



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

**TOXICOLOGIA E FARMACOLOGIA *IN VITRO* DE NOVOS
COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO E TELÚRIO COM
ATIVIDADE TIPO TIOL PEROXIDASE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jéssie Haigert Sudati

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**TOXICOLOGIA E FARMACOLOGIA *IN VITRO* DE NOVOS
COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO E TELÚRIO COM
ATIVIDADE TIPO TIOL PEROXIDASE**

por

Jéssie Haigert Sudati

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

Santa Maria, RS, Brasil

2009

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

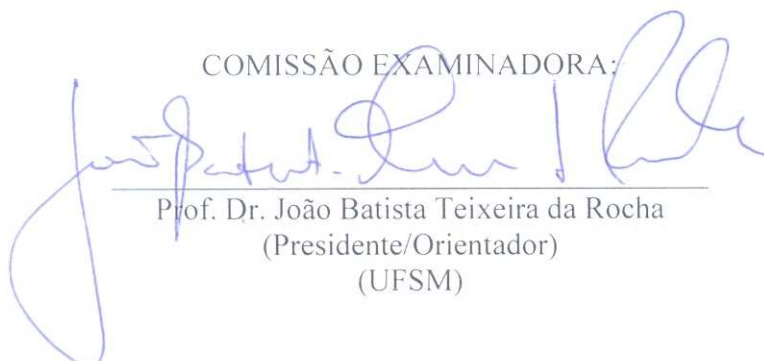
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**TOXICOLOGIA E FARMACOLOGIA *IN VITRO* DE NOVOS
COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO E TELÚRIO COM
ATIVIDADE TIPO TIOL PEROXIDASE**

elaborada por
Jéssie Haigert Sudati

Como requisito parcial para o grau de obtenção de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha
(Presidente/Orientador)
(UFSM)



Prof.ª Dr.ª Maria Rosa Chitolina Schetinger
(UFSM)



Prof. Dr. Helmoz Rosenaim Appelt
(UNIFRA)

Santa Maria, 8 de maio de 2009.

*"Ninguém conhece as suas próprias capacidades
enquanto não as colocar à prova."*

(Publio Siro)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que está sempre presente em minha vida, por me proporcionar oportunidades e me fazer confiante o suficiente para desafiá-las.

Ao Prof. João Batista, meu orientador desde a Iniciação Científica. Obrigado pela amizade, ensinamentos, sinceridade e pelas oportunidades que me proporcionaste. Sou muito grata por tudo o que fizeste por mim.

À Rose, minha co-orientadora, por confiar em mim e estar sempre pronta para me ajudar. Agradeço pela amizade, paciência, ensinamentos e colaboração fundamental neste trabalho.

Aos meus pais, Auri e Clionice e ao meu irmão Igor, meus maiores exemplos de vida, agradeço pelo amor, ensinamentos, total apoio em todos os momentos e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu namorado Lucas pelo amor, incentivo e compreensão.

Ao Prof. Braga, Eduardo e Letiére pela síntese dos compostos, sem os quais não seria possível a execução de meu trabalho, pelos ensinamentos e parceria no trabalho.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, que contribuíram de alguma forma para minha formação.

Aos amigos do Laboratório do Prof. João, Prof. Braga, Prof. Félix, Prof^a Cristina e Prof. Gilson pela amizade.

Em especial, gostaria de agradecer a todos os colegas do laboratório, são eles: Caroline, Cristiane, Romaiana, Cássia, Alessandro, Alessandra, Bruna, Albys, Daia, Sally, Danúbia, Verônica, Daniel, Matheus, Carlos André, Jardel, Vinícius, Andressa, Thiele, Andréia, Josi e Douglas, pelo companheirismo, ajuda e descontração.

Aos funcionários Angélica, Márcia e Rinaldo pela dedicação e competência com que realizam os seus trabalhos.

Ao CNPq e a CAPES pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

Ao Biotério Central pelo fornecimento dos animais de laboratório.

Aos animais utilizados neste trabalho, todo o meu respeito.

Ao professor Helmoz e à professora Maria Rosa por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação. À Rosilene também, meu muito obrigada.

Enfim, agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso.

RESUMO

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

TOXICOLOGIA E FARMACOLOGIA *IN VITRO* DE NOVOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO E TELÚRIO COM ATIVIDADE TIPO TIOL PEROXIDASE

AUTORA: JÉSSIE HAIGERT SUDATI
ORIENTADOR: JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA
CO-ORIENTADORA: ROSELEI FACHINETTO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 8 de Maio de 2009.

A Glutationa Peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9) é uma selenoenzima que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos na presença de glutathione (GSH). Sua ação catalítica evita, desta forma, a oxidação dos lipídios constituintes da membrana, bem como de outros componentes celulares. Sabe-se que a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) está relacionada ao surgimento de muitas doenças, e a enzima GPx é considerada uma das mais importantes enzimas antioxidantes presentes nos organismos vivos, sendo necessária para auxiliar na proteção contra estas patologias. No entanto, a enzima GPx possui algumas desvantagens tais como, instabilidade e pouca viabilidade no que diz respeito a uma possível administração oral ou endovenosa, por isso, surgiu o interesse na síntese de compostos que possam mimetizar o mecanismo de ação dessa enzima. Dados da literatura têm demonstrado que os compostos orgânicos sintéticos de selênio (Se) e telúrio (Te) são excelentes miméticos da enzima GPx. Assim, neste estudo, uma série de compostos orgânicos derivados de aminoácidos contendo Se e Te na estrutura foram testados com a finalidade de avaliação *in vitro* da (i) atividade mimética da GPx (ou tipo GPx, isto é, "GPx like activity") de acordo com a reação $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{PhSH} \rightarrow \text{PhSSPh} + 2\text{H}_2\text{O}$; (ii) propriedades catalíticas destes compostos, (iii) reatividade e possível oxidação dos compostos tiólicos de baixo peso molecular (glutationa reduzida, captopril e ditiotretol) e o (iv) efeito contra a peroxidação lipídica. Todos os compostos utilizados neste trabalho demonstraram atividade mimética à GPx; porém, essa propriedade apresentou uma dependência em relação ao resíduo de aminoácido presente na estrutura do composto, bem como influência estérica. Os disselenetos **C**, **D** e os derivados do telureto **7g** foram os mais eficazes na redução de peróxidos quando comparados aos demais compostos utilizados neste estudo. Portanto, estes resultados sugerem que os compostos orgânicos derivados de aminoácidos contendo Se ou Te podem ser considerados miméticos importantes da GPx.

Palavras-chave: Glutationa peroxidase; organoselênio, organotelúrio.

ABSTRACT

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

TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY OF NEW SELENIUM AND TELLURIUM ORGANIC COMPOUNDS *IN VITRO* WITH THIOL PEROXIDASE ACTIVITY

AUTHOR: JÉSSIE HAIGERT SUDATI
ADVISOR: JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA
CO-ADVISOR: ROSELEI FACHINETTO
Place and Date of the Defense: Santa Maria, 8th May, 2009.

Glutathione peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9) is a well-known selenoenzyme that catalyzes the reduction of hydrogen peroxide and some organic hydroperoxides by glutathione (GSH) and protects lipid membranes and other cellular components against oxidative stress, which is related to many diseases and this enzyme is regarded as one of the most important antioxidant enzymes in living organisms. Because the natural GPx has some shortcomings (e.g. instability and poor availability), scientists have paid more attention to its artificial imitation. Synthetic organoselenium and organotellurium compounds have emerged as excellent candidates to act as GPx mimics. Thus, in this study, several aminoacids derivatives containing selenium or tellurium were tested in order to evaluate their *in vitro* (i) GPx mimic properties (or GPx like activity) according to the model reaction ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{PhSH} \rightarrow \text{PhSSPh} + 2\text{H}_2\text{O}$); (ii) catalytic properties, (iii) reactivity with low molecular weight thiols (reduced glutathione, captopril and dithiothreitol) and (iv) their effect against lipid peroxidation have been performed. All compounds tested in this study showed ability to imitate de antioxidant enzyme GPx, but this property showed a dependence on the aminoacid residue and steric effect. Compounds **C**, **D** and **7g** derivatives were found as the best catalysts in reducing peroxides, in comparison with other compounds tested. These results suggest that aminoacids derivatives compounds containing selenium or tellurium used in this work can be considered promising GPx mimetics.

Key words: Glutathione peroxidase; organoselenium; organotellurium.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Reações catalisadas pelas enzimas GPx, GR e GO.....9
- Figura 2.** Geração e consumo do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio.....9
- Figura 3.** (a) Formação do MDA a partir da peroxidação lipídica de um ácido graxo triinsaturado C18 e (b) formação do complexo cromóforo TBA-MDA 14

ARTIGO CIENTÍFICO

- Figura 1.** Estrutura dos compostos orgânicos de Te utilizados neste estudo..... 19
- Figura 2.** Atividade GPx like dos compostos **7a-d**20

MANUSCRITO (EM PREPARAÇÃO)

- Figura 1.** Estrutura dos disselenetos derivados da *L*-fenilalanina (**A-C**) e derivado da *L*-valina (**D**).....23
- Figura 2.** Atividade GPx like dos disselenetos **A-D** e PhSeSePh.....24
- Figura 3.** Gráfico do duplo-recíproco ($1/v$ vs $1/[PhSH]$) para os compostos **B, C, D** e PhSeSePh. $[H_2O_2]$ foi mantida à 5 mM; $[Disselenetos] = 100 \mu M$; $[PhSH] = 0,495 - 1,9$ mM25
- Figura 4.** Gráfico do duplo-recíproco ($1/v$ vs $1/[H_2O_2]$) para os compostos **C, D** e PhSeSePh. $[H_2O_2] = 5 - 30$ mM; $[Disselenetos] = 5 \mu M, 10 \mu M$ e $25 \mu M$; $[PhSH]$ foi mantida à 1.9 mM26
- Figura 5.** Efeito de diferentes concentrações dos disselenetos **C, D** e PhSeSePh na formação de TBARS induzida por Fe(II).30

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

Tabela 1. Determinação do T_{50} (tempo gasto, em minutos, para reduzir a concentração de tiol em 50%) para os compostos **7a-g**21

Tabela 2. Determinação do T_{50} (tempo gasto, em minutos, para reduzir a concentração de tiol em 50%) dos compostos **7g-o**22

MANUSCRITO (EM PREPARAÇÃO)

Tabela 1. Determinação do T_{50} dos compostos **A-D** e PhSeSePh24

Tabela 2 Parâmetros cinéticos para os diferentes disselenetos testados (**B, C, D** e PhSeSePh). $[H_2O_2]$ foi fixada a 5 mM; $[Disselenetos] = 100 \mu M$; $[PhSH] = 0,495 - 1,9$ mM25

Tabela 3. Parâmetros cinéticos para os diferentes disselenetos testados (**C, D** e PhSeSePh). $[H_2O_2] = 5 - 30$ mM; $[Disselenetos] = 5 \mu M, 10 \mu M$ e $25 \mu M$; $[PhSH]$ foi fixada a 1,9 mM.....27

Tabela 4. Efeito de diferentes disselenetos (**A, B, C** e **D**) frente à oxidação de grupos SH da glutathiona (1 mM), de acordo com a reação de Ellman28

Tabela 5. Efeito de diferentes disselenetos (**A, B, C** e **D**) frente à oxidação de grupos SH do captopril (1 mM), de acordo com a reação de Ellman28

Tabela 6 - Efeito de diferentes disselenetos (**A, B, C** e **D**) frente à oxidação de grupos SH do DTT (0.5 mM) de acordo com a reação de Ellman.....29

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DTNB	5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitol
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutathiona
GSSG	Glutathiona oxidada
GO	Glutathiona oxidase
GPx	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
MDA	Malondialdeído
MeOH	Metanol
PhSH	Tiofenol
PhSSPh	Dissulfeto de difenila
PhSeSePh	Disseleneto de difenila
PL	Peroxidação lipídica
Se	Selênio
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
Te	Telúrio

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Artigo Científico: “Synthesis of Telluroamino Acid Derivatives With Remarkable GPx Like Activity	39
Anexo B – Manuscrito (em preparação): “New Diselenoamino Acid Derivatives With GPx Mimic Properties”	43

SUMÁRIO

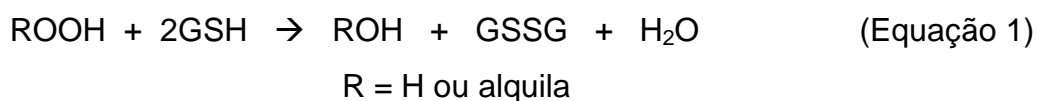
<i>Agradecimentos</i>	<i>iv</i>
<i>Resumo</i>	<i>vi</i>
<i>Abstract</i>	<i>vii</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>viii</i>
<i>Lista de Tabelas</i>	<i>ix</i>
<i>Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos</i>	<i>x</i>
<i>Lista de Anexos</i>	<i>xi</i>
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	3
3. OBJETIVOS	4
3.1. <i>Objetivo geral</i>	4
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
4.1. <i>Telúrio</i>	5
4.2. <i>Selênio</i>	6
4.3. <i>Compostos orgânicos de Selênio e Telúrio com atividade GPx like</i>	7
4.4. <i>Glutathione peroxidase (GPx)</i>	8
4.4.1. <i>Glutathione (GSH)</i>	8
4.4.2. <i>GPx: histórico</i>	10
4.4.3. <i>GPx: classificação</i>	10
4.4.4. <i>GPx: mecanismo catalítico</i>	11
4.5. <i>Estresse oxidativo</i>	12
4.5.1. <i>Peroxidação lipídica</i>	13
4.5.1.1. <i>Ferro(II) como um agente pró-oxidante</i>	14
5. MATERIAIS E MÉTODOS	16
5.1. <i>Artigo Científico</i>	16
5.1.1. <i>Determinação da atividade GPx Like</i>	16
5.2. <i>Manuscrito (em preparação)</i>	16

5.2.1. Determinação da atividade Gpx like e análise de parâmetros cinético ...	16
5.2.2. Quantificação de grupamentos sulfidrílicos	16
5.2.3. Animais.....	17
5.2.4. Preparação do homogenato	17
5.2.5. Quantificação de TBARS.....	18
5.2.6. Análise estatística	18
6. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	19
6.1. <i>Artigo científico</i>	19
6.2. <i>Manuscrito (em preparação)</i>	23
7. CONCLUSÕES	31
8. PERSPECTIVAS.....	32
9. REFERÊNCIAS.....	33
ANEXOS	38
<i>Anexo A - Artigo Científico</i>	39
<i>Anexo B - Manuscrito (em preparação)</i>	43

1. INTRODUÇÃO

Está bem estabelecido na literatura que muitas doenças humanas são decorrentes do estresse oxidativo. Estresse oxidativo é caracterizado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), ocasionadas como produtos do metabolismo celular aeróbico, sendo que o controle de sua produção se dá principalmente pelo sistema de defesas antioxidante, especialmente por enzimas antioxidantes tais como, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) (LAGUERRE e cols., 2007).

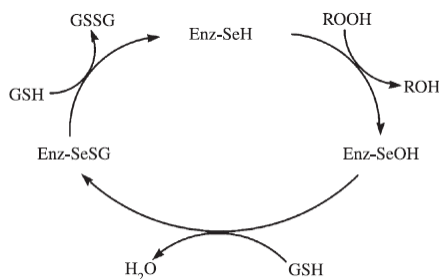
A glutaciona peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) é uma selenoenzima que apresenta propriedade antioxidante catalisando a redução de peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos através do consumo do grupo tiol da glutaciona (GSH), formando como produtos água e/ou glutaciona oxidada (GSSG) (ENGMAN e cols., 1989; LUO e cols.,1994; URSINI e cols.,1995) (equação 1) protegendo biomembranas e outros componentes celulares do estresse oxidativo.



Devido ao fato de essa enzima possuir algumas desvantagens que limitam seu uso terapêutico tais como, instabilidade e alto peso molecular (ENGMAN e cols., 1989; LUO e cols.,1994), muitos estudos têm proposto a síntese de novos compostos que possam mimetizar a atividade da enzima GPx, não apenas para elucidar o seu mecanismo catalítico mas também, para potencializar sua aplicação farmacológica.

