxima (gf) aplicada por el dispositivo para cortar la muestra. Este valor fue dividido por el área de la muestra (cm²), para expresar la fuerza cortante como gf/cm².

Determinación de proteínas. El contenido de proteínas se determinó por el método azul de Coomassie utilizando suero albúmina de bovino como patrón. La proteína sobrenadante 1 (S1) del tejido se mantuvo en 0,6-0,8 mg/mL de proteína hasta la realización de los análisis.

Niveles de diclorofluoresceína. Se determinaron los niveles de 2'-7'-Diclorofluoresceína (DCFH) como índice del peróxido producido por los componentes celulares para determinar el oxígeno reactivo de la especie (ROS), basado en la desacetilación de la sonda DCFH-DA, y su posterior oxidación por especies reactivas a DCFH, un compuesto altamente fluorescente (13). El suero (10 µl), el hígado y el músculo (0.8 µg de proteína) se añadieron a un medio que contenía tampón de Tris-HCl (10 mM; pH 7.4) y DCFH-DA (1 mM). Después de la adición de DCFH-DA, el medio se incubó en la oscuridad durante 1 h hasta el inicio del procedimiento para medir la fluorescencia (excitación a 488 nm y emisión a 525 nm, y ambas ranuras con 1.5 nm de ancho). Los resultados se expresaron como proteína U DCF/mg.

Determinación de los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. La peroxidación de lípidos fue estimada midiendo la Sustancia Reactiva del Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) y expresada en términos de contenido de malondialdehído (MDA), un producto final de la peroxidación de ácidos grasos, que reacciona con TBA para formar un complejo coloreado. El suero y el tejido muscular y hepático (200 µL de S1) se incubaron a 95°C durante 60 min en un medio ácido que contenía 8,1% de sulfato de dodecilo sódico, 0,5 ml de tampón de ácido acético (500 mM, pH 3,4) y 0,6% de TBA. Los niveles de TBARS se midieron a 532 nm, y la absorbancia se comparó con la curva estándar

Glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase activities. Glutathione peroxidase (GPx) activity in blood, liver, and muscle samples were determined using the method based on NADPH oxidation, which it is indicated by a decrease in the absorbance at 340 nm (15). Catalase (CAT) activity was determined in blood, liver and muscle by the decomposition of H_2O_2 at 240 nm according to the method used by researchers (14,15). Superoxide dismutase (SOD) activity was spectrophotometrically quantified in blood, liver and muscle samples by determining the inhibition of auto-oxidation of epinephrine to adrenochrome at an alkaline pH at 480 nm (14,15). For the enzymatic assay of GPx, CAT and SOD, 10–40 μ g of protein was used.

Ca²⁺-ATPase activity. Ca²⁺-ATPase activity was measured in muscle tissue as previously described by Rohn in 1993, with minor modifications (16). Briefly, the assay medium consisted of Tris-HCl buffer (30 mM, pH 7.4), 0.1 EGTA, 3 MgCl₂ and 100 μ g of muscle protein in the presence or absence of 0.4 CaCl₂, in a final volume of 200 μ L. The reaction was started by the addition of adenosine triphosphate (ATP) to a final concentration of 3 mM. After 60 min at 37°C, the reaction was stopped by the addition of 70 μ L of 50% (w/v) trichloroacetic acid. Saturating substrate concentrations were used, and the reaction was linear with protein concentration and time. The Ca²⁺-ATPase activity was determined by subtracting the activity measured in the presence of Ca²⁺ from that determined in the absence of Ca²⁺ (no Ca²⁺ added plus 0.1 mM EGTA) and expressed as nmol of Pi/min/mg of protein.

Statistical analysis. The data were tested for normality (Shapiro) and showed normal distribution. Therefore, analysis of variance was used followed by Tukey's test in order to check the data accuracy using the Statistical Analysis System (SAS version 9.4). Results were considered to be significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Meat quality. No effects were found on pH and shear force from adding diphenyl diselenide in the diet of quails ($p > 0.05$) in both evaluated periods (Table 1). Parameters such as luminosity (L) and red intensity (a*) of meat were not found to have effects either ($p > 0.05$). On the 14th day, there was no reduction in yellow intensity (b*) as Ph₂Se₂ levels were increased. The lowest intensity of yellow was found ($p < 0.05$) in the highest dosage of Ph₂Se₂ (0.9 ppm), with no differences from the remaining dosages ($p > 0.05$). This effect on the yellow intensity did not remain on the 28th day of

utilizando malondialdehído (14). Los resultados se expresaron como nanomoles de malondialdehído/mg de proteína.