A enzima GPx possui quatro subunidades idênticas contendo, em cada uma, um sítio catalítico composto pelo resíduo de selenocisteína, que contém selênio (Se) o qual está envolvido na formação do intermediário selenol (Enz-SeH), que reduz peróxidos à água ou álcool formando o ácido selênico (Enz-SeOH). Este então reage com a glutaciona reduzida (GSH) formando o selenosulfeto (Enz-SeSG). Finalmente, este então é atacado por um segundo equivalente de GSH regenerando a forma ativa da enzima e produzindo simultaneamente a glutaciona oxidada (GSSG) (Esquema 1) (WENDEL e cols., 1984; URSINI e cols.,1995).

Ao contrário da GPx citosólica, a qual usa exclusivamente a GSH como substrato, outras enzimas como a GPx presente no plasma e a GPx de hidropéroxido de fosfolípídeos aceitam uma variedade de tióis como substratos (TAKEBE e cols., 2002).



Esquema 1 Ciclo catalítico da enzima GPx

Desde a descoberta das funções do selênio para o sistema biológico enzimático, tornou-se necessário esclarecer a importância desse elemento para as selenoenzimas. De acordo com isso, vários estudos demonstram que os compostos sintéticos orgânicos de selênio (Se) e telúrio (Te) (REICH e cols., 1987; TOMODA e cols., 1994; XIE e cols., 2006; BRAGA e cols., 2009) são excelentes miméticos da GPx devido à habilidade que esses dois elementos possuem de sofrer oxidação. De fato, a literatura sustenta que o Te possa mudar de estado de oxidação divalente para o tetravalente, enquanto que alguns compostos orgânicos de selênio podem gerar selenol após a interação com tióis (similar aquele encontrado no sítio ativo da GPx). O Ebselen (2-fenil-1,2-benzóisoselenazol-3(2H)-one), diseleneto de difenila, ciclodextrinas e análogos contendo Te são demonstrados na literatura como catalisadores em potencial na redução de peróxidos na presença de tióis (WIRTH, 1998; MISHRA e cols., 2006).

Considerando essas propriedades miméticas à enzima GPx que alguns compostos sintéticos orgânicos de Se e Te possuem, nesse estudo, uma série de novos compostos orgânicos derivados de aminoácidos contendo Se e Te foram sintetizados com a finalidade de se avaliar essa propriedade antioxidante, como também, a reatividade com grupamento sulfidrílico e o efeito contra a peroxidação lipídica *in vitro*.

2. JUSTIFICATIVA

Na literatura, muitos compostos orgânicos de Se e Te sintéticos apresentam-se como bons miméticos à ação catalítica da GPx. Considerando a importância dessa enzima, tornou-se instigante sugerir e avaliar essa propriedade antioxidante de uma série de novos compostos orgânicos derivados de aminoácidos contendo Se ou Te, onde uma possível semelhança estrutural com compostos naturalmente presentes no nosso organismo poderia diminuir as ações tóxicas (tiol oxidase) e facilitar as ações farmacológicas (tiol peroxidase).

3. OBJETIVOS

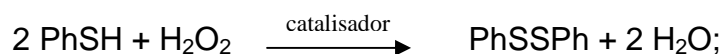
3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial mimético à enzima glutatona peroxidase de uma série de compostos orgânicos derivados de aminoácidos contendo selênio ou telúrio na estrutura.

3.2. Objetivos específicos

→ Investigar, de maneira comparativa, a atividade tipo tiol peroxidase *in vitro* de uma série de compostos orgânicos derivados de aminoácidos contendo Se ou Te;

→ determinar o T_{50} dos compostos orgânicos derivados de aminoácidos contendo Se ou Te, ou seja, o tempo gasto pelo composto para consumir 50% do substrato, na reação:



→ avaliar *in vitro* a toxicidade potencial de compostos orgânicos derivados de aminoácidos contendo Se através da oxidação de grupos sulfidrílicos;

→ avaliar a possível atividade antioxidante *in vitro* de alguns compostos frente à peroxidação lipídica induzida pelo agente pró-oxidante Fe(II) em homogeneizado de tecido encefálico de ratos (a seleção dos compostos para este experimento foi com base na atividade tiol-peroxidase avaliada).

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Telúrio

O elemento telúrio (Te) foi descoberto em 1782 e pertence ao grupo 16 da tabela periódica, denominada família dos calcogênios, assim como o selênio e o enxofre. Pode apresentar-se com diferentes números de oxidação: Te^{+6} (telurato), Te^{+4} (telurito), Te^0 (telúrio elementar) e Te^{-2} (telureto) (SCANSETTI, 1992). É encontrado com maior frequência na forma de teluretos de ouro, bismuto, chumbo e prata.

Compostos inorgânicos de Te são encontrados na forma inorgânica de sais e são compostos altamente tóxicos, podendo afetar a pele e os rins (TAYLOR, 1996). O primeiro composto orgânico de telúrio foi sintetizado por Friedrich Wöhler em 1840. Desde sua descoberta até metade do século 20, a química dos compostos orgânicos de Te permaneceu obscura devido às difíceis condições de síntese destes compostos e, especialmente, pelo odor que estes exalavam, poucas são as publicações durante este período. Apenas a partir de 1970 os compostos orgânicos de Te começaram a ser explorados pelos químicos orgânicos, refletindo no crescimento exponencial de artigos publicados desde então. Vários destes compostos, com diferentes características e estruturas químicas, vêm sendo estudados quanto às suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, sendo alguns deles já relatados na literatura.

Assim como o Te elementar e os sais inorgânicos, os compostos orgânicos de Te são bastante tóxicos, e a intensidade desta toxicidade depende da estrutura do composto, da dose administrada e do tipo de animal testado (NOGUEIRA e cols., 2004). A toxicidade destes compostos possivelmente está relacionada à interação com resíduos tiólicos (-SH) de moléculas biologicamente ativas. Os compostos orgânicos de Te têm a capacidade de oxidar os grupamentos -SH, inativando enzimas e/ou diminuindo a concentração de moléculas sulfidrílicas não-protéicas (BLAIS e cols., 1972). Em 1998, BARBOSA e cols. foram os primeiros a observar a inibição da enzima sulfidrílica porfobilinogênio sintase ou δ -amino-levulinato desidratase (ALA-D) *in vitro* em sobrenadante de homogeneizado de fígado de rato pelo ditelureto de difenila. A toxicidade, hepática, cerebral e renal, *ex vivo* também já

foi observada para alguns compostos orgânicos de telúrio (MACIEL e cols., 2000; MEOTTI e cols., 2003; SAVEGNAGO e cols., 2006).

Apesar das propriedades tóxicas atribuídas aos compostos de Te, existem relatos na literatura atribuindo importantes propriedades farmacológicas aos compostos orgânicos de telúrio tais como, quimioprotetora (GROGAN e cols., 2000) e a capacidade de mimetizar a atividade da glutathiona-peroxidase (GPx) que, às custas de GSH, neutraliza o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em 1992, Engman e colaboradores demonstraram, utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear, que vários diaril diteluretos possuem atividade tiol peroxidase superior aos compostos análogos contendo Se, propondo um mecanismo de reação geral para estes compostos. Posteriormente em 1993, Andersson e colaboradores reportaram a atividade mimética da GPx de diaril teluretos, substituídos com moléculas doadoras de elétrons. Além disso, estes autores apontaram que o efeito antioxidante destes compostos se devia à formação de teluróxido, resultante da oxidação do Te^{+2} à Te^{+4} , que seria novamente reduzido ao estado inicial pela GSH, num mecanismo catalítico, neutralizando radicais livres e as espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ENGMAN e cols., 1994; ANDERSSON e cols., 1994).

4.2. Selênio

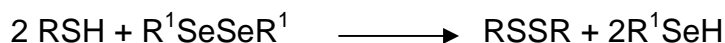
O selênio (Se) foi descoberto em 1818 químico sueco J. J. Berzelius. O Se é um elemento do grupo 16 da tabela periódica, podendo apresentar-se sob quatro estados de oxidação: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}). Em 1842 ocorreu o primeiro relato de toxicidade do Se, em 1943 foi relatado como um potente carcinogênico. Esse elemento foi considerado tóxico até Schwarz e Foltz (1957) identificar sua presença como um micronutriente em bactérias, mamíferos e pássaros. Em 1973 o Se foi descoberto como um constituinte de duas enzimas bacterianas do tipo desidrogenase e glicina redutase as quais contém Se em sua estrutura. O papel bioquímico de Se ficou bem estabelecido pelo descobrimento de que ele faz parte da enzima antioxidante GPx (ROTRUCK e cols., 1973). A partir dessa evidência muitos pesquisadores têm proposto uma gama de compostos orgânicos de Se que possam mimetizar a ação da enzima GPx devido a sua importância fisiológica.

4.3. Compostos orgânicos de selênio e telúrio com atividade GPx like

O Ebselen (1,2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one) é um composto orgânico de selênio com baixa toxicidade, foi o primeiro a ser extensivamente relatado como um mimético da enzima GPx. Esse composto possui propriedades antioxidantes incluindo atividade antiinflamatória (MÜLLER e cols., 1984) e neuroprotetora (BURGER e cols., 2005), provavelmente devido a sua habilidade de reduzir peróxidos consumindo GSH e outros tióis mimetizando a atividade catalítica da selenoenzima GPx. Devido a essa propriedade o Ebselen tem sido utilizado como um padrão para comparar a atividade GPx like de outros compostos de Se, provavelmente por ter sido utilizado com sucesso relativo em testes clínicos para o tratamento de isquemia cerebral e patologias relacionadas (SAITO e cols., 1998; YAMAGUCHI e cols., 1998; OGAWA e cols., 1999).

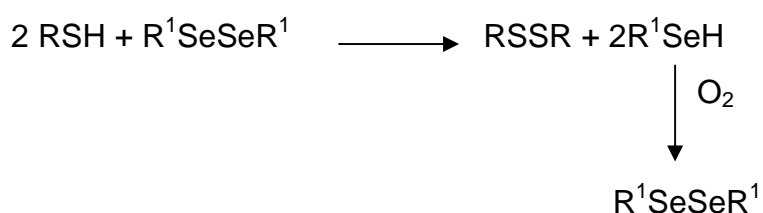
O sucesso obtido empregando o Ebselen como GPx like impulsionou a busca por outros compostos com as mesmas características. Inicialmente, acreditava-se que a condição fundamental para que um composto sintético reduzisse peróxidos à custa de tiol fosse a ligação selênio – nitrogênio (Se - N). A idéia de que apenas compostos com ligação Se - N poderiam atuar como miméticos da GPx foi descartada quando observou-se que o disseleneto de difenila (PhSeSePh) também exibe essa propriedade mimética (aproximadamente duas vezes a atividade catalítica do ebselen) (STEPHEN e cols, 1989).

A partir dessa descoberta, novos compostos organoselênio foram sintetizados e aplicados como GPx like. Além do Ebselen (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one) e do disseleneto de difenila também já foram descritos como miméticos da GPx, vários outros compostos orgânicos de Se (STEPHEN, 1989; IWAOKA, 1994; MUGHESH, 2000; SIES e cols, 2001) e compostos contendo Te (DETTY e cols, 1992; REN e cols, 2001; YOU e cols, 2003; BRAGA e cols, 2009). Esses compostos orgânicos de Te têm sido sugeridos como catalisadores em potencial na redução de peróxidos na presença de tióis (WIRTH, 1998; MISHRA e cols., 2006), muitas vezes apresentando atividade mimética maior do que os compostos orgânicos de Se. De particular importância, os compostos orgânicos de Se, além de atuarem como miméticos da GPx, também podem acelerar a oxidação de tióis mesmo na ausência de peróxidos catalisando a reação apresentada no Esquema 1 (NOGUEIRA e cols., 2004).



Esquema 1

Na presença de oxigênio os disselenetos orgânicos são regenerados (Esquema 2). Enquanto a atividade do tipo tiol peroxidase de disselenetos orgânicos é responsável pela propriedade antioxidante desses compostos, a oxidação de grupos tióis pelos disselenetos pode contribuir para sua propriedade toxicológica, pois pode alterar as funções biológicas de importantes moléculas contendo grupos SH.



Esquema 2

4.4. Glutationa peroxidase (GPx)

4.4.1. Glutationa (GSH)

O tripeptídeo glutaciona (γ -glutamilcisteinilglicina; GSH) é o tiol não-protéico mais abundante encontrado nas células foi descoberto em 1921 por Hopkins e possui um importante papel na proteção das células contra radicais livres, peróxidos, entre outros. Este tiol é sintetizado a partir da ação consecutiva de duas enzimas: γ -glutamilcisteinase e glutaciona-sintetase (MEISTER, 1974). Devido à nucleofilicidade do grupo sulfidrílico da GSH, este pode funcionar como um ótimo nucleófilo removendo muitos eletrófilos reativos evitando eventos oxidativos e protegendo grupamentos tióis de proteínas intracelulares (SHIGEOKA e cols., 1987). Durante a destoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) a GSH está envolvida em duas etapas de reações: (i) GSH reage não-enzimaticamente com radicais livres (SAEZ e cols., 1990); (ii) GSH doa elétron para a redução de peróxidos na reação que envolve a enzima glutaciona peroxidase (GPx) (CHANCE e cols., 1979). Nas células a GSH é regenerada a partir da glutaciona oxidada (GSSG) pela reação envolvendo a enzima glutaciona redutase (GR) (Fig. 1).

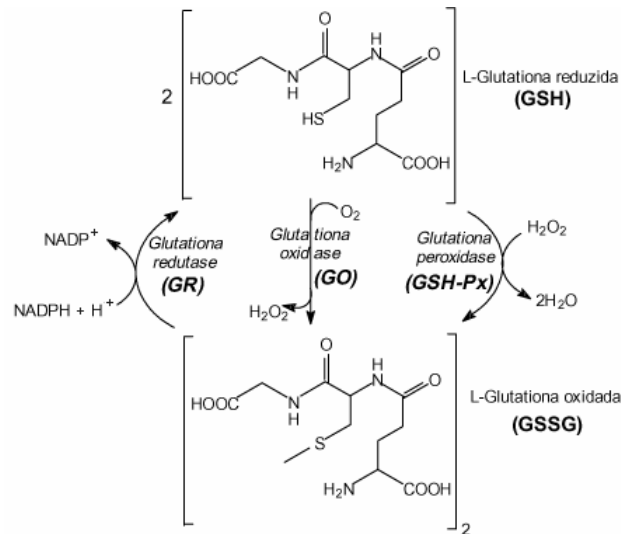


Figura 1. Reações catalisadas pelas enzimas GPx, GR e GO.

Deve-se observar que o sistema antioxidante que envolve a GSH é apenas uma pequena parte do sistema de defesa celular contra as EROs. Outras enzimas tais como, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), bem como os antioxidantes não-enzimáticos, por exemplo, o α -tocoferol e o ácido ascórbico também estão envolvidos na destoxificação de EROs (Fig. 2).

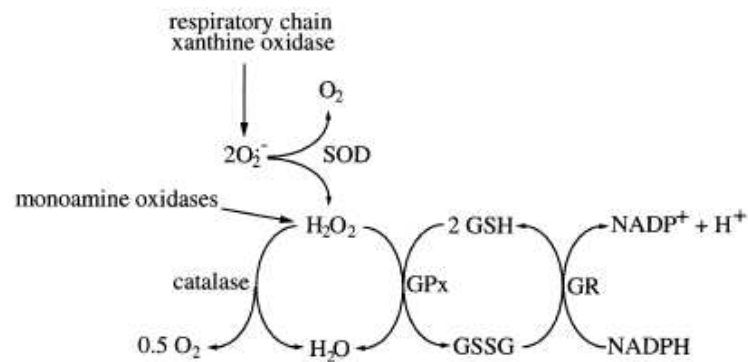


Figura 2. Geração e consumo do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio.

O ânion superóxido gerado pela cadeia respiratória (RADI e cols., 1997) ou pela xantina oxidase (HILE e cols., 1995) é convertido pela SOD a peróxido de hidrogênio. Oxidases em geral também geram peróxido de hidrogênio (FÍDOVICH e cols., 1995). Estes peróxidos são decompostos pela CAT ou GPx.

4.4.2. GPx: histórico

A glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) foi primeiramente descoberta por Mills em 1957, como uma enzima com função de proteger as células sanguíneas contra hemólise causada pela oxidação. A partir dos anos 70, foi demonstrado que a GPx é uma enzima selênio (Se)-dependente com estrutura tetramérica (FLOHÉ e cols., 1973) contendo um resíduo de selenocisteína (Sec) como subunidade participando do processo catalítico (CHAMBERS e cols., 1986). A Sec foi inicialmente considerada como sendo o 21º aminoácido devido a sua estrutura similar a da cisteína. Todavia, ela não faz parte dos 20 aminoácidos que possuem um códon específico, mas tem um processo bastante complexo de incorporação nas proteínas. De fato, a incorporação deste aminoácido envolve a interação com um códon de determinação UGA, que pela intervenção de elementos reguladores, incorpora um resíduo serinil (i.e., do aminoácido serina) que posteriormente tem uma substituição do oxigênio da sua hidroxila por um selênio, formando um selenol (-SeH). A GPx é uma importante enzima antioxidante que catalisa a redução de H₂O₂ ou hidroperóxidos orgânicos à água ou aos álcoois correspondentes usando a GSH como agente redutor (URSINI e cols., 1994).

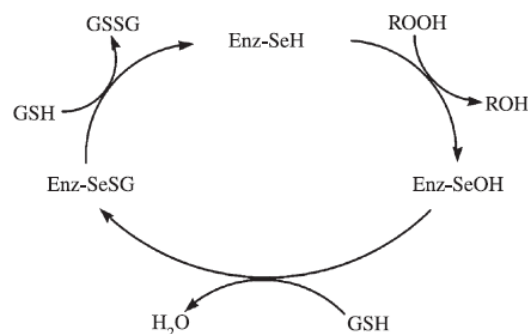
4.4.3. GPx: classificação

Além da GPx, também chamada de GPx clássica, citosólica ou celular (GPx1) existem mais cinco tipos de enzimas GPx (GPx2-GPx6) em mamíferos, as quais são divididas de acordo com a sequência de aminoácidos, especificidade por substrato e localização subcelular. Embora a GPx possa agir em uma ampla gama de substratos, dados experimentais *in vitro* sugerem que todos os tipos de GPx são específicos para a GSH como agente redutor. A GPx1 é a mais abundante selenoenzima, pois é encontrada em quase todos os tecidos (CHU e cols., 1993). A GPx2 é tetramérica e ocorre no citosol. Em ratos, é mais proeminente no tecido gastrointestinal; porém, em humanos é presente no fígado e intestino grosso, mas não em outros órgãos. A GPx2 possui um importante papel nos mamíferos na proteção contra a toxicidade da ingestão de hidroperóxidos lipídicos, mas não para hidroperóxidos de fosfolipídios (CHENG e cols., 1997). A GPx3 foi primeiramente identificada no plasma humano e é uma glicoproteína compatível com sua função

extracelular (TAKAHASHI e cols., 1987). A GPx4, também chamada de fosfolípido hidropéroxido, está associada à membrana celular e é descrita como uma proteína inibidora de peroxidação. Em contraste com as outras GPx, as quais possuem estrutura tetramérica, a GPx4 é um monômero e encontra-se principalmente no cérebro e coração de mamíferos (DUAN e cols., 1988; URSINI e cols., 1995). Todas as GPx1-GPx4 possuem um resíduo de selenocisteína no sítio ativo o qual é sucessivamente oxidado e então reduzido durante o ciclo catalítico (AUMANN e cols., 1997). Os outros dois tipos de GPx, GPx5 e GPx6, diferem das demais por serem selênio não-dependentes, ou seja, apresentam cisteína no sítio catalítico (KRYUKOV e cols., 2003). Suas funções biológicas ainda não estão bem estabelecidas

4.4.4. GPx: mecanismo catalítico

Estudos demonstraram que o sítio catalítico da enzima GPx é composto pelo resíduo de selenocisteína, que contém selênio (Se) o qual está envolvido na formação do intermediário selenol (Enz-SeH), que reage com o peróxido reduzindo-o à água ou álcool formando o ácido selênico (Enz-SeOH). Este reage, então, com a glutathiona reduzida (GSH) formando o selenosulfeto (Enz-SeSG). Finalmente, este é atacado por um segundo equivalente de GSH regenerando a forma ativa da enzima e produzindo simultaneamente a glutathiona oxidada (GSSG) (Esquema 3) (WENDEL e cols., 1984; URSINI e cols., 1995).



Esquema 3. Ciclo catalítico da enzima GPx.

Então, a reação global do ciclo catalítico da enzima GPx envolve a oxidação de dois equivalentes de GSH a dissulfeto, enquanto o hidropéroxido é convertido à água e/ou álcool correspondente.

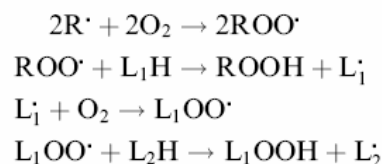
Desde a descoberta das funções do Se em sistemas enzimáticos biológicos, muitos estudos têm voltado sua atenção para a síntese de novos compostos organocalcogênicos que possam mimetizar essa importante enzima antioxidante, não apenas para elucidar o mecanismo catalítico, como também para uma possível aplicação farmacológica destes compostos. Na literatura, muitos estudos demonstram que os compostos orgânicos de Se e Te sintéticos são excelentes miméticos da enzima GPx, o Te devido a habilidade que possui de passar do estado de oxidação divalente +2 para o tetravalente +4 e retornar ao divalente +2 (REICH, 1987) enquanto que alguns compostos orgânicos de selênio podem gerar selenol após a interação com tióis .

4.5. Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas normalmente durante o metabolismo celular aeróbico. As EROs incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), bem como radicais livres tais como ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$, radical hioxila ($\cdot OH$) entre outros. Estas moléculas são normalmente neutralizadas pelos sistemas antioxidantes presentes nos organismos. As defesas antioxidantes podem ser tanto enzimáticas (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, etc) quanto não-enzimáticas (glutathione, tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), etc). Assim, o estresse oxidativo pode resultar tanto de um aumento na produção de EROs quanto da redução da capacidade antioxidante celular total, ou seja, a ocorrência de um dano oxidativo depende de um desequilíbrio entre a produção de EROs e a atividade das defesas antioxidantes (HALLIWELL, 1992). De acordo com Halliwell and Gutteridge, o termo antioxidante significa: “substância que, quando presente em baixas concentrações comparado a um substrato oxidável, significativamente previne a oxidação deste substrato”. O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica de elevadas concentrações de EROs causando danos às estruturas moleculares de componentes celulares tais como, lipídios, proteínas, carboidratos e DNA com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos ou órgãos (HALLIWELL e CROSS, 1994).

4.5.1. Peroxidação lipídica

Os fosfolipídios apresentam uma cabeça polar e uma cauda hidrofóbica e são os principais constituintes das membranas celulares. Geralmente, estas caudas hidrofóbicas são compostas por ácidos graxos, que podem apresentar uma ou mais dupla ligação (insaturação) (HALLIWELL e cols., 1989; HALLIWELL, 2007). Os radicais livres são espécies eletrofilicas extremamente reativas que podem reagir com os componentes celulares e podem atacar uma diversidade de biomoléculas alvos. A peroxidação lipídica (PL) consiste no ataque das EROs aos lipídios insaturados das membranas biológicas. Esta interação pode levar a modificação nos lipídios de membrana que conseqüentemente levará à perda nas características das membranas biológicas, criando fendas iônicas que alteram sua permeabilidade, o que favorece o trânsito indiscriminado de metabólitos e detritos celulares, provocando a lise celular (JOSEPHY, 1997). A peroxidação de lipídios (PL) levando a formação de hidroperóxidos (LOOH) pode ser resumida nas reações abaixo (LAGUERRE e cols., 2007), onde R[•] representa um radical livre em meio aeróbico com conseqüente formação de radical peróxido, o qual retira um átomo de hidrogênio de uma molécula de lipídio insaturado formando hidroperóxido (ROOH) e outro radical livre (L[•]).



O hidroperóxido formado pode ser quebrado e formar outros produtos como alcanos e aldeídos, dentre os quais o malondialdeído (MDA), que é um marcador químico da PL. Estudos que visam investigar o envolvimento da PL podem ser feitos utilizando uma técnica de determinação indireta das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, na qual um dos produtos finais da PL, o MDA, reage com o ácido tiobarbitúrico, originando um produto de cor rosa que pode ser quantificado espectrofotometricamente (OHKAWA e cols., 1979).

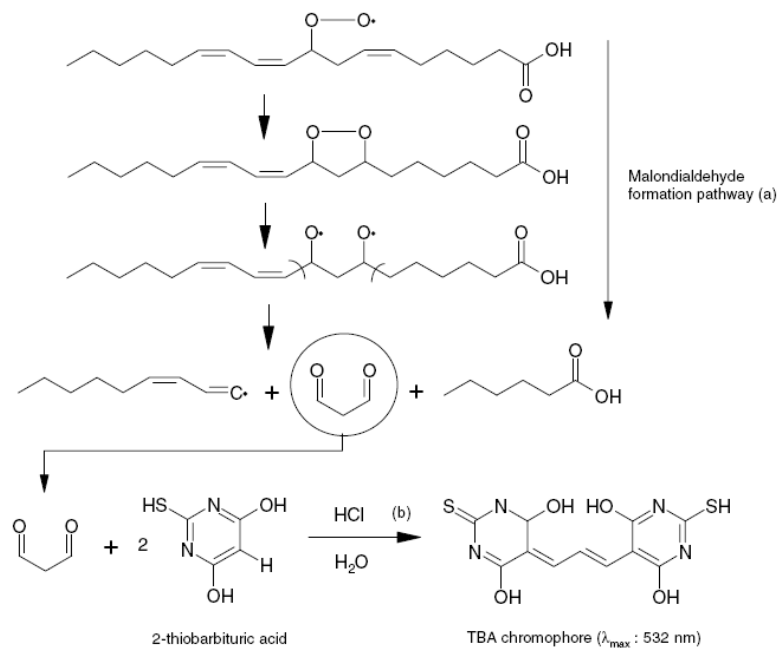


Figura 3. (a) Formação do MDA a partir da peroxidação lipídica de um ácido graxo triinsaturado C18 e (b) formação do complexo cromóforo TBA-MDA.

4.5.1.1. Ferro(II) como agente pró-oxidante

O ferro desempenha um papel importante nos processos metabólicos dos animais, sendo um constituinte vital nas células de todos os mamíferos, e também está presente em algumas enzimas que catalisam mecanismos de oxidação celular. O ferro é de grande importância nos sistemas biológicos, uma vez que participa de uma grande variedade de reações de transporte de elétrons. Porém, estes íons podem estimular a produção de radicais livres por diferentes mecanismos (BRAUGHLER e cols., 1986; MINOTTI e cols., 1992). Inúmeras evidências sugerem o acontecimento de uma cascata de reações durante o processo neurodegenerativo, incluindo a PL e disfunção mitocondrial, os quais vão culminar no dano do citoesqueleto e consequente morte celular (LAGUERRE e cols., 2007). A produção excessiva de H₂O₂ e ânion superóxido podem resultar em dano celular através de uma cadeia de reações de PL nas membranas celulares e alterações na fluidez da membrana. No entanto, o H₂O₂ é relativamente inerte, e o dano celular ocorre quando EROs e radicais hidroxila altamente reativos são produzidos pela reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet + \text{HO}^-$) na qual um metal de transição reduzido, como o ferro, doa um elétron para o H₂O₂. Assim a reação de Fenton converte H₂O₂ para o mais citotóxico das EROs, o radical hidroxil (HO[•]). Desta forma, a participação

do ferro é essencial na produção do HO^\bullet , o qual pode subsequentemente iniciar a PL ou oxidar grande parte das moléculas presentes nos sistemas biológicos e propagar reações de radicais livres.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Artigo científico

5.1.1. Determinação da atividade GPx like

A reação catalítica para a enzima GPx ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{PhSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{PhSSPh}$) (TOMODA e cols., 1994) foi iniciada através da adição de H_2O_2 (5 mM) à uma solução metanólica contendo PhSH (1,9 ou 5 mM) na presença dos compostos **7a-o** (0,05 ou 0,1 mM), separadamente, a 30 °C e monitorado espectrofotometricamente (UV; $\lambda = 305$ nm) durante 6 min. Para cada composto a reação foi repetida pelo menos 3 vezes nas mesmas condições.

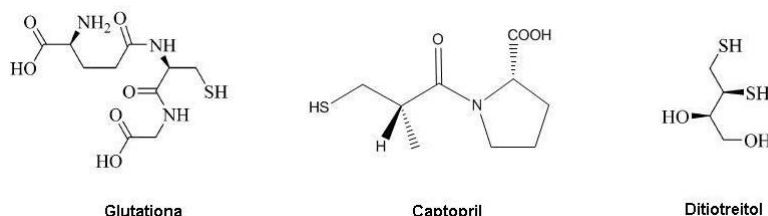
5.2. Manuscrito (em preparação)

5.2.1. Determinação da atividade GPx like e análise de parâmetros cinéticos

Os valores de T_{50} foram determinados (disselenetos **A-D**, 0,025 mM; PhSH, 1,9 mM; H_2O_2 , 5 mM). Para os parâmetros cinéticos, a reação catalítica modelo para a enzima GPx ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{PhSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{PhSSPh}$) foi iniciada através da adição de diferentes quantidades do substrato H_2O_2 (concentrações finais: 5, 10, 15 e 30 mM) à uma solução metanólica contendo o substrato PhSH (concentrações finais: 0,495; 0,95; 1,18; 1,45 e 1,9 mM) na presença dos compostos **B-D** (0,005; 0,01 e 0,025 mM), separadamente, a 30 °C e após monitorado espectrofotometricamente (UV; $\lambda = 305$ nm) durante 6 min, a reação foi repetida pelo menos 3 vezes nas mesmas condições para cada composto testado. Os dados cinéticos foram analisados através de diagrama do duplo recíproco de acordo com a equação 1, onde o V_{max} significa velocidade máxima e K_m é a constante de Michaelis para H_2O_2 ($K_{m_{\text{H}_2\text{O}_2}}$) e PhSH ($K_{m_{\text{PhSH}}}$).

5.2.2. Quantificação de grupamentos sulfidrílicos

A atividade tiol oxidase foi determinada de acordo com o método proposto por ELLMAN, 1959, RIDDLES e cols.1979). Os compostos (100 μ M) foram dissolvidos em MeOH e então incubados a 37°C separadamente em um meio de reação aquoso contendo tampão 50 mM Tris/HCl (pH 7,4) e os respectivos compostos sulfidrílicos testados neste estudo (glutathiona (GSH), 1 mM; captopril, 1 mM; ou ditioneitol (DTT), 0,5 mM) (volume final = 1800 μ L). Uma alíquota de 100 μ L de cada amostra foi retirada em diferentes tempos durante a reação (0, 30, 60 e 120 min) e adicionada a um sistema contendo 25 μ L de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) (10 mM) e tampão 100 mM Tris/HCl (pH 7,4) (volume final = 1800 μ L). As amostras foram analisadas espectrofotometricamente (λ = 412 nm). Juntamente com o experimento, foi feita uma curva padrão para cada composto sulfidrílico utilizado (GSH, Captopril ou DTT).



5.2.3. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (com \pm 3 meses de idade), pesando entre 270 e 320 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. Os animais foram mantidos no Biotério em gaiolas com livre acesso à comida e água a uma temperatura controlada (22 ± 3 °C) e em um ciclo claro/escuro de 12:12 horas. Os animais foram mantidos e usados de acordo com as normas do Comitê de Bem Estar Animal (COBEA).

5.2.4. Preparação do homogenato

Os ratos foram eutanasiados e o tecido encefálico foi rapidamente dissecado, armazenado no gelo e pesado. O tecido encefálico foi imediatamente homogeneizado em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 (1/10, p/v). O homogeneizado foi centrifugado por 10 min a 4000 x g (25 °C) e o sobrenadante (S1) foi utilizado para os ensaios de TBARS.

5.2.5. Quantificação de TBARS

Imediatamente após a centrifugação, uma alíquota de 100 µl de S1 foi incubada por 1 h a 37 °C com o pró-oxidante Fe²⁺ (10 µM), na presença dos compostos **C**, **D** e PhSeSePh, separadamente, e então utilizada para a determinação da PL. A produção de TBARS foi determinada por método colorimétrico ($\lambda = 532$ nm) (OHKAWA e cols., 1979; PUNTEL e cols., 2005).