Actividades de la glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa. La actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en muestras de sangre, hígado y músculo se determinó usando el método basado en la oxidación NADPH, que se indica por la disminución en la absorbancia a 340 nm (15). La actividad de la catalasa (CAT) se determinó en sangre, hígado y músculo mediante la descomposición de H₂O₂ a 240 nm según el método utilizado por los investigadores (14,15). La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se cuantificó espectrofotométricamente en muestras de sangre, hígado y músculo mediante la determinación de la inhibición de la autooxidación de la epinefrina adrenocromo a un pH alcalino de 480 nm (14,15). Para el ensayo enzimático de GPx, CAT y SOD, se utilizaron 10-40 μ g de proteína.

Actividad Ca²⁺-ATPasa. La actividad de Ca²⁺-ATPasa se midió en el tejido muscular como se describió previamente por Rohn en 1993, con modificaciones menores (16). En resumen, el medio de ensayo consistió de tampón Tris-HCl (30 mM, pH 7.4), 0.1 EGTA, 3 MgCl₂ y 100 μ g de proteína muscular en presencia o ausencia de 0,4 CaCl₂, en un volumen final de 200 μ L. La reacción se inició con la adición de trifosfato de adenosina (ATP) a una concentración final de 3 mM. Después de 60 minutos a 37°C, se detuvo la reacción añadiendo 70 μ L de ácido tricloroacético al 50% (p/v). Se utilizaron concentraciones de sustrato saturado, y la reacción fue lineal con la concentración de proteínas y el tiempo. La actividad de Ca²⁺-ATPasa se determinó restando la actividad medida en presencia de Ca²⁺ de la determinada en ausencia de Ca²⁺ (sin Ca²⁺ añadido más 0.1 mM EGTA) y expresada como nmol de Pi/min/mg de proteína.

Análisis estadístico. Los datos fueron evaluados para normalidad (Shapiro) y mostraron una distribución normal. Por lo tanto, se utilizó el análisis de varianza seguido de la prueba de Tukey para comprobar la precisión de los datos utilizando el Sistema de Análisis Estadístico (SAS versión 9.4). Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

Calidad de la carne. No se encontraron efectos sobre el pH y la fuerza cortante por la adición de diseleniuro de difenilo en la dieta de codornices ($p > 0.05$) para ambos períodos evaluados (Tabla 1). Parámetros como la luminosity (L) y la intensidad del rojo (a*) de la carne tampoco tuvieron efectos ($p > 0.05$). En el día catorce, no hubo reducción en la intensidad del amarillo (b*) ya que los niveles de Ph₂Se₂ aumentaron. La intensidad más baja de

the experiment, where no differences between the treatments were found ($p > 0.05$) (Table 1).

The water-holding ability of meat was found to improve when the lowest dosage of Ph_2Se_2 (0.3 ppm) was used, as compared to the diet with no organic selenium ($p < 0.05$) on day 14. On the other hand, such effect was not found on day 28, when treatments were not found to differ ($p > 0.05$) regarding this parameter (Table 1).

Cooking loss was found to have an effect in both evaluation periods. On day 14, only a lower cooking loss was verified in the lowest dosage (0.3 ppm) as compared to the 0.6 ppm ($p < 0.05$). Nonetheless, on day 28 of the experiment, an optimal level between the dosages was observed. With the inclusion of Ph_2Se_2 , cooking loss was reduced, with lower loss being found ($p < 0.05$) in the meat of animals that received the highest dosage (0.9 ppm) of Ph_2Se_2 , as compared to the control diet (Table 1).

Biochemical parameters. Results regarding oxidant and antioxidant markers in the serum/blood, liver, and muscles are presented in tables 2, 3, and 4. A decrease in reactive oxygen species (ROS) was observed until day 14th of the provision

amarillo se encontró ($p < 0.05$) en la dosis más alta de Ph_2Se_2 (0.9 ppm), sin diferencias con las dosis restantes ($p > 0.05$). Este efecto sobre la intensidad de amarillo no se mantuvo en el día 28 del experimento, donde no se encontraron diferencias entre los tratamientos ($p > 0.05$) (Tabla 1).