5.2.6. Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste Post Hoc de Duncan quando apropriado. As análises foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

6. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1. Artigo científico

Os resultados a seguir constam no artigo científico intitulado “*Synthesis of telluroamino acid derivatives with remarkable GPx like activity*” publicado na revista *Organic & Biomolecular Chemistry* (2009) 7:43–45. É importante salientar que os compostos avaliados neste estudo foram sintetizados pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Antônio L. Braga (Setor de Química - UFSM).

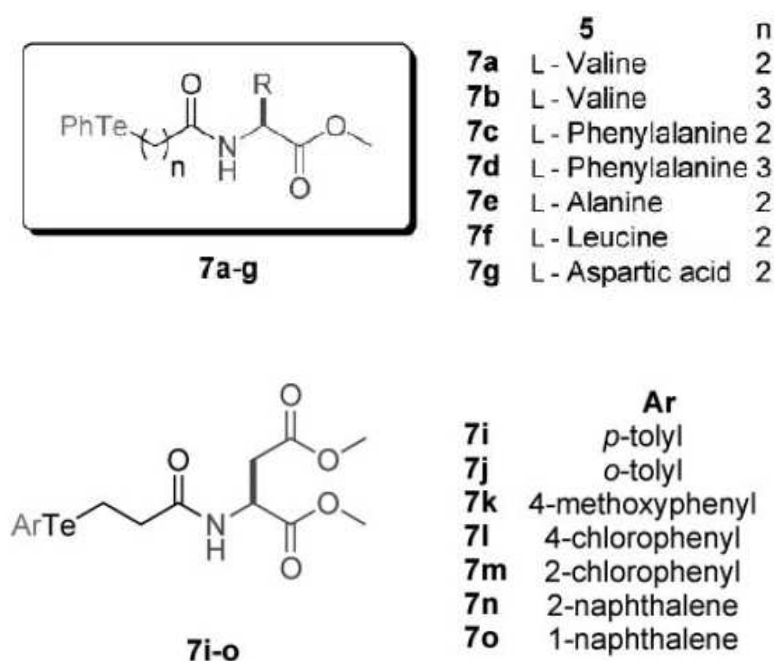


Figura 1. Estrutura dos compostos orgânicos de Te utilizados neste estudo.

Com a finalidade de investigar a influência que resíduo de aminoácido pode causar na redução de peróxido de hidrogênio à água na presença de tiol em excesso, avaliou-se de maneira comparativa a atividade dos compostos **7a–d** (Figura 2). Podemos observar que ocorreu um aumento linear na formação de PhSSPh na mistura contendo MeOH, PhSH, H₂O₂ e os catalisadores **7a–d** (2.6 mol%). O composto **7c** com menor cadeia de carbono entre o resíduo de aminoácido e o átomo de Te mostrou a mesma atividade que os compostos **7a** e **7b**. Os compostos **7c** (*n*=2) e **7d** (*n*=3) derivados da L-fenilalanina foram testados nas mesmas condições. Porém, o composto **7d** foi menos efetivo na redução do peróxido de hidrogênio demonstrando uma menor atividade GPx like.

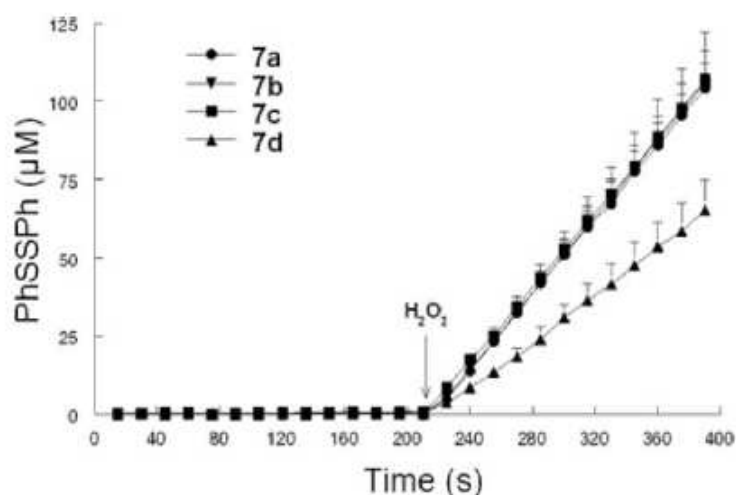
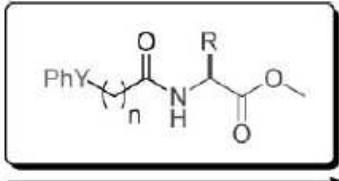


Figura 2. Atividade GPx like dos compostos **7a–d**.

Os compostos **7a** (*n* = 2) e **7b** (*n* = 3) derivados da L-valina e **7c** (*n* = 2) da L-fenilalanina apresentaram valores de T₅₀ bastante aproximados (~13 min) (Tabela 1). Para o composto **7d** (*n*=3) derivado da L-fenilalanina os valor encontrado foi 21,61 min. Os teluretos derivados da L-alanina (**7e**) e L-leucina (**7f**) apresentaram um T₅₀ de 10,41 e 12,75 min, respectivamente. O telureto **7g** derivado do ácido L-aspártico se mostrou mais efetivo na decomposição do peróxido de hidrogênio, obtendo-se um T₅₀ igual a 8,15 min. Por outro lado, o composto **7h**, composto de Se análogo ao telureto **7a**, não promoveu a redução do H₂O₂ de maneira apreciável (T₅₀ = 25,71 h). O ditelureto de difenila (PhTeTePh) (T₅₀ = 16,73 (±0,26) min) também foi utilizado nessas mesmas condições, se mostrando menos efetivo que os compostos **7a–c** e **7e–g**.

Tabela 1. Determinação do T_{50} (tempo gasto, em minutos, para reduzir a concentração de tiol em 50%) dos compostos **7a-g**.



$\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{PhSH} \xrightarrow[\text{MeOH}]{} 2 \text{H}_2\text{O} + \text{PhSSPh}$

Entry ^a	Catalyst ^b	Y	<i>n</i>	R	$T_{50}^{c,d}$
1	7a	Te	2	i-Pr	13.43 (±0.15)
2	7b	Te	3	i-Pr	13.14 (±0.27)
3	7c	Te	2	Bn	13.43 (±0.31)
4	7d	Te	3	Bn	21.61 (±1.10)
5	7e	Te	2	Me	10.41 (±0.52)
6	7f	Te	2	i-Bu	12.75 (±1.03)
7	7g	Te	2	CH ₂ COOMe	8.15 (±0.61)
8	7h	Se	2	i-Pr	1543 (±1.82)

^a Under this condition addition of H₂O₂ in the absence of telluride did not produce any significant oxidation of PhSH. ^b MeOH (1 mL); catalyst [0.05 mmol L⁻¹]; PhSH [1.9 mmol L⁻¹]; H₂O₂ [8.8 mmol L⁻¹]. ^c T_{50} is the time required, in min, to reduce the thiol concentration with 50% after the addition of H₂O₂; ^d Data in parentheses: experimental error.

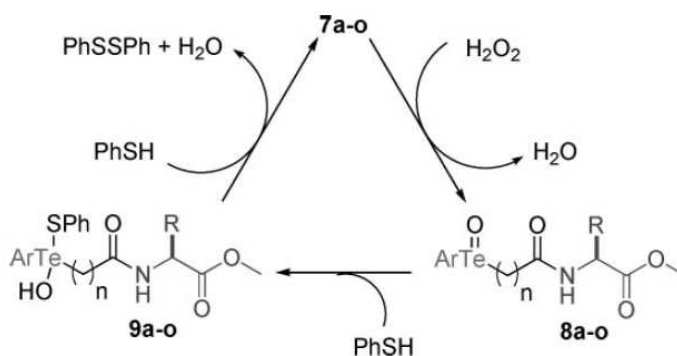
Considerando que o composto **7g** resultou no melhor T_{50} dentre os demais compostos avaliados na Tabela 1, surgiu o interesse em explorar as propriedades miméticas da GPx de teluretos derivados do composto **7g** possuindo diferentes grupamentos arila. Assim, fez-se necessário o desenvolvimento de uma nova etapa de avaliação da propriedade GPx like de uma nova série de compostos orgânicos **7i-o** (2 mol%) em uma solução mais concentrada de PhSH e de catalisador (Tabela 2).

De acordo com os dados da Tabela 2, pode-se observar que os valores de T_{50} para os compostos *para* substituídos foram menores do que para os compostos análogos *orto* substituídos, sugerindo que a atividade mimética à enzima GPx desses compostos possui uma forte influência do efeito estérico (**7i** e **7j**, **7l** e **7m**). A variação no ambiente eletrônico ao redor do átomo de Te não mostrou nenhuma mudança relevante na atividade tiol peroxidase desses compostos. Os valores de T_{50} dos compostos **7g**, **7i**, **7k**, e **7l** ficaram entre 2,11 e 2,98 min.

Tabela 2. Determinação do T_{50} (tempo gasto, em minutos, para reduzir a concentração de tiol em 50%) dos compostos **7g-o**.

Entry ^a	Catalyst ^b	Ar	T_{50} ^{c,d}
1	7g	phenyl	2.98 (± 0.21)
2	7i	<i>p</i> -tolyl	2.78 (± 0.20)
3	7j	<i>o</i> -tolyl	4.78 (± 0.12)
4	7k	4-methoxyphenyl	2.11 (± 0.24)
5	7l	4-chlorophenyl	2.94 (± 0.19)
6	7m	2-chlorophenyl	8.14 (± 1.52)
7	7n	2-naphthalene	3.65 (± 0.18)
8	7o	1-naphthalene	4.27 (± 0.32)

^a Under this condition addition of H_2O_2 in the absence of telluride did not produce any significant oxidation of PhSH. ^b MeOH (1 mL); catalyst [0.1 mmol L^{-1}]; PhSH [5 mmol L^{-1}]; H_2O_2 [5 mmol L^{-1}]. ^c T_{50} is the time required, in min, to reduce the thiol concentration with 50% after the addition of H_2O_2 . ^d Data in parentheses: experimental error.



Esquema 1

Em relação ao mecanismo de ação dos teluretos utilizados neste estudo, como miméticos da GPx, acreditamos que inicialmente os compostos de Te (II) **7a-o** reagem com H_2O_2 para formar teluróxido **8a-o**, e H_2O (Esquema 1). A adição de um equivalente de PhSH a esses compostos gera o sulfeto de telurenila **9a-o** o qual reage com outro equivalente de PhSH para regenerar **7a-o** no ciclo catalítico e produzir PhSSPh e H_2O .

6.2. Manuscrito (em preparação)

Os resultados a seguir são preliminares e constam no manuscrito em preparação intitulado “*New Diselenoamino Acid Derivatives With GPx Mimic Properties*”. É importante salientar que os compostos avaliados neste estudo foram sintetizados pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Antônio L. Braga (ALBERTO e cols., submetido) (Setor de Química - UFSM).

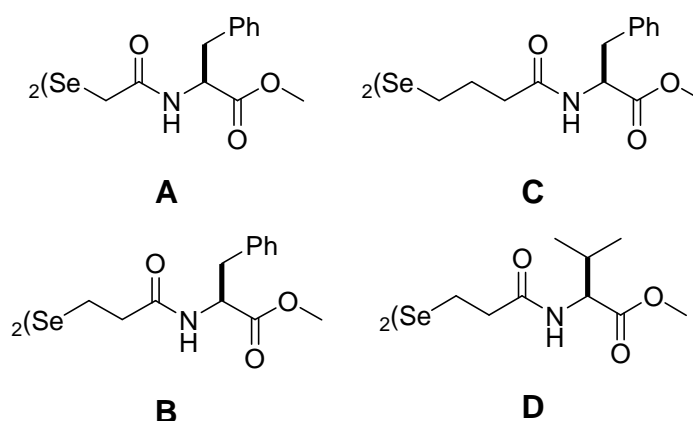


Figura 1. Estrutura de disselenetos derivados da *L*-fenilalanina (**A-C**) e derivado da *L*-valina (**D**).

6.2.1. Determinação dos valores de T_{50} para o disseleneto de difenila e seus derivados (**A-D**)

Considerando as diferentes estruturas dos disselenetos (**A-D**), avaliamos a influência tanto do número de carbonos entre o resíduo de aminoácido e o átomo de Se quanto do resíduo de aminoácido presente na estrutura dos disselenetos na redução do peróxido de hidrogênio (Figura 2). Os compostos **B**, **C** e **D** apresentaram melhor atividade mimética da GPx do que PhSeSePh. O disseleneto **D**, derivado da *L*-valina, obteve a melhor atividade GPx like ($T_{50} = 42,18$ min) seguido pelos compostos **C** e **B** derivados da *L*-fenilalanina ($T_{50} = 45,15$ min e 51,38 min, respectivamente) (Tabela 1). O composto **A**, o qual possui menor cadeia carbonada que os demais disselenetos, foi o menos efetivo na redução de peróxido de hidrogênio ($T_{50} = 93,03$ min).

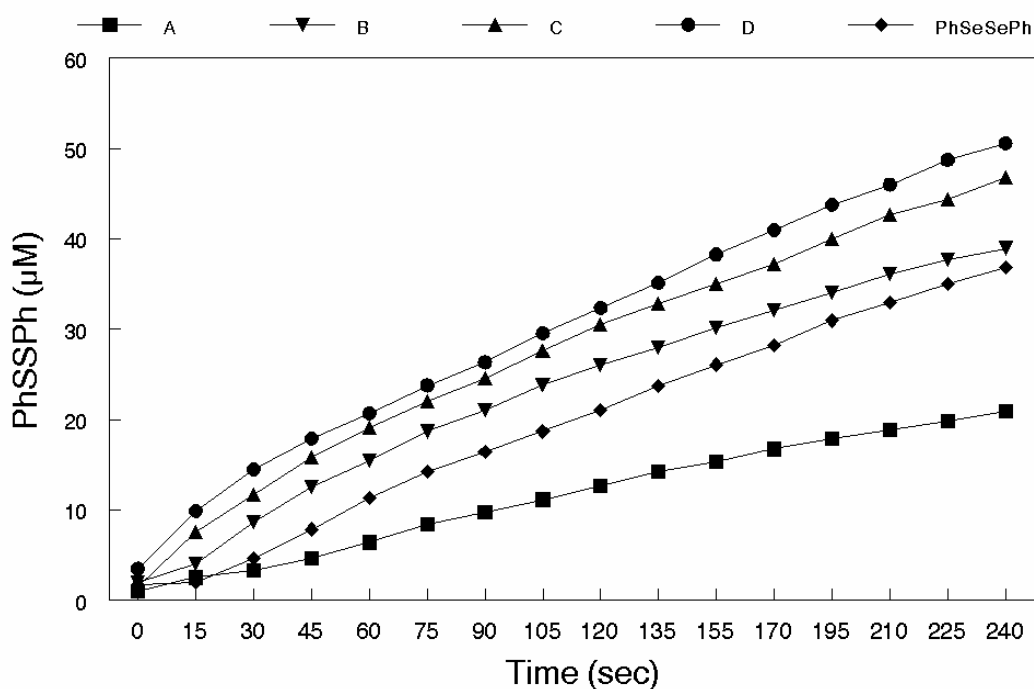


Figura 2. Atividade GPx like dos disselenetos **A-D** e PhSeSePh.

Tabela 1. Determinação do T_{50} dos compostos **A-D** e PhSeSePh

Catalyst ^{a,b}	T_{50} (min) ^c
A	93.03 (\pm 5.77) ^d
B	51.38 (\pm 2.45)
C	45.15 (\pm 3.17)
D	42.18 (\pm 2.75)
PhSeSePh	51.80 (\pm 2.83)

^aNessas mesmas condições, mas com ausência de catalisador não foi possível observar a oxidação do PhSH após a adição de H_2O_2 . ^b MeOH (1 mL); disselenetos (0,025 mM); PhSH (1,9 mM); H_2O_2 (5 mM). ^c T_{50} (tempo gasto, em minutos, para reduzir a concentração de tiol em 50%). ^d Dados entre parênteses representam a médias de erro padrão (\pm S.E.M).

6.2.2. Determinação dos parâmetros cinéticos do PhSeSePh e seus derivados (**B-D**) na redução de H_2O_2 nas diferentes concentrações de PhSH (0,495 – 1,9 mM)

Os parâmetros cinéticos para os diferentes catalisadores (**B**, **C** e **D**) foram determinados através do gráfico de duplo-recíproco (Figura 3). Foram testadas diferentes concentrações de PhSH enquanto a concentração de H_2O_2 foi mantida constante, com o objetivo de se comparar o comportamento catalítico dos compostos ao da GPx, de acordo com o modelo reacional utilizado nesse estudo.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que os compostos **C** e **D** apresentaram valores de V_{max} maior que o obtido pelo PhSeSePh, sendo os compostos **C** e **D** os maiores valores de V_{max} obtidos (Tabela 2).

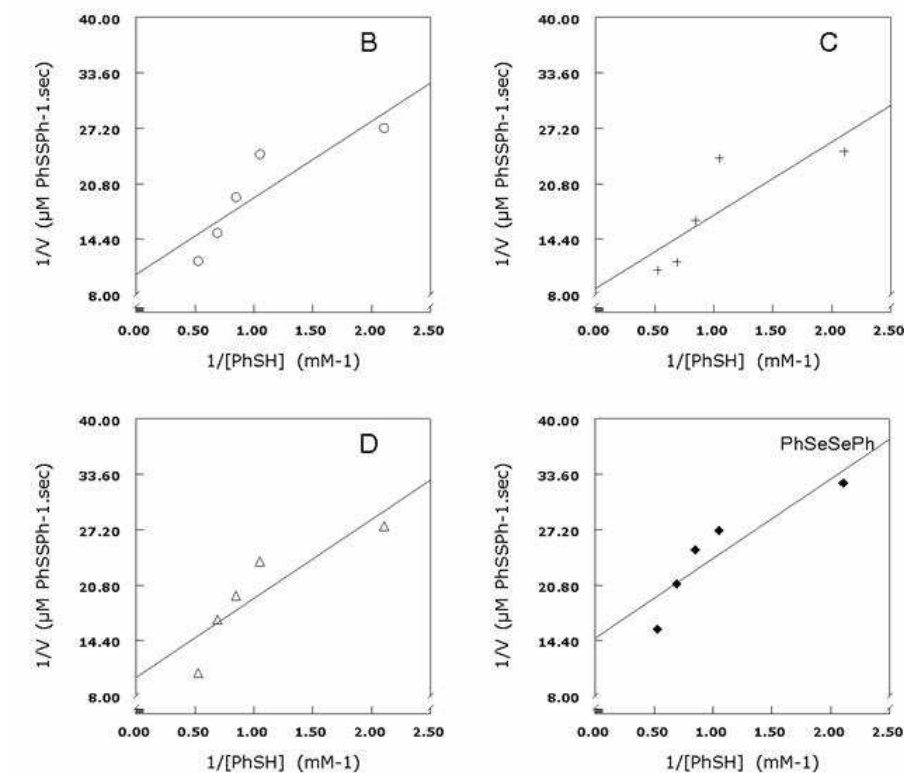


Figura 3. Gráfico do duplo-recíproco ($1/v$ vs $1/[PhSH]$) para os compostos **B**, **C**, **D** e PhSeSePh. $[H_2O_2]$ foi mantida fixa à 5 mM; [Disselenetos] = 100 μ M; $[PhSH] = 0,495 - 1,9$ mM.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos para os diferentes disselenetos testados (**B**, **C**, **D** e PhSeSePh). $[H_2O_2]$ foi mantida fixa à 5 mM; [Disselenetos] = 100 μ M; $[PhSH] = 0,495 - 1,9$ mM.

Compound	$Km_{PhSH}(\mu M)$	$V_{max} (\mu M s^{-1})$	$V_{max}/Km (s^{-1})$
B	0.950	0.081	0.085
C	0.862	0.097	0.112
D	0.896	0.098	0.109
PhSeSePh	0.856	0.087	0.101

6.2.3. *Determinação dos parâmetros cinéticos do PhSeSePh e seus derivados (B-D) na redução de H_2O_2 (5 – 30 mM) enquanto a concentração de PhSH foi mantida fixa (1,9 mM)*

Considerando que o composto **B** exibiu menor atividade (V_{max_B} 0,081) quando comparados aos compostos **C** e **D** (V_{max_C} 0,098; V_{max_D} 0,097) (Tabela 2) foram também investigados os disselenetos **C** e **D** através do gráfico duplo-recíproco variando a concentração de H_2O_2 (5-30 mM) (Figura 4) e fixando a concentração do PhSH à 1,9 mM. Além disso, a atividade dos compostos **C** e **D** mostrou-se dependente do aumento da concentração para se obter uma maior afinidade com o substrato além de provocarem um aumento na V_{max} . Os valores de V_{max}/K_m , os quais representam a afinidade da enzima pelo substrato (XIE e cols., 2006), foram determinados e comparados, e os resultados mostraram que a afinidade pelo peróxido de hidrogênio aumenta com o aumento da concentração destes compostos (Tabela 3).

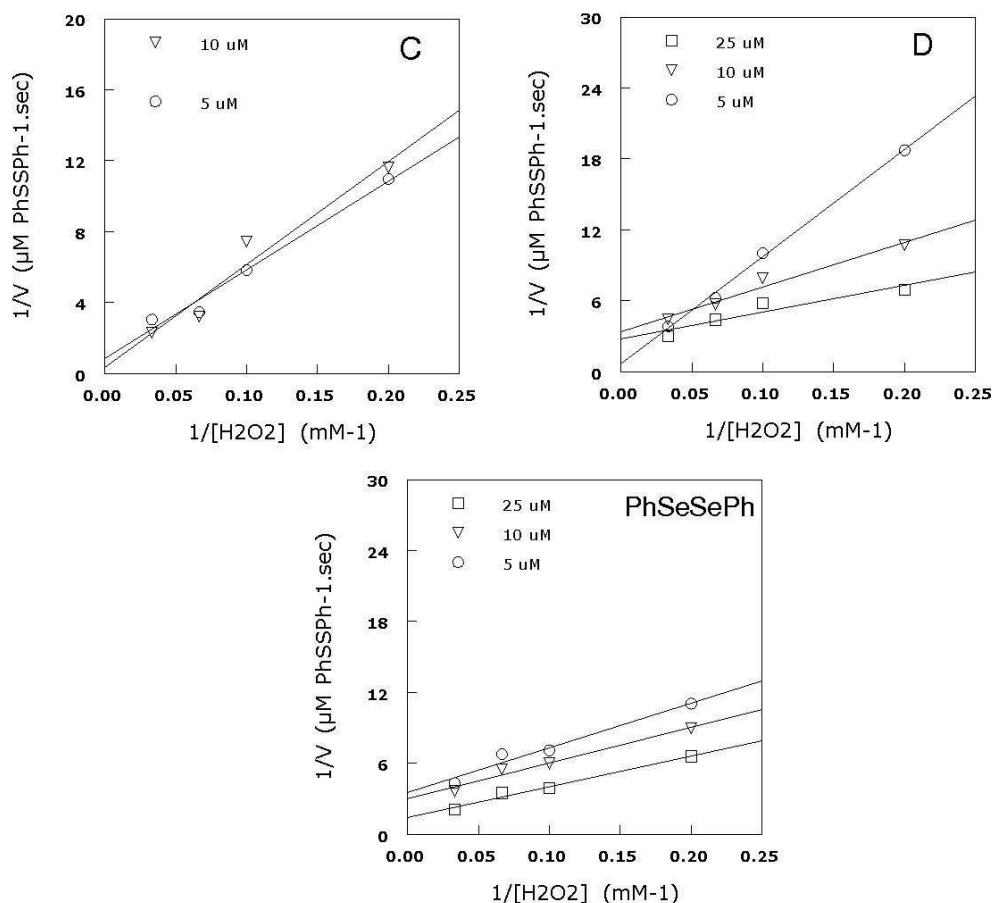


Figure 4. Gráfico do duplo-recíproco ($1/v$ vs $1/[H_2O_2]$) para os compostos **C**, **D** e PhSeSePh. $[H_2O_2] = 5-30$ mM; [Disselenetos] = 5 μ M, 10 μ M e 25 μ M; [PhSH] foi mantida fixa à 1,9 mM.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos para os diferentes disselenetos testados (**C**, **D** e PhSeSePh). $[H_2O_2] = 5 - 30 \text{ mM}$; $[Disselenetos] = 5 \text{ } \mu\text{M}$, $10 \text{ } \mu\text{M}$ e $25 \text{ } \mu\text{M}$; $[PhSH]$ foi mantida fixa à $1,9 \text{ mM}$.

Compound		$Km_{H_2O_2}(\mu\text{M})$	$V_{max} (\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1})$	$V_{max}/Km (\text{s}^{-1})$
C	5 μM	60.79	1.21	0.020
	10 μM	20.12	0.546	0.027
D	5 μM	26.8	0.460	0.017
	10 μM	11.13	0.294	0.026
	25 μM	8.05	0.358	0.044
PhSeSePh	5 μM	10.80	0.284	0.026
	10 μM	10.07	0.334	0.033
	25 μM	18.48	0.711	0.038

6.2.4. Interação entre os disselenetos e grupos sulfidrílicos

A interação dos disselenetos com os grupos sulfidrílicos da GSH, captopril e DTT (ditiotreitól) foi investigada. Sabendo que a atividade mimética da enzima GPx de compostos de selênio/telúrio depende da reatividade desses compostos com grupamentos tióis na presença de peróxidos, foi demonstrado que a atividade GPx like de compostos de selênio não depende apenas da reatividade do intermediário selenol com peróxidos, mas também depende da reatividade do intermediário selenosulfeto com grupos tióis (MISHRA e cols., 2006). Então, neste caso podemos sugerir que uma maior reatividade do composto com grupo tiol pode estar associado a um aumento na propriedade mimética da enzima GPx desse composto. Assim, a oxidação de grupos sulfidrílicos pelos disselenetos (**A**, **B**, **C** e **D**) foi quantificada.

Os grupos sulfidrílicos do DTT se mostraram mais suscetíveis à oxidação pelos disselenetos do que os monotióis. Esta alta reatividade do DTT (Tabela 6) pode estar associada à presença de dois grupos sulfidrílicos vicinais em sua estrutura (ZÄHLER e cols., 1968). Os disselenetos **C** e **D** mostraram um efeito mais potente na oxidação de grupos tióis, tanto para os monotióis (GSH e Captopril) (Tabela 4 e 5) quanto para o DTT (Tabela 6), quando comparados aos outros disselenetos testados **A** e **B**. O maior consumo de grupo tiol para os compostos **C** e **D** ocorreram na presença de DTT, o consumo de grupo SH do DTT no final da reação (120 min) comparados com o início da reação (0 min) foram de 33.55% e 65.6%,

respectivamente (Tabela 6). Os compostos **A** e **B** também apresentaram capacidade de oxidar grupo SH, mas não foram tão proeminentes quanto os disselenetos **C** e **D**.

Tabela 4. Efeito de diferentes disselenetos (**A**, **B**, **C** e **D**) frente à oxidação de grupos SH da glutathiona (1 mM) de acordo com a reação de Ellman (1959). Os valores (expressos em μM) são a média \pm S.E.M de 3 a 4 experimentos independentes feitos em duplicata ou triplicata.

GSH	SH group				
	0'	30'	60'	120'	consumed (%)
blank	90.75 \pm 6.4	94.33 \pm 5.8	93.75 \pm 11.2	88.53 \pm 10.6	2.44
control	92.75 \pm 4.7	90.05 \pm 8.0	89.25 \pm 7.3	87.02 \pm 9.2	6.17
<i>Compound</i>					
A	92.49 \pm 4.6	86.95 \pm 4.1	81.36 \pm 9.5	75.98 \pm 12.3	17.86
B	90.62 \pm 11.8	85.63 \pm 9.8	81.54 \pm 9.9	74.23 \pm 8.8	18.08
C	86.2 \pm 4.8	74.17 \pm 7.2	69.25 \pm 4.6	64.59 \pm 5.9	25.06
D	85.2 \pm 9.8	81.14 \pm 5.9	67.75 \pm 11.3	55.61 \pm 6.3	34.73

Tabela 5. Efeito de diferentes disselenetos (**A**, **B**, **C** e **D**) frente à oxidação de grupos SH do captopril (1 mM) de acordo com a reação de Ellman (1959). Os valores (expressos em μM) são a média \pm S.E.M de 3 a 4 experimentos independentes feitos em duplicata ou triplicata.

Captopril	SH group				
	0'	30'	60'	120'	consumed (%)
blank	90.25 \pm 15.29	89.5 \pm 9.6	85.69 \pm 16.1	82.94 \pm 4.46	8.09
control	93.2 \pm 14.22	87.56 \pm 14.4	84.37 \pm 14.7	82.15 \pm 6.79	11.85
<i>Compound</i>					
A	89.3 \pm 10.4	84.69 \pm 10.3	78.1 \pm 12.6	72.7 \pm 4.4	18.5
B	89.11 \pm 9.6	82.09 \pm 9.5	76.71 \pm 9.5	69.84 \pm 5.3	21.6
C	87.04 \pm 13.3	80.31 \pm 7.4	71.43 \pm 7	62.04 \pm 9.1	28.6
D	93.04 \pm 12.2	77.13 \pm 11.8	66.64 \pm 10.4	57.29 \pm 4.3	38.4

Tabela 6. Efeito de diferentes disselenetos (**A**, **B**, **C** e **D**) frente à oxidação de grupos SH do DTT (0.5 mM) de acordo com a reação de Ellman (1959). Os valores (expressos em μM) são a média \pm S.E.M de 3 a 4 experimentos independentes feitos em duplicata ou triplicata.

DTT					SH group
	0'	30'	60'	120'	consumed (%)
<i>blank</i>	92.01 \pm 11.3	85.69 \pm 11.6	82.56 \pm 3.4	79.97 \pm 10.4	13.07
<i>control</i>	94.12 \pm 14.4	88.3 \pm 9.6	84.26 \pm 5.4	80.01 \pm 7.8	15.00
<i>Compound</i>					
A	94.27 \pm 16.1	91.56 \pm 3.1	85.16 \pm 2.8	79.13 \pm 10.6	16.06
B	93.13 \pm 9.1	81.05 \pm 5.2	79.14 \pm 7.4	75.04 \pm 5.6	19.42
C	89.37 \pm 13.73	83.71 \pm 10.9	70.77 \pm 5.3	59.75 \pm 9.4	33.55
D	95.12 \pm 8.5	77.18 \pm 3.7	49.54 \pm 4.9	33.14 \pm 5.3	65.6

6.2.5. Quantificação de TBARS

Quando grupos SH são oxidados as funções fisiológicas das moléculas contendo tióis podem ser alteradas, levando ao estresse oxidativo. Devido a isso, o efeito dos disselenetos contra a peroxidação lipídica foi avaliada. A Figura 5 mostra a proteção proporcionada pelos disselenetos **C** e **D** os quais demonstraram melhor propriedade mimética da enzima GPx, nesse estudo. A produção de TBARS causada pelo Fe(II) foi consideravelmente reduzida na presença dos disselenetos **C** e **D**, e observou-se que essa diminuição nos níveis de MDA foi dependente da concentração dos disselenetos. O Fe(II) causou um aumento significativo na formação de TBARS ($p < 0.05$) em homogeneizado de cérebro de rato. O disseleneto de difenila, utilizado como um controle positivo, diminuiu significativamente esse aumento nos níveis de MDA nas concentrações de 40 e 80 μM . O Composto **C** também mostrou uma redução nos níveis de MDA provocado pelo Fe(II) mas apenas foi significativo na concentração de 80 μM . Contudo, o disseleneto **D** não apresentou uma redução significativa na produção de TBARS em nenhuma das concentrações testadas (Figura 5) sugerindo que a inibição da lipoperoxidação pode ser mediada por um mecanismo não relacionado à atividade tipo tiol peroxidase. O composto **C** e o PhSeSePh, ambos na concentração de 80 μM , reduziram os níveis de TBARS abaixo do valor basal (controle).