Se encontró que la capacidad de retención de agua de la carne mejoraba cuando se usaba la dosis más baja de Ph_2Se_2 (0.3 ppm), en comparación con la dieta sin selenio orgánico ($p < 0.05$) en el día 14^o. Por otro lado, tal efecto no se encontró en el día 28, cuando no se encontró que los tratamientos difirieran ($p > 0.05$) con respecto a este parámetro (Tabla 1).

Se encontró que la pérdida por cocción tuvo un efecto en ambos períodos de evaluación. En el día 14, sólo se verificó una pérdida de cocción menor en la dosis más baja (0.3 ppm) en comparación con 0.6 ppm ($p < 0.05$). No obstante, el día 28 del experimento, se observó un nivel óptimo entre las dosis. Con la inclusión de Ph_2Se_2 , se redujo la pérdida por cocción, encontrándose una pérdida menor ($p < 0.05$) en la carne de los animales que recibieron la dosis más alta (0.9 ppm) de Ph_2Se_2 , en comparación con la dieta de control (Tabla 1).

Parámetros bioquímicos. Los resultados con respecto a los marcadores oxidantes y antioxidantes en el suero/sangre, el hígado y los músculos se presentan en las tablas 2, 3 y 4. Se observó una disminución en las especies reactivas de oxígeno (ROS) hasta el día catorce de

Table 1. Meat quality of quails fed with different levels of diphenyl diselenide (Ph_2Se_2) for 14 and 28 days.

Variables	Days	CON	0.3 ppm	0.6 ppm	0.9 ppm	RMSE#	Valor p
pH	14	5.94	5.95	5.85	5.84	0.06	0.4503
	28	5.71	5.73	5.76	5.74	0.18	0.8835
Shear force (gf/cm ²)	14	1 269.69	1 390.51	1 281.88	1 169.64	87.25	0.7480
	28	1 676.15	1 650.08	2 032.93	1 598.43	139.67	0.1818
Cooking loss (%)	14	21.77 ^{ab}	17.84 ^b	23.24 ^a	22.43 ^{ab}	1.36	0.0428
	28	25.15 ^a	22.75 ^{ab}	22.32 ^{ab}	21.32 ^b	0.75	0.0115
Water-holding ability (%)	14	81.92 ^b	87.63 ^a	84.81 ^{ab}	82.91 ^b	1.01	0.0030
	28	82.93	85.62	87.03	83.86	2.08	0.5558
L*	14	34.46	32.70	33.34	34.90	3.35	0.2775
	28	35.20	34.13	33.45	34.09	1.07	0.7437
a*	14	18.10	17.78	17.41	17.23	0.45	0.5479
	28	16.33	15.96	15.78	16.4	0.75	0.9279
b*	14	5.93 ^a	5.24 ^{ab}	5.41 ^{ab}	4.99 ^b	0.23	0.0441
	28	5.15	4.89	4.88	5.16	1.42	0.9018

CON = Group of birds that was not given diphenyl diselenide diets; 0.3 ppm = Birds that were given 0.3 ppm Ph_2Se_2 in their diets; 0.6 ppm = Birds that were given 0.6 ppm Ph_2Se_2 in their diets; 0.9 ppm = Birds that were given 0.9 ppm Ph_2Se_2 in their diets; *L = Luminosity indices; a* = red intensity; b* = yellow intensity. #Root-mean-square error (RMSE). ^{a,b,c} Values within a row with different superscripts differ significantly at $p < 0.05$.

Table 2. Biochemical variables in the serum and blood of quails fed with different levels of diphenyl diselenide (Ph_2Se_2) for 14 and 28 days.

Variables	Days	CON	0.3 ppm	0.6 ppm	0.9 ppm	RMSE#	P-Value
ROS in serum (U DCF/mg of protein)	14	463.0 ^a	216.4 ^c	238.8 ^{bc}	292.7 ^b	39.6	0.0065
	28	376.8 ^a	190.4 ^b	113.2 ^b	451.7 ^a	26.2	0.0001
TBARS in serum (nmol MDA/mg of protein)	14	1.86 ^b	2.31 ^a	1.89 ^b	1.52 ^c	0.09	0.0082
	28	2.02 ^{ab}	2.06 ^a	1.81 ^b	2.08 ^a	0.10	0.0224
GPx in serum (ηmol NADPH/h/mg protein)	14	19.2	18.1	19.5	16.6	2.87	0.4589
	28	18.2 ^b	19.8 ^b	26.2 ^a	28.5 ^a	3.74	0.0150
CAT in blood (nmol CAT/mg protein)	14	2.34 ^a	1.34 ^c	1.81 ^{bc}	1.62 ^b	0.07	0.0367
	28	1.93 ^c	1.36 ^d	2.49 ^b	3.27 ^a	0.04	0.0002
SOD in blood (UI SOD/mg protein)	14	9.23 ^a	8.10 ^a	9.35 ^a	6.62 ^b	1.87	0.0473
	28	8.92 ^b	6.98 ^c	12.72 ^a	13.35 ^a	2.45	0.0001

CON = Group of quails that did not receive diphenyl diselenide; 0.3 ppm = group of quails that received 0.3 ppm of Ph_2Se_2 ; 0.6 ppm = group of quails that received 0.6 ppm of Ph_2Se_2 ; 0.9 ppm = group of quails that received 0.9 ppm of Ph_2Se_2 ; *L = Luminosity index; a* = red intensity; b* = yellow intensity. #Root-mean-square error (RMSE). ^{a,b,c} Values within a row with different superscripts differ significantly at $p < 0.05$.

of Ph_2Se_2 in blood (Table 2) and in the smallest dosages (0.3 and 0.6 ppm) in the muscle tissue ($p < 0.05$) (Table 4), but not in the liver (Table 3). A decreased ROS was verified in the dosages 0.3 and 0.6 ppm on blood (Table 2) and 0.6 ppm on muscle tissue (Table 4) when used Ph_2Se_2 , which indicates a reduction in free radicals resulting from the antioxidant effect of the organic selenium source this dosage. However, a reverse effect was observed in dosage 0.9 ppm of Ph_2Se_2 , which promoted similar ROS ($p > 0.05$) on blood (14 d) and muscle tissue (14 and 28 days) that CON (Tables 2 and 4). In the liver tissue, there was a marked reduction in ROS levels on day 28 ($p < 0.05$), which was directly related to increased amounts of Ph_2Se_2 added into the diet (Table 3).

The analysis of TBARS levels showed a reduction in the concentration of MDA in the serum on day 14th ($p < 0.05$) that was caused by the highest dose (0.09 ppm) of Ph_2Se_2 , which was not observed on day 28th for this dosage. In the liver, the levels of TBARS were lower when 0.3 ppm (day 14) and 0.6 ppm (day 28) of Ph_2Se_2 were used ($p < 0.05$) (Table 3). However, in the birds' muscle tissue, there was a reduction of TBARS levels in the highest dosage (0.09 ppm of Ph_2Se_2) on the 14th day of the study ($p < 0.05$), but this beneficial effect was not observed ($p > 0.05$) on day 28, compared to the control group (Table 4).

Table 3. Biochemical variables in the liver of quails fed with different levels of diphenyl diselenide (Ph_2Se_2) for 14 and 28 days.

Variables	Days	CON	0.3 ppm	0.6 ppm	0.9 ppm	RMSE	P-Value
ROS (U DCF/ mg protein)	14	1073.4 ^b	1990.2 ^a	1132.6 ^b	1302.8 ^b	125.6	0.0057
	28	1404.1 ^a	896.7 ^b	478.2 ^c	368.3 ^c	98.7	0.0001
TBARS (nmol MDA/mg protein)	14	10.17 ^a	8.82 ^b	9.34 ^{ab}	9.53 ^a	0.56	0.0478
	28	9.58 ^a	8.65 ^{ab}	8.74 ^b	9.47 ^a	0.15	0.0154
GPx (nmol NADPH/h/mg protein)	14	2.4	3.1	2.5	3.0	0.13	0.7569
	28	2.2 ^b	2.8 ^b	4.8 ^a	3.9 ^a	0.18	0.0036
CAT (nmol CAT/mg protein)	14	12.0	13.81	12.76	11.07	2.41	0.8547
	28	11.62 ^b	12.74 ^b	10.61 ^b	20.06 ^a	2.45	0.0001
SOD (UI SOD/ mg protein)	14	3.09 ^c	2.81 ^c	5.62 ^b	15.98 ^a	0.84	0.0001
	28	2.22 ^d	10.0 ^c	15.19 ^b	23.03 ^a	1.96	0.0001