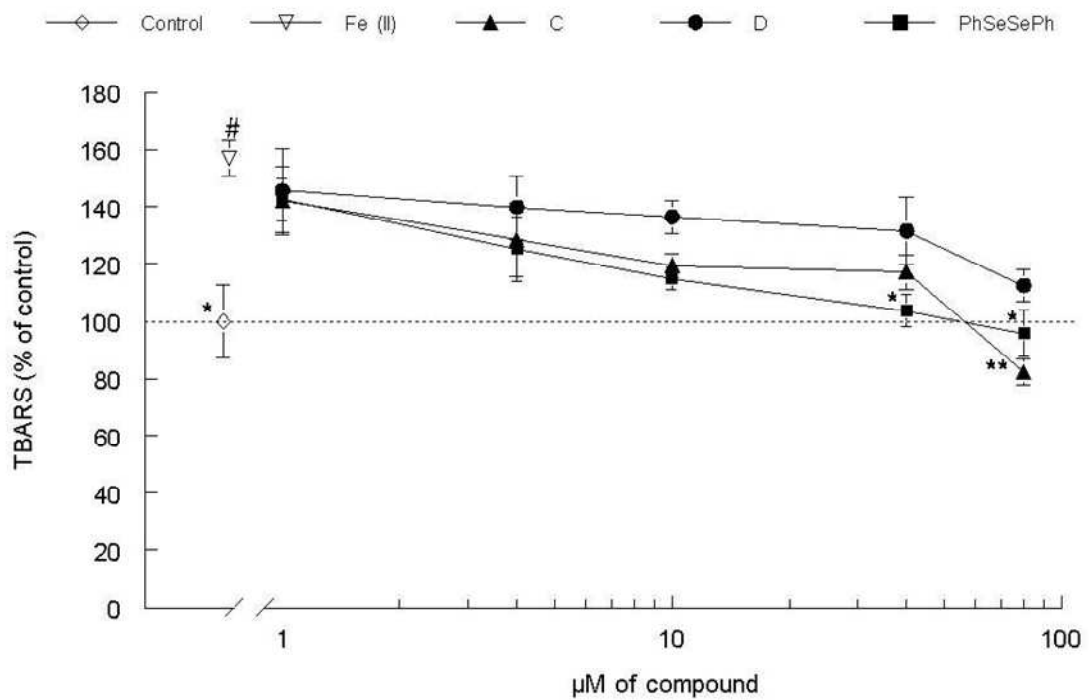


Figura 5. Efeito de diferentes concentrações dos disselenetos **C** , **D** e PhSeSePh na formação de TBARS induzida por Fe (II). Os valores expressos são a média \pm S.E.M de 3 a 4 experimentos independentes, feitos em duplicata ou triplicata. * ** Representam a diferença significativa em relação a indução na formação de TBARS provocada pelo Fe(II) quando comparada aquelas amostras induzidas pelo Fe(II) e tratada com os compostos. # Diferença significativa entre a indução na formação de TBARS provocada pelo Fe(II) e o valor basal.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos concluir que:

→ Tanto os compostos orgânicos de Se (disselenetos) quanto os de Te, testados neste estudo, foram capazes de reduzir H_2O_2 à água, promovendo *in vitro* a oxidação do PhSH a dissulfeto de difenila (PhSSPh), ou seja, atuam como miméticos da GPx;

→ (i) o tempo necessário que os compostos orgânicos de Te derivados de aminoácidos levam para reduzir a concentração de PhSH à metade (valores de T_{50}) são influenciados tanto pelo resíduo de aminoácido presente na estrutura desses compostos, como também pelo efeito estérico; (ii) os disselenetos testados também apresentaram capacidade de mimetizar a atividade da enzima GPx exibindo uma maior reatividade para aqueles contendo maior cadeia carbonada entre o resíduo de aminoácido e o átomo de Se como também, o resíduo de aminoácido que apresentou menor efeito estérico em relação a reatividade do átomo de Se; (iii) uma semelhança estrutural entre os compostos orgânicos de Se e Te derivados de aminoácidos com compostos naturalmente presentes no nosso organismo pode potencializar esse caráter mimético enzima GPx;

→ a reatividade com grupo tiol (GSH, captopril e DTT) apresentada pelos disselenetos utilizados nesse estudo, podem estar associado a um aumento na propriedade antioxidante GPx like desses compostos, já que a atividade GPx like de um composto de Se depende da reatividade do intermediário selenosulfeto com grupos tióis; porém, do ponto de vista da toxicologia potencial após exposição *in vivo* a estes compostos, uma oxidação acentuada de tióis (acompanhada ou não da degradação de peróxido) pode ser potencialmente tóxica para as células;

→ a atividade tipo tiol peroxidase dos disselenetos pode também ser atribuída à proteção contra a peroxidação lipídica induzida pelo Fe(II) *in vitro*; todavia, a inibição da lipoperoxidação pode ser mediada por um mecanismo não relacionado a atividade tiol peroxidase.

8. PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- Avaliar, de maneira comparativa, os compostos que exibiram maior atividade tipo tiol peroxidase, ou seja, o telureto **7g** e os disselenetos **C** e **D** utilizados nesse trabalho;
- avaliar o comportamento mimético dos compostos em meio aquoso, como também frente a diferentes peróxidos como o terbutilhidroperóxido (*t*-BuOOH) e o hidroperóxido de cumeno (CuOOH), tentando torná-los assim, com maior aplicabilidade farmacológica;
- avaliar a toxicidade e/ou farmacologia dos compostos orgânicos de Se e Te *in vivo* utilizando modelos experimentais como camundongos e/ou vermes (*C. elegans*);
- investigar se outras propriedades farmacológicas (anti-inflamatória, antinociceptiva), já descritas para os outros compostos orgânicos de Se, podem também serem aplicadas para esses teluretos e disselenetos com atividade GPx like.

9. REFERÊNCIAS

ALBERTO, E. E.; SOARES, L. C.; SUDATI, J. H.; BORGES, A. C. A.; ROCHA, J. B.T.; BRAGA A.L. Efficient Synthesis of Modular Amino Acid Derivatives Containing Selenium with Pronounced GPx Like Activity (**Eur. J. Org. Chem** ; submetido.).

ANDERSSON, C.M.; HALLBERG, A.; BRATTSAND, R.; COTGRAVE, I.A.; ENGMAN, L.; PERSSON, J. Glutathione peroxidase-like activity of diaryl tellurides. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 3: 2553–2558, 1993.

ANDERSSON, C.M.; BRATTSAND, R.; HALLBERG, A.; ENGMAN, L.; PERSSON, J.; MOLDEUS, P.; COTGREAVE, I. Diaryl tellurides as inhibitors of lipid peroxidation in biological and chemical systems. **Free Radic. Res.** 20:401-410, 1994.

AUMANN, K.D.; BEDORF, N.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; SCHOMBURG, D.; FLOHÉ, L. Glutathione peroxidase revisited: simulation of the catalytic cycle by computer-assisted molecular modelling. **Biomed. Environ. Sci.** 10: 136–155, 1997.

BARBOSA, N.B.V.; ROCHA, J.B.T.; ZENI, G.; EMANUELLI, T.; BEQUE, M.C.; BRAGA, A.L. Effect of organic forms of Selenium on delta-aminolevulinatase from liver, kidney and brain of adult rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 149:243-253, 1998.

BLAIS; F.X.; ONISCHUK, R.T.; DE MEIO, R.H. Hemolysis by tellurite: I: The tellurite test for Hemolysis. **J. AOA** 73, 1972.

BRAGA, A.L.; ALBERTO, E.E.; SOARES, L.C.; ROCHA, J.B.T.; SUDATI, J.H.; ROOS, D.H. Synthesis of telluroamino acid derivatives with remarkable GPx like activity. **Org. Biomol. Chem.** 7: 43–45, 2009.

BRAUGHLER, J.M.; DUNCAN, L.A.; CHASE, R.L. The involvement of iron in lipid peroxidation. Importance of ferric to ferrous ratios in initiation. **J. Biol. Chem.** 261: 10282-10289, 1986.

BRENNEISEN, P.; STEINBRENNER, H.; SIES, H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. **Mol. Aspects Med.** 26: 256-267, 2005.

BURGER, M.E.; FACHINETTO, R.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Ebselen attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat brain. **Pharm., Biochem. Beh.** 81:608 – 615, 2005.

CHAMBERS, I.; FRAMPTON, J.; GOLDFARB, P.; AFFARA, N.; MCBAIN, W.; HARRISON, P.R. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the “termination” codon, TGA. **EMBO. J.** 5:1221–27, 1986.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.** 59:527-605, 1979.

CHENG, W.H.; HO, Y.S.; ROSS, D.A.; VALENTINE, B.A.; COMBS, G.F.; LEI, X.G. Cellular glutathione peroxidase knockout mice express normal levels of selenium-

dependent plasma and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in various tissues. **J. Nutr.** 127:1445–50, 1997.

CHU, F.F.; DOROSHOW, J.H.; ESWORTHY, R.S. Expression, characterization and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. **J. Biol. Chem.** 268: 2571–2576, 1993.

DETTY, M.R.; GIBSON, S.L. Tellurapyrylium dyes as catalysts for oxidations with hydrogen peroxide and as scavengers of singlet oxygen. Dihydroxytelluranes as mild oxidizing agents. **Organom.** 11:2147-2156, 1992.

DUAN, Y.J.; KOMURA, S.; FISZER-SZAFARZ, B.; SZAFARZ, D.; YAGI, K. Purification and characterization of a novel monomeric glutathione peroxidase from rat liver. **J. Biol. Chem.** 263:19003–19008, 1988.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys.** 82:70–77, 1959.

ENGMAN, L.; HALLBERG, A. The strategy for preparing the mimic is improved. **J. Org. Chem.** 54:2964–2966, 1989.

ENGMAN, L.; STERN, D.; COTGREAVE, I.; ANDERSSON, C.M. Thiol peroxidase activity of diaryl ditellurides as determined by a ¹H NMR method. **J. Am. Chem. Soc.** 114:9737–9743, 1992.

ENGMAN, L.; STERN, D.; PELCMAN, M. Thiol peroxidase-activity of diorganyl tellurides. **J. Org. Chem.** 59:1973-1979, 1994.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A.; SCHOCK, H.H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. **FEBS Lett.** 32:132–34, 1973.

FRIDOVICH, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu. Rev. Biochem.** 64:97-112.

GROGAN, T.M.; FENOGLIO-PRIESER, C.; ZEHEB, R.; BELAMMY, W.; FRUTIGER Y.; VELA, E.; ESTERMEMAN, G.; MACDONALD, J.; RICHTER, L.; GALEGOS, A.; POWIS, G. Thioredoxin, a putative oncogene product, is overexpressed in gastric carcinoma and associated with increased proliferation and increased cell survival. **Human Pathol.** 31: 475-481, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Rad. Biol. Med.**, 2^a ed, New York: Clarendon Press., 1989.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem.** 59:1609–1623, 1992.

HALLIWELL, B.; CROSS, C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ. Health Perspect.** 102 (10):5-12, 1994.

HALLIWELL B., Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Transac.** 35 (5): 1147-1150, 2007.

HILLE, R.; NISHINO, T. Flavoprotein structure and mechanism. Part IV: xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. **FASEB**. 9:995-1003, 1995.

HOPKINS, F.G. On an Autoxidizable Constituent of the Cell. **Biochem. J.** 15(2):286-305, 1921.

IWAOKA, M.; TOMODA, T. A Model Study on the Effect of an Amino Group on the Antioxidant Activity of Glutathione Peroxidase. **J. Am. Chem. Soc.** 116:2557-256, 1994.

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

KRYUKOV, G.V.; CASTELLANO, S.; NOVOSELOV, S.V.; LOBANOV, A.V.; ZEHTAB, O. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science** 300:1439-43, 2003.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Prog. Lipid Res.** 46:244-282, 2007.

LUO, G.; ZHU, Z.; DING, L.; SUN, Q.; LIU, Z.; SHEN, J. Kinetic Studies of Abzyme with Glutathione Peroxidase Activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 198:1240-1247, 1994.

MACIEL, E.N.; BOLZAN, R.C.; BRAGA, A.L.; ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. **J. Biochem. Mol. Toxicol.** 14(6):310-9, 2000.

MEISTER, A.; TATE, S.S. Glutathione and Related γ -Glutamyl Compounds: Biosynthesis and Utilization. **Annu. Rev. Biochem.**, 45:559-604, 1976.

MEOTTI, F.C.; BORGES, V.C.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. **Toxicol. Lett.** 143:9-16, 2003.

MILLS, G.C. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. **J. Biol. Chem.** 229:189-97, 1957.

MINOTTI, G.; AUST, S.D. Redox cycling of iron and lipid peroxidation. **Lipids** 27: 219-226, 1992.

MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K.I.; MOHANA, H.; MUGESH, G. Horseradish peroxidase inhibition and antioxidant activity of ebselen and related organoselenium compounds. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 16:5334-5338, 2006.

MUGESH, G.; SINGH, H. Synthetic Organoselenium Compounds as Antioxidants: Glutathione Peroxidase Activity. **Chem. Soc. Rev.**, 29:347-357, 2000.

MUGESH, G.; DU MONT, W.W.; SIES, H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. **Chem. Rev.** 101: 2125-2179, 2001.

MÜLLER, A.; CADENAS, E.; GRAF, P.; SIES, H. A novel biologically active seleno-organic compound. I. Glutathione peroxidase- like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ51 (ebselen). **Biochem. Pharmacol.** 33: 3235-3239, 1984.

NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and Pharmacology. **Chem. Rev.** 104: 6255-6285, 2004.

OGAWA, A.; YOSHIMOTO, T.; KIKUCHI, H.; SANO, K.; SAITO, I.; YAMAGUCHI, T.; YASUHARA, H. Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. **Cerebrovasc. Dis.** 9:112, 1999.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.** 95:351– 358, 1979.

PUNTEL, R.L.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T. N-methyl-D-aspartate receptors are involved in the quinolinic acid, but not in the malonate pro-oxidative activity in vitro. **Neurochem. Res.** 30:417–424, 2005.

RADI, R.; CASTRO, L.; RODRIGUEZ, M.; CASSINA, A.; THOMSON, L. Free radical damage to mitochondria. In: Beal, M.F., Howell, N., Bodis-Wollner, I. (Eds.), *Mitochondria and Free Radicals in Neurodegenerative Diseases*. Wiley-Liss, New York, 57-89, 1997.

REICH, H.J.; JASPERSE, C.P. Organoselenium chemistry. Redox chemistry of selenocysteine model systems. **J. Am. Chem. Soc.** 109:5549–5555, 1987.

REN, X.; XUE, Y.; ZHANG, K.; LIU, J.; LUO, G.; ZHENG, J.; MU, Y.; SHEN, J. A novel dicyclodextrinyl ditelluride compound with antioxidant activity. **FEBS Letters** 507: 377-380, 2001.

RIDDLES, P.W.; BLAKELEY, R.L.; ZERNER, B. Ellman's reagent - 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid): A reexamination. **Anal. Biochem.** 94:75–81, 1979

ROTRUCK, J.T.; POPE, A.L.; GANTHER, H.E.; SWANSON, A.B.; HAFEMAN, D.G.; HOEKSTRA, W.G. **Science.** 179:588, 1973.

SAEZ, G.T.; BANNISTER, W.H.; BANNISTER, J.V. Free radicals and thiol compounds the role of glutathione against free radical toxicity. In: Vina, J. (Ed.), *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 237-254, 1990.

SAITO, I., ASANO, T., SANO, K., TAKAKURA, K., ABE, H., YOSHIMOTO, T., KIKUCHI, H., OHTA, T., ISHIBASHI, S. Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Neurosurgery** 42:269, 1998.

SAVEGNAGO, L.; BORGES, V.C.; ALVES, D.; JESSE, C.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W. Evaluation of antioxidant activity and potential toxicity of 1-buthyltelurenyl-2-methylthioheptene. **Life Sci.** 79:1546-1552, 2006.

SCANSETTI, G. Exposure to metals that have recently come into use. **Sci. Total Environ.** 120: 85-91, 1992.

SCHWARTZ, K.; FOLTZ, C.M. Selenium as a integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **J. Am. Chem. Soc.** 79:200-214, 1957.

SHIGEOKA, S.; ONISHI, T.; NAKANO, Y.; KITAOKA, S. Purification and properties of glutathione reductase in *Euglena gracilis* Z. **Biochem. J.** 242:511-515, 1987.

STEPHEN, R.; ZUCKER, P.A.; HUANG, R.R.C.; SPECTOR, A. Development of Synthetic Compounds with Glutathione Peroxidase Activity. **J. Am. Chem. Soc.** 111:5936-5939, 1989.

TAKAHASHI, K.T.; AVISSAR, N.; WITHIN, J.; COHEN, H. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoprotein distinct from the known cellular enzyme. **Arch. Biochem. Biophys.** 256:677-686, 1987.

TAYLOR, A. Biochemistry of tellurium. **Biol.Trace Elements.** 55: 231-239, 1996.