CON = Group of quails that did not receive diphenyl diselenide;
0.3 ppm = group of quails that received 0.3 ppm of Ph_2Se_2 ;
0.6 ppm = group of quails that received 0.6 ppm of Ph_2Se_2 ;
0.9 ppm = group of quails that received 0.9 ppm of Ph_2Se_2 ; *L = Luminosity index; a* = red intensity; b* = yellow intensity.
Root-mean-square error (RMSE).
a,b,c,d Values within a row with different superscripts differ significantly at $p < 0.05$.

la provisión de Ph_2Se_2 en sangre (Tabla 2) y en las dosis más pequeñas (0.3 y 0.6 ppm) en el tejido muscular ($p < 0.05$) (Tabla 4), pero no en el hígado (Tabla 3). Se verificó una disminución del ROS en las dosis de 0.3 y 0.6 ppm en sangre (Tabla 2) y 0,6 ppm en tejido muscular (Tabla 4) cuando se utilizó Ph_2Se_2 , lo que indica una reducción de los radicales libres, resultante del efecto antioxidante de la fuente orgánica de selenio de esta dosis. Sin embargo, se observó un efecto inverso en la dosis de 0.9 ppm de Ph_2Se_2 , que promovió un ROS similar ($p > 0.05$) en la sangre (14 d) y el tejido muscular (14 y 28 días) que CON (Tablas 2 y 4). En el tejido hepático, hubo una marcada reducción en los niveles de ROS el día 28 ($p < 0.05$), lo cual estuvo directamente relacionado con el aumento de las cantidades de Ph_2Se_2 añadidas a la dieta (Tabla 3).

El análisis de los niveles de TBARS mostró una reducción en la concentración de MDA en el suero en el día 14 ($p < 0.05$) que fue causada por la dosis más alta (0.09 ppm) de Ph_2Se_2 , la cual no fue observada el día 28 para esta dosis. En el hígado, los niveles de TBARS fueron más bajos cuando se utilizaron 0.3 ppm (día 14) y 0,6 ppm (día 28) de Ph_2Se_2 ($p < 0.05$) (Tabla 3). Sin embargo, en el tejido muscular de las aves, hubo una reducción de los niveles de TBARS en la dosis más alta (0.09 ppm de Ph_2Se_2) el día 14 del estudio ($p < 0.05$), pero este efecto beneficioso no se observó ($p > 0.05$) el día 28, en comparación con el grupo control (Tabla 4).

El uso de Ph_2Se_2 aumentó la actividad de las enzimas antioxidantes probadas (GPx, CAT y SOD), observándose las principales diferencias el día 28 del experimento, y en las dosis más altas en comparación con el grupo control (Tablas 2, 3 y 4). La actividad de Ca^{++} -ATPasa en el tejido muscular de las aves aumentó con las dosis más altas de selenio en la dieta, las cuales difirieron entre tratamientos ($p < 0.05$) en el día 28, pero este efecto no se observó en el día 14 del experimento (Tabla 4).

DISCUSIÓN

Se utilizaron diferentes fuentes de selenio orgánico en las dietas de los animales (11, 17), pero el diseleniuro de difenilo todavía no se había utilizado para alimentar codornices. Por lo tanto, es importante evaluar los efectos del uso de este compuesto sobre la salud de los animales y la calidad de la carne. En nuestro estudio, fue posible verificar que Ph_2Se_2 mostraba actividad antioxidante en el tejido hepático de las codornices, y activaba enzimas SOD responsables de la dismutación de los radicales superóxidos, CAT, que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y CO_2 , y GPx, que descompone el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos (2,3). Los resultados en el tejido sérico, hepático y muscular de los

The use of Ph_2Se_2 increased the activity of the antioxidant enzymes tested (GPx, CAT, and SOD), with the main differences being observed on the 28th day of the experiment, and in the highest dosages as compared to the control group (Tables 2, 3, and 4). The activity of Ca^{2+} -ATPase in the muscle tissue of the birds increased with the highest dosages of selenium in the diet, which differed between treatments ($p < 0.05$) on day 28, but this effect was not observed on day 14 of the experiment (Table 4).