URSINI, F.; PAOLETTI, R. Oxidative Processes and Antioxidants, Raven Press, New York., 1994.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; BRIGELIUS-FLOHE, R.; AUMANN, K.D.; ROVERI, A.; SCHOMBURG, D.; FLOHÉ, L. The diversity of glutathione peroxidases. **Methods Enzymol.** 252:38-53, 1995.

WENDEL, A.; FAUSEL, M.; SAFAYHI, H.; TIEGS, G.; OTTER, R. A novel biologically active seleno-organic compound-II. Activity of PZ51 in relation to glutathione peroxidase. **Biochem. Pharmacol.** 33: 3241-3245, 1984.

WIRTH, T. Glutathione Peroxidase-like Activities of Oxygen-Containing Diselenides. **Molec.** 3:164-166, 1998.

XIE, J.J.; SONG, K.K.; QIU, L.; HE, Q.; HUANG, H.; CHEN, Q.X. Inhibitory effects of substrate analogues on enzyme activity and substrate specificities of mushroom tyrosinase. **Food Chem.** 103:1075-1079, 2006.

YAMAGUCHI, T., SANO, K., TAKAKURA, K., SAITO, I., SHINOHARA, Y., ASANO, T., YASUHARA, H. Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. Ebselen Study Group. **Stroke** 29:12, 1998.

YOU, Y.; AHSAN, K.; DETTY, M.R. Mechanistic Studies of the Tellurium(II)/Tellurium(IV) Redox Cycle in Thiol Peroxidase-like Reactions of Diorganotellurides in Methanol **J. Am. Chem. Soc.**, 125:4918-4927, 2003.

ZAHLER, W.L.; CLELAND, W.W. A specific and sensitive assay for disulfides. **J Biol Chem.** 243:716-719, 1968.

ANEXOS

Anexo A.

Artigo científico intitulado

“Synthesis of telluroamino acid derivatives with remarkable GPx like activity”

publicado na revista *Organic & Biomolecular Chemistry* (2009) 7:43–45.

Synthesis of telluroamino acid derivatives with remarkable GPx like activity†

Antonio L. Braga,* Eduardo E. Alberto, Letiére C. Soares, João B. T. Rocha, Jéssie H. Sudati and Daniel H. Roos

Received 28th August 2008, Accepted 3rd November 2008

First published as an Advance Article on the web 13th November 2008

DOI: 10.1039/b814990a

A series of modular telluroamino acid derivatives with remarkable GPx-like behavior was prepared in an efficient and short two-step synthesis.

Glutathione peroxidase enzymes (GPx) are excellent catalysts for antioxidant reactions. They protect our body against the potentially damaging effects of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide and some organic hydroperoxides, formed during aerobic metabolism. Several neurodegenerative diseases, including Alzheimer's and Parkinson's disease are linked to ROS activity.¹ Since the discovery that selenium plays a pivotal role in GPx enzymes, catalyzing the reduction of hydroperoxides at the expense of glutathione (GSH),² synthetic developments and design of new chalcogen-based catalytic antioxidants have attracted considerable attention.³ Synthetic organoselenium and organotellurium compounds have emerged as excellent candidates to act as GPx mimics, due their well-known ability to undergo two-electron redox cycle between chalcogen (II) and (IV) species.⁴

The cyclic selenenamide ebselen **1** (Fig. 1), was the first synthetic compound suggested for hydrogen peroxide inactivating therapy in the presence of glutathione.⁵

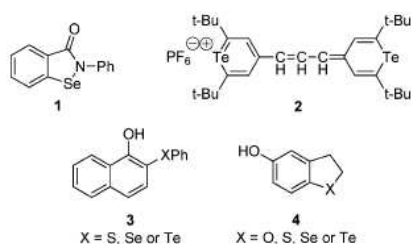


Fig. 1 Representative examples of GPx mimics.

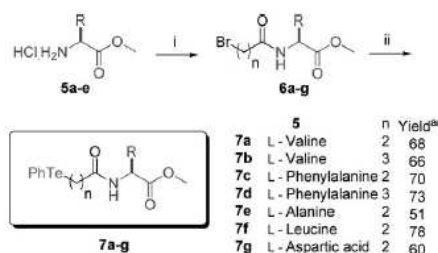
Based on the recognized GPx like activity of ebselen, several papers have appeared describing simple synthetic organoselenium compounds with this property (e.g., benzoselenazinones,⁶ benzoselenazolinones,⁷ camphor-derived selenenamide,⁸ diaryl diselenides⁹ and dendrimers with a diselenide core¹⁰).

On the other hand, the first organotellurium compound **2**, described as a GPx mimic, was reported by Detty.¹¹ After that, a series of diaryl ditellurides¹² and diaryl tellurides¹³ have been reported. Engman and collaborators have developed the synthesis

and studied the antioxidant properties of compounds **3**¹⁴ and **4**.¹⁵ A noteworthy characteristic of these compounds is the much improved antioxidant activity of tellurides, when compared with their selenium and sulfur analogues.

Amino groups that are capable of interacting with selenium, through Se–N nonbonded interactions, are known to play a significant role in modulating the redox properties of seleno-based antioxidants.¹⁶ However, to the best of our knowledge, there are just a few reports concerning the synthesis and GPx like evaluations of amino acid derivatives containing selenium¹⁷ and none about tellurium. As part of our growing interest in amino acid derivatives containing chalcogen,^{3,18} we report herein the synthesis of novel telluroamino acid derivatives, easily obtained in a simple, modular and efficient two-step synthesis. We envisioned that this modular characteristic would allow us to investigate the structure–activity relationship of these compounds. Their GPx like activity was evaluated, and we promoted the variation of amino acid residues, the chain length between the chalcogen atom and the amino acid moiety in order to find a more efficient catalyst.

GPx mimics **7a–g** were prepared in two steps, in 51–78 overall yield, from readily available L-aminoesters and the appropriate bromo-carboxylic acid, as shown in Scheme 1.



^a Overall yields.

Scheme 1 Synthetic strategy to prepare compounds **7a–g**. Reagents: i) bromo-carboxylic acid, NMM, ethyl chloroformate, CHCl₃; ii) PhTe₂, NaBH₄, THF, EtOH.

The catalytic activity of tellurides **7a–g**, as a GPx model enzyme, was evaluated according to the Tomoda method¹⁵ using benzenethiol as a glutathione alternative. The reduction of H₂O₂ was monitored through the UV absorption increase at 305 nm, due to diphenyl disulfide formation.

Our prime concern in the evaluation of these compounds as GPx mimics was the influence of the chain length between the tellurium atom and amino acid moiety. It should be noted that compounds **7a** (n = 2) and **7b** (n = 3) derived from L-Valine

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97.105-900, Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: albraga@quimica.ufsm.br

† Electronic supplementary information (ESI) available: General procedures, ¹H and ¹³C NMR spectra of selected compounds. See DOI: 10.1039/b814990a

showed the same activity. Linear increases in absorbance (Fig. 2) were observed by mixing MeOH, catalyst **7a-d** (2.6 mol%), PhSH and H₂O₂. Taking advantage of the modular characteristic of our synthetic route, we explored the influence of the aminoacid residue in the reduction of hydrogen peroxide in the presence of an excess of thiol. Compounds **7c** (*n* = 2) and **7d** (*n* = 3) derived from L-Phenylalanine were tested in the same conditions. Compound **7c**, with a shorter chain length, showed the same catalytic activity that compounds **7a** and **7b**. However, **7d** was less effective in the reduction of hydrogen peroxide.

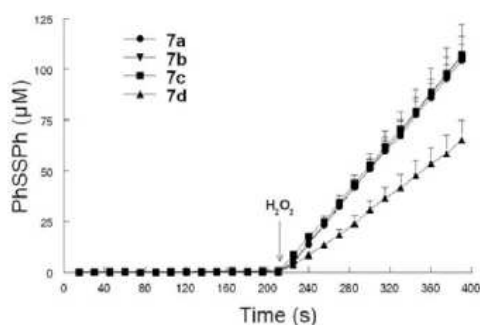


Fig. 2 GPx like behavior of compounds **7a-d**.

The time required to reduce the thiol concentration to a half (T_{50}) is shown in Table 1. Compounds **7a** (*n* = 2) and **7b** (*n* = 3), derived from L-valine and **7c** (*n* = 2) from L-phenylalanine showed almost the same T_{50} , near to 13 min (Entries 1–3). For compound **7d** (*n* = 3) derived from L-phenylalanine it was 21.61 min (Entry 4).

On the basis of these initial observations, we used telluroaminoacids with *n* = 2 as standard catalysts, and promoted the variation of amino acid moiety to enhance their ability to mimic the glutathione peroxidase enzyme. L-Alanine **7e** (Entry 5) and L-leucine **7f** (Entry 6) derivatives showed T_{50} of 10.41 and 12.75 min, respectively, and to our delight we found that telluride

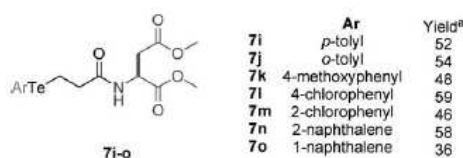
Table 1

Entry ^a	Catalyst ^b	Y	<i>n</i>	R	T_{50} ^{c,d}
1	7a	Te	2	<i>i</i> -Pr	13.43 (±0.15)
2	7b	Te	3	<i>i</i> -Pr	13.14 (±0.27)
3	7c	Te	2	Bn	13.43 (±0.31)
4	7d	Te	3	Bn	21.61 (±1.10)
5	7e	Te	2	Me	10.41 (±0.52)
6	7f	Te	2	<i>i</i> -Bu	12.75 (±1.03)
7	7g	Te	2	CH ₂ COOMe	8.15 (±0.61)
8	7h	Se	2	<i>i</i> -Pr	1543 (±1.82)

^a Under this condition addition of H₂O₂ in the absence of telluride did not produce any significant oxidation of PhSH. ^b MeOH (1 mL); catalyst [0.05 mmol L⁻¹]; PhSH [1.9 mmol L⁻¹]; H₂O₂ [8.8 mmol L⁻¹]. ^c T_{50} is the time required, in min, to reduce the thiol concentration with 50% after the addition of H₂O₂. ^d Data in parentheses: experimental error.

7g derived from L-aspartic acid (Entry 7) was the best catalyst, promoting the reduction of H₂O₂ concentration to a half in 8.15 min. On the other hand, a seleno derivative **7h** (Entry 8) was not able to promote the reduction of H₂O₂ in an appreciable rate (T_{50} = 1543 min). Diphenyl ditelluride was also employed as reducing agent, and it was found that it is less effective than compounds **7a-g**, (T_{50} = 16.73 (±0.26) min). We also investigated if the tellurium moiety remains intact after reaction with H₂O₂. To address this issue we performed a GC analysis of telluride **7g**, and another one with the reaction of GPx using **7g** as catalyst (see supporting information). To our delight, compound **7g** was also present after its application in the standard reaction. Apart from the main product, diphenyldisulfide, some minor side products are formed which may originate in some decomposition of the catalyst or of other components involved.

Encouraged by these results, we next explored the effects of substituents in the aryl group attached to tellurium in **7g** derivatives. A new series of telluroaminoacids were prepared with electron donating **7i-k**, electron withdrawing **7l** and **7m**, as well as with steric hindrance substituents **7n** and **7o** (Fig. 3).



^a Overall yields.

Fig. 3

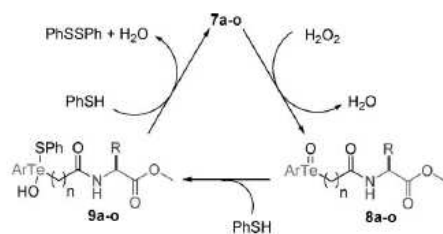
A new set of experiments to screen the GPx activity of these new catalysts was performed with **7i-o** (2 mol%), in a more concentrated solution (Table 2). It was found that the GPx behavior is strongly influenced by steric effects. The T_{50} of *para* substituted compounds were lower when compared with the *ortho* analogues (Entries 2 and 3, 5 and 6). The changing of electronic environment at the tellurium atom did not produce a pronounced change to the thiol peroxidase activity of these compounds. The T_{50} of **7g** (Ar = Ph, Entry 1), **7i** (Ar = *p*-tolyl, Entry 2), **7k** (Ar = 4-MeOC₆H₄, Entry 4), and **7l** (Ar = 4-ClC₆H₄, Entry 5) was between 2.11 and 2.98 min.

Table 2

Entry ^a	Catalyst ^b	Ar	T_{50} ^{c,d}
1	7g	phenyl	2.98 (±0.21)
2	7i	<i>p</i> -tolyl	2.78 (±0.20)
3	7j	<i>o</i> -tolyl	4.78 (±0.12)
4	7k	4-methoxyphenyl	2.11 (±0.24)
5	7l	4-chlorophenyl	2.94 (±0.19)
6	7m	2-chlorophenyl	8.14 (±1.52)
7	7n	2-naphthalene	3.65 (±0.18)
8	7o	1-naphthalene	4.27 (±0.32)

^a Under this condition addition of H₂O₂ in the absence of telluride did not produce any significant oxidation of PhSH. ^b MeOH (1 mL); catalyst [0.1 mmol L⁻¹]; PhSH [5 mmol L⁻¹]; H₂O₂ [5 mmol L⁻¹]. ^c T_{50} is the time required, in min, to reduce the thiol concentration with 50% after the addition of H₂O₂. ^d Data in parentheses: experimental error.

Concerning mechanistic aspects, and in agreement with Detty's study,¹⁹ we believe that initially Te(II) compounds **7a-o** react with H₂O₂ to form the Te(IV) oxides **8a-o**, and H₂O (Scheme 2). Addition of one equivalent of PhSH to these compounds generate tellurenyl sulfides **9a-o** which react with another equivalent of PhSH to regenerate **7a-o** to the catalytic cycle and produce PhSSPh and H₂O.



Scheme 2

In conclusion, we have prepared a series of telluroamino acid derivatives, in a short, modular and efficient synthetic route. These compounds were tested as GPx mimics, catalyzing the reduction of H₂O₂ to water at expense of thiophenol using a very low amount of catalyst. We found that the time required to reduce the concentration of the PhSH to a half, *T*₅₀, is strongly influenced by the aminoacid residue, as well as by steric effects. New studies to investigate the influence of amino acid residues of telluroamino acid derivatives have been performed in our lab using glutathione as reducing agent.

Acknowledgements

The authors thank CNPq, CAPES, and FAPERGS for financial support.

Notes and references

- 1 *Free Radicals in Biology*, ed. L. Flohe and W. A. Pryor, Academic Press, New York, 1982.
- 2 (a) J. T. Rotruck, A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D. G. Hafeman, W. G. Hoekstra, *Science* 1973, 179, 588; (b) L. Flohé, E. A. Günzler and H. H. Schock, *FEBS Lett.*, 1973, 32, 132; (c) *Selenium*

in Biology and Human Health, ed. R. F. Burk, Springer-Verlag, New York, 1994.