DISCUSSION

Different sources of organic selenium were used in animal diets (11, 17), but diphenyl diselenide had not yet been used to feed quails. Thus, it is important to evaluate the effects of using this compound on the health of animals and meat quality. In our study, it was possible to verify that Ph_2Se_2 showed antioxidant activity in the liver tissue of quails, and activated SOD enzymes responsible for the dismutation of superoxide radical, CAT, which breaks hydrogen peroxide into water and CO_2 , and GPx, which breaks down hydrogen peroxide and organic hydroperoxides (2,3). The results in the serum, liver, and muscle tissue of the animals were coherent in regards to the activity of antioxidant enzymes, as these were observed to have their activity increased and their oxidant levels consequently reduced, which were evaluated here through the lower lipid peroxidation and free radical levels. This increase in the antioxidant activity was not related to the increase in oxidants, but rather to a response to the antioxidant potential of Ph_2Se_2 , which was already known (6,9). Selenium acts as a co-factor of antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase and thioredoxin reductase (18-20), playing a role in the activation of enzymes, as verified in this study for GPx. The effects of Ph_2Se_2 were more intense when birds received it for longer periods (28 days). A similar effect was observed by Menezes et al (9), in South American catfish fed with PhSe_2 for 60 days, which led to increased antioxidant activity in muscle samples.

This experiment showed that Ph_2Se_2 improved water-holding ability and reduced water loss from cooking. These findings might be a consequence of the antioxidant activity found in the muscle tissues, once reducing oxidation from fatty acids in the cell membrane improves the fluidity and permeability of membranes (5).

The visual aspect of meat is very important for consumers. In our study, Ph_2Se_2 caused a reduction in the intensity of the yellow color, which

Table 4. Biochemical variables in the muscle tissue of quails fed with different levels of diphenyl diselenide (Ph_2Se_2) for 14 and 28 days.

Variables	Days	CON	0.3 ppm	0.6 ppm	0.9 ppm	RMSE	P-Value
ROS (U DCF / mg protein)	14	539.2 ^a	328.0 ^b	256.0 ^b	414.1 ^a	24.6	0.0034
	28	511.1 ^a	263.2 ^b	154.0 ^c	471.4 ^a	31.5	0.0003
TBARS (nmol MDA/mg protein)	14	1.71 ^a	1.62 ^a	1.79 ^a	1.27 ^b	0.03	0.0324
	28	1.67 ^{ab}	1.83 ^a	1.54 ^{ab}	1.33 ^b	0.05	0.0056
GPx (nmol NADPH/h/mg protein)	14	0.48 ^c	0.52 ^c	0.88 ^b	1.6 ^a	0.02	0.0001
	28	0.42 ^c	0.8 ^b	1.8 ^a	1.9 ^a	0.04	0.0001
CAT (nmol CAT/mg protein)	14	4.26 ^b	6.06 ^a	4.20 ^b	5.43 ^{ab}	0.12	0.0354
	28	5.99 ^b	7.37 ^b	12.34 ^a	10.48 ^a	0.33	0.0071
SOD (UI SOD/ mg protein)	14	0.13	0.13	0.13	0.13	0.004	0.6547
	28	0.14 ^a	0.13 ^{ab}	0.15 ^a	0.10 ^b	0.006	0.0456
Ca^{2+} ATPase (nmol Pi/min/ mg protein)	14	19.6	19.0	19.0	17.1	2.01	0.0980
	28	21.2 ^b	20.0 ^b	29.7 ^a	33.0 ^a	2.56	0.0001

CON = Group of quails that did not receive diphenyl diselenide;

0.3 ppm = group of quails that received 0.3 ppm of Ph_2Se_2 ;

0.6 ppm = group of quails that received 0.6 ppm of Ph_2Se_2 ;

0.9 ppm = group of quails that received 0.9 ppm of Ph_2Se_2 ;

L = Luminosity index; a = red intensity; b* = yellow intensity.

Root-mean-square error (RMSE).

^{a,b,c} Values within a row with different superscripts differ significantly at $p < 0.05$.

animales fueron coherentes en cuanto a la actividad de las enzimas antioxidantes, ya que se observó un aumento de su actividad y, en consecuencia, una reducción de sus niveles de oxidantes, que se evaluaron aquí a través de la peroxidación de lípidos inferiores y de los niveles de radicales libres. Este aumento de la actividad antioxidante no estaba relacionado con el aumento de oxidantes, sino más bien con una respuesta al potencial antioxidante de Ph_2Se_2 , que ya se conocía (6, 9). El selenio actúa como co-factor de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa y la tioredoxina reductasa (18-20), desempeñando un papel en la activación de las enzimas, según lo verificado en este estudio para GPx. Los efectos de Ph_2Se_2 fueron más intensos cuando las aves lo recibieron durante períodos más largos (28 días). Un efecto similar fue observado por Menezes et al (9), en bagres sudamericanos alimentados con PhSe_2 durante 60 días, lo que condujo a un aumento de la actividad antioxidante en muestras musculares.

Este experimento demostró que el Ph_2Se_2 mejoró la capacidad de retención de agua y redujo la pérdida de agua al cocinar. Estos hallazgos pueden ser consecuencia de la actividad antioxidante que se encuentra en los tejidos musculares, una vez que la reducción de la oxidación de los ácidos grasos en la membrana celular mejora la fluidez y permeabilidad de las membranas (5).

might be a result of higher amounts of water held, working as a dilution factor. Because quail meat has a characteristic red color, this yellow intensity reduction observed may not influence negatively meat quality, which might not be true to different meats such as the breast of chickens, for example.

Despite the absence of recommendations of Se for quails according to Rostagno et al (10), our results indicated that levels above 0.3 ppm must be used for quails in an effort to improve antioxidant activity, and also meat quality. In general, we concluded that diphenyl diselenide associated with an inorganic source improve antioxidant defense, reduce oxidation in muscle tissues, and thus, enhance breast meat quality of male Japanese quails.

Ethics Committee.

This experiment was approved by the Animal Welfare Committee of Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) under protocol number 8562120216.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest in the development of this study

Acknowledgements

We would like to thank the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) for funding this work (Process: 304328/2015-4/CNPq).

El aspecto visual de la carne es muy importante para los consumidores. En nuestro estudio, Ph₂Se₂ causó una reducción en la intensidad del color amarillo, que podría ser el resultado de mayores cantidades de agua retenida, trabajando como un factor de dilución. Debido a que la carne de codorniz tiene un color rojo característico, esta reducción de intensidad amarilla observada puede no influir negativamente en la calidad de la carne, lo que puede no ser cierto para diferentes carnes como, por ejemplo, la pechuga de pollo.

A pesar de la ausencia de recomendaciones de Se para las codornices de acuerdo con Rostagno et al. (10), nuestros resultados indicaron que los niveles por encima de 0,3 ppm deben ser utilizados para las codornices en un esfuerzo por mejorar la actividad antioxidante, y también la calidad de la carne. En general, concluimos que el diseleniuro de difenilo asociado con una fuente inorgánica mejora la defensa antioxidante, reduce la oxidación en los tejidos musculares y, por lo tanto, mejora la calidad de la carne de pechuga de la codorniz japonesa macho.

Comité de Ética

Este experimento fue aprobado por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad del Estado de Santa Catarina (UDESC) bajo el número de protocolo 8562120216.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no hay conflicto de intereses en el desarrollo de este estudio.

Agradecimientos

Queremos agradecer al Consejo Nacional de Desarrollo Tecnológico y Científico (CNPq) por financiar este trabajo (Proceso: 304328/2015-4/CNPq).

REFERENCES

1. Mariutti LRB, Bragagnolo N. A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais. Rev Inst Adolfo Lutz 2009; 68 (1):1-11.
2. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. World Allergy Organ J. 2012; 5(1):9-19.
3. Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. RSC Adv 2015; 5:27986-28006.
4. Catarina AS, Barros CR, Ferreira SRG. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. Arq Bras Endocrinol Metabol 2009; 53(3):550-559.
5. Leeson S, Namkung H, Caston L, Durosoy S, Schlegel P. Comparison of selenium levels and sources and dietary fat quality in diets for broiler breeders and layer hens. Poult Sci 2008; 87(12):2605-2612.

6. Ribeiro MCP, Avila DS, Schiar VVP, Santos DB, Meinerz DF, Duarte MMF, Monteiro R, Puntel R, Bem AF, Hassan W, Barbosa NBV, Rocha JBT. Diphenyl diselenide supplementation reduces biochemical alterations associated with oxidative stress in rats fed with fructose and hydrochlorothiazide. *Chem Biol Interact* 2013; 204(3):191–199.
7. Petronilho F, Michels M, Danielski LG, Goldim MP, Florentino D, Vieira A, Mendonça MG, Tournier M, Piacentini B, Giustina AD, Leffa DD, Pereira GW, Pereira VD, Rocha JBT. Diphenyl diselenide attenuates oxidative stress and inflammatory parameters in ulcerative colitis: a comparison with ebselen. *Pathol Res Pract*. 2016; 212(9):755–760
8. Menezes C, Leitemperger J, Toni C, Santi A, Lopes T, Barbosa NBV, Neto JR, Loro VN. Comparative study on effects of dietary with diphenyl diselenide on oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*) and silver catfish (*Rhamdia* sp.) exposed to herbicide clomazone. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013; 36(2):706–714.
9. Menezes C, Marins A, Murussi C, Pretto A, Leitemperger J, Loro VL. Effects of diphenyl diselenide on growth, oxidative damage, and antioxidant response in silver cat fish. *Sci Total Environ*. 2016; 542(Pt A):231–237.
10. Rostagno HS. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3rd. Editora da Universidade Federal de Viçosa: MG, Brazil; 2011.
11. Boiago MM, Borba H, Leonel FR, Giampietro-Ganeco A, Ferrari, FB, Stefani LM, Souza PA. Sources and levels of selenium on breast meat quality of broilers. *Ciênc Rural* 2014; 44(9):1692–1698.
12. Cason JA, Lyon CE, Papa CM. Effect of muscle opposition during rigor on development of broiler breast meat tenderness. *Poult Sci*. 1997; 76(5):785–787.
13. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine, 4th ed. Oxford University Press: NY, USA; 2007.
14. Migliorini M, Da Silva AS, Santurio JM, Bottari NB, Gebert RR, Reis JH, Volpato A, Morsch VM, Baldissera MD, Stefani LM, Boiago MM. The Protective effects of an adsorbent against oxidative stress in quails fed aflatoxin-contaminated diet. *Acta Sci Vet*. 2017; 45(7):1473.
15. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc*. 2010; 5(1):51–66.
16. Trevisan G, Maldaner G, Velloso NA, Sant'Anna GS, Ilha V, Velho GCC, et al. Antinociceptive effects of 14-membered cyclopeptide alkaloids. *J Nat Prod*. 2009; 72(4): 608–612.
17. Rao SVR, Prakash B, Raju MVLN, Panda AK, Poonan S, Murthy OK. Effect of supplementing organic selenium on performance, carcass traits, oxidative parameters and immune responses in commercial broiler chickens. *J Anim Sci*. 2013; 26(2):247–252.
18. Dobrachinski F, Silva MH, Tassi CLC, Carvalho NR, Dias GRM, Golombieski RM, Loreto ELS, Rocha JBT, Figuera MR, Soares FAA. Neuroprotective effect of diphenyl diselenide in an experimental stroke model : maintenance of redox system in mitochondria of brain regions. *Neurotox Res*. 2014; 26(2):317–330.
19. Freitas AS, Rocha JBT. Diphenyl diselenide and analogs are substrates of cerebral rat thioredoxin reductase: A pathway for their neuroprotective effects. *Neurosci Letters* 2011; 503(1):1–5.
20. Puntel RL, Roos DH, Paix W, Braga L, Zeni G, Nogueira CW, Rocha JBT. Oxalate modulates thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in supernatants of homogenates from rat brain, liver and kidney: Effect of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride, *Chem Biol Interact*. 2007; 165(1):87–98.