- 3 (a) G. Mugesh and H. Singh, *Chem. Soc. Rev.*, 2000, 29, 347; (b) G. Mugesh, W. W. -du Mont and H. Sies, *Chem. Rev.*, 2001, 101, 2125; (c) C. W. Nogueira, G. Zeni and J. B. T. Rocha, *Chem. Rev.*, 2004, 104, 6255; (d) B. K. Sarma and G. Mugesh, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, 6, 965.
- 4 (a) H. J. Reich, *Acc. Chem. Res.*, 1979, 12, 22; (b) K. B. Sharpless, K. M. Gordon, R. F. Lauer, D. W. Patrick, S. P. Singer and M. W. Young, *Chem. Scr.*, 1975, 8A, 9; (c) M. R. Detty, *Organometallics*, 1991, 10, 702; (d) M. R. Detty, P. B. Merkel and S. K. Powers, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 5920.
- 5 (a) A. Müller, E. Cadenas, P. Graf and H. Sies, *Biochem. Pharmacol.*, 1984, 33, 3235; (b) A. Wendel, M. Fausel, H. Safayhi, G. Tieg and R. Otter, *Biochem. Pharmacol.*, 1984, 33, 3241; (c) M. J. Parnham and S. Kindt, *Biochem. Pharmacol.*, 1984, 33, 3247.
- 6 P. V. Jacquemin, L. E. Christiaens and M. J. Renson, *Tetrahedron Lett.*, 1992, 33, 3663.
- 7 V. Galet, J. L. Bernier, J. P. Hénichart, D. Lesieur, C. Abadie, L. Rochette, A. Lindenbaum, J. Chalas, J. F. R. de la Faverie, B. Pfeiffer and P. Renard, *J. Med. Chem.*, 1994, 37, 2903.
- 8 T. G. Back and B. P. Dick, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, 2079.
- 9 (a) S. R. Wilson, P. A. Zucker, R. C. Huang and A. Spector, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 5936; (b) T. Wirth, *Molecules*, 1998, 3, 164; (c) G. Mugesh, A. Panda, H. B. Singh, N. S. Puneekar and R. Butcher, *J. Chem. Commun.*, 1998, 2227; (d) G. Mugesh, A. Panda, H. B. Singh, N. S. Puneekar and R. J. Butcher, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 839.
- 10 X. Zhang, H. Xu, Z. Dong, Y. Wang, J. Liu and J. Shen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 124, 10556.
- 11 M. R. Detty and S. L. Gibson, *Organometallics*, 1992, 11, 2147.
- 12 L. Engman, D. Stern, I. A. Cotgreave and C. M. Andersson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 9737.
- 13 (a) L. Engman, D. Stern, M. Pelcman and C. M. Andersson, *J. Org. Chem.*, 1994, 59, 1973; (b) K. Vessman, K. Ekström, M. Berglund, C. M. Andersson and L. Engman, *J. Org. Chem.*, 1995, 60, 4461.
- 14 L. Engman, D. Stern, H. Frisell, K. Vessman, M. Berglund, B. Ek and C. M. Andersson, *Bioorg. Med. Chem.*, 1995, 3, 1255.
- 15 (a) L. Engman, M. Laws, J. Malmström, C. H. Schiesser and L. M. Zugaro, *J. Org. Chem.*, 1999, 64, 6764; (b) J. Malmström, M. Jonsson, I. A. Cotgreave, L. Hammarström, M. Sjödin and L. Engman, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 3434.
- 16 M. Iwaoka and S. Tomoda, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 2557.
- 17 (a) P. P. Phadnis and G. Mugesh, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, 3, 2476; (b) K. P. Bhabak and G. Mugesh, *Chem. Eur. J.*, 2007, 13, 4594.
- 18 (a) A. L. Braga, J. A. Sehnem, F. Vargas and R. C. Braga, *J. Org. Chem.*, 2005, 70, 9021; (b) A. L. Braga, D. S. Lüdtkke, M. W. Paixão, E. E. Alberto, H. A. Stefani and L. Juliano, *Eur. J. Org. Chem.*, 2005, 4260; (c) A. L. Braga, L. Wessjohann, M. W. Paixão, O. E. D. Rodrigues, A. Schneider and H. R. Appelt, *Tetrahedron Lett.*, 2006, 47, 1019; (d) A. L. Braga, D. P. Bottega, M. W. Paixão, A. M. Deobald, C. Peppe and P. H. Schneider, *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 4305.
- 19 Y. You, K. Ahsan and M. R. Detty, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 4918.

Anexo B.

Manuscrito (em preparação) intitulado
“New Diselenoamino Acid Derivatives With GPx Mimic Properties ” a ser submetido.

New Diselenoamino Acid Derivatives With GPx Mimic Properties

Jéssie Haigert Sudati^a, Eduardo Eliezer Alberto^a, Letiére Cabreira Soares^a, Roselei Fachinetto^a, Antonio Luiz Braga Braga^a, João Batista Teixeira da Rocha^{a*}.

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Campus Universitário – Camobi, 97105-900 Santa Maria RS, Brazil

**Corresponding author:
Dr. João Batista Teixeira Rocha
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Bioquímica Toxicológica
97105-900, Santa Maria, RS, Brazil
Tel: 21-55-220-8140
Fax: 21-55-220-8978*

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) primarily arise from products of normal metabolic activities and are thought to be the etiology of many diseases. The synthesis of compounds which can mimic the properties of the selenoenzyme glutathione peroxidase (GPx), a selenium-containing antioxidant enzyme that normally removes ROS, has inspired great interest. In this study, a variety of diselenides derivated from phenylalanine and valine was synthesized to be a functional mimic of the GPx, kinetic analyses according to the model reaction ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{PhSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{PhSSPh}$) have been performed. Thus, diselenides **C** and **D** showed highest GPx mimic properties when compared with **A** and **B** it seemed that catalytic activity of diselenides GPx models depends on the steric effects; influenced by the number of carbon between the selenium atom and aminoacid residue and/or influenced by the aminoacid residue.

Key words: Organoselenium, GPx mimic, thiol oxidation

1. INTRODUCTION

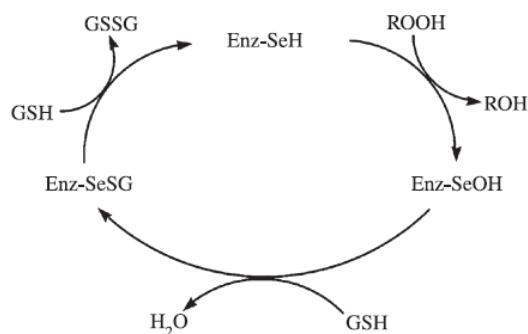
Glutathione peroxidase (GPx) is an essential selenium-containing antioxidant enzyme composed of four identical subunits, and each subunit contains one selenocysteine residue (FLOHÉ, 1982; URSINI *et al.*, 1995; LUO *et al.*, 2000) which undergoes redox cycle shown in Scheme 1. GPx protects various living organisms from aerobic oxidative stresses in the presence of glutathione (GSH) by catalyzing the reduction of the metabolites of superoxide anion, some kinds of hydroperoxides such as H₂O₂, t-butyl hydroperoxide and lipid hydroperoxides, according to the reaction: $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$ (equation 1) (TOMODA *et al.*, 1994).

Because GPx has some shortcomings such as instability, limited cellular accessibility, poor availability, short half-lives and high molecular weight, which have limited its therapeutic use (ENGMAN *et al.*, 1989; LIU *et al.*, 1994) considerable efforts have been made to find compounds that could mimic the properties of the GPx.

Since the discovery of selenium functions in a biological enzyme system, much attention has been devoted to elucidate the importance of selenium in selenoenzymes. A report described that an improved GPx like activity of diselenide compounds (R-Se-Se-R) resulted from intramolecular interactions of the selenium atom with the nitrogen atom that stabilizes the reaction intermediates (WILSON *et al.*, 1989).

Ebselen was the first compound suggested for hydroperoxide-inactivating therapy in the presence of GSH (MÜLLER *et al.*, 1984; WENDEL *et al.*, 1984; MISHRA *et al.*, 2006), but it has some drawbacks, such as low GPx activity and water insolubility. Therefore, the reaction catalyzed by organoselenium compounds is similar to that catalyzed by GPx. According to this, synthetic organoselenium (REICH, 1979; DETTY, 1988; DETTY, 1991) and organotellurium (ENGMAN *et al.*, 1994; REN *et al.*, 2001; BRAGA *et al.*, 2009) compounds have emerged as excellent candidates to act as GPx mimics due the presence of selenol group or their well-known ability to undergo two- electron redox cycle between chalcogen (II) and (IV) species, respectively.

In this paper, four new diselenoamino acids compounds (Fig. 1) were used in order to investigate their GPx like antioxidant activity, catalytic properties, reactivity with thiol groups and their effect against lipid peroxidation.



Scheme 1. The proposed catalytic cycle of GPx for reduction of hydroperoxide by GSH.

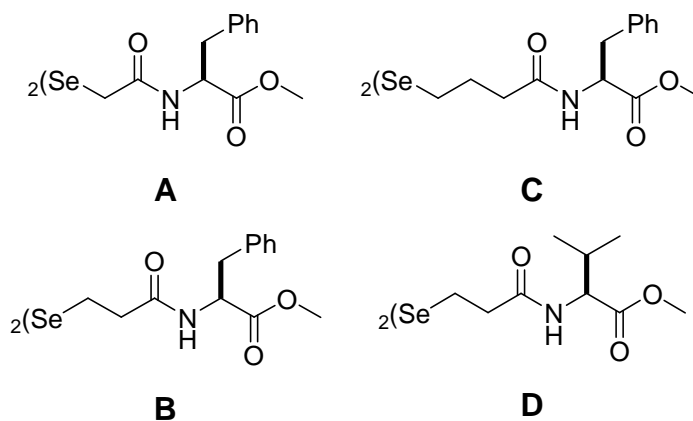


Figure 1. Structure of diselenides amino acid derivatives. *L*-phenylalanine (**A-C**) and *L*-valine (**D**) derivative (ALBERTO *et al*, submitted).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

Tris-HCl, thiobarbituric acid (TBA), malonaldehyde bis-(dimethyl acetal; MDA) were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). Ferrous sulphate, chloridric acid and acetic acid were obtained from Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.2 Determination of GPx like activity and kinetic analysis

Catalytic GPx model reaction ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{PhSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{PhSSPh}$) (Tomoda's method) was initiated by the addition of an amount of H_2O_2 (to a final concentration of 5, 10, 15 and 30 mM) to a methanol solution of PhSH (to a final concentration of 0.495, 0.95, 1.18, 1.45 and, 1.9 mM) containing the catalyst at different concentrations (0.005, 0.01 and 0.025 mM) at 30°C and was monitored by UV spectroscopy at 305 nm, (6 min), at least more than three times under the same conditions. Kinetic data were analyzed by Lineweaver-Burk plots and fit to Eq. [1], where V_{max} is the maximal velocity, and K_m is the Michaelis constants for H_2O_2 ($K_{m\text{H}_2\text{O}_2}$) and PSH ($K_{m\text{PhSH}}$).

2.3 Measurement of thiol content

Thiol oxidase activity was determined according to the Ellman's method (ELLMAN, 1959; RIDDLES *et al.*, 1979). Diselenoamino acids compounds (100 μM) were dissolved in MeOH and they were incubated (37°C) separately in a medium reaction containing 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4) and respectively sulphhydryl compound tested, in this case, GSH (1 mM), captopril (1 mM) or dithiothreitol (DTT) (0,5 mM) in a final volume of 1800 μL . An aliquot (100 μL) from each sample was removed at different times during the reaction (0, 30, 60 and 120 min) and mixed in a system containing 25 μL de 10 mM of 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and 100 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4) (in a final volume of 1800 μL). Samples were read at 412 nm. Each thiol compound (GSH, Captopril or DTT) was used as the standard.

2.4 Animals

Male Wistar rats (\pm 3 months old), weighing between 270-320 g, from our own breeding colony (Animal House-holding, UFSM, Brazil) were kept in cages with free access to foods and water in a room with controlled temperature ($22^\circ\text{C}\pm 3$) and in 12-h light/ dark cycle with lights on at 7:00 am. The animals were maintained and used in accordance to the guidelines of the Brazilian Association for Laboratory Animal Science (COBEA).

2.5 Preparation of brain homogenates

On the day of the experiments the rats were sacrificed by decapitation and the encephalic tissue (whole brain) was rapidly dissected, placed on ice and weighed. Tissues were immediately homogenized in cold 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 (1/10, w/v). The homogenate was centrifuged for 10 min at 4000 x g to yield a pellet that was discarded and a low-speed supernatant (S1) that was used in the experiments.

2.6 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

TBARS production was determined as described by Ohkawa and Punzel (OHKAWA *et al.*, 1979; PUNTEL *et al.*, 2005). Aliquots of the homogenate (200 μ l) from tissues were incubated at 37°C in a water bath in the presence of different concentrations of diselenides compounds (0–80 μ g/mL) and with the respective pro-oxidant agent Fe(II) (10 μ M). Color reaction was developed by adding 200 μ l 8.1% SDS (sodium dodecyl sulfate) to the reaction mixture containing S1 from rat brain. This was subsequently followed by the addition of 500 μ l of acetic acid/HCl (pH 3.4) mixture and 500 μ l 0.6% thiobarbituric acid (TBA). This mixture was incubated at 100°C for 1 h. TBARS produced were measured at 532 nm and the absorbance was compared with the standard curve using malondialdehyde (MDA).

2.7 Statistical analyses

Values were expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis were performed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range tests when appropriated. The results were considered statistically significant for $P < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Determination of T_{50} values for diphenyl diselenide and its derivatives

Taking advantage of the modular characteristic of our catalysts, we evaluated the influence of the chain length between the diselenide moiety and amino acid residue in the reduction of hydrogen peroxide. Compounds **B**, **C** and **D** showed better results than PhSeSePh. Diselenide **D**, derived from L-valine, showed the best GPx like activity ($T_{50} = 42.18$ min) followed by compounds **C** and **B** derived from L-Phenylalanine with longer chain length ($T_{50} = 45.15$ min and 51.38 min, respectively), Table 1. Compound **A**, with a shorter chain length, was the less effective catalyst in this screening ($T_{50} = 93.03$ min).

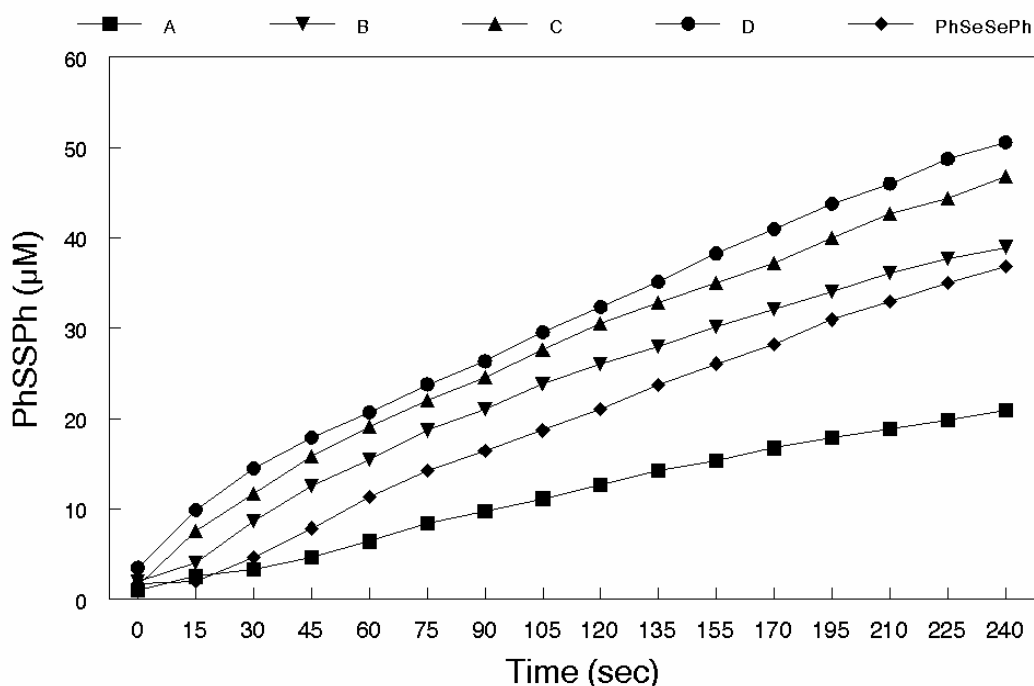


Figure 2. GPx like behavior of catalysts **A-D** and PhSeSePh.

Table 1. T_{50} values of catalysts **A-D** and PhSeSePh.

Catalyst ^{a,b}	T_{50} (min) ^c
A	93.03 (\pm 5.77) ^d
B	51.38 (\pm 2.45)
C	45.15 (\pm 3.17)
D	42.18 (\pm 2.75)
PhSeSePh	51.80 (\pm 2.83)

^a Under this condition addition of H_2O_2 in the absence of catalyst did not produce any significant oxidation of PhSH. ^b MeOH (1 mL); catalyst (0.025 mM); PhSH (1.9 mM); H_2O_2 (5 mM). ^c T_{50} is the time required, in minutes, to reduce the thiol concentration with 50% after the addition of H_2O_2 ; ^d Data in parentheses: experimental error (SEM).

3.2 Determination of kinetic parameters for the reduction of H_2O_2 by different concentrations of PhSH (0.495 – 1.9 mM) catalyzed by diselenides

Under the conditions employed in the present study, the enzymatic reaction follows Michaelis–Menten kinetics. Kinetic parameters of the enzyme for different catalysts (**B**, **C** and **D**) were determined by Lineweaver–Burk plots as shown in Figure 3. Results showed that compounds **C** and **D** caused an increase in the V_{max} in comparison with the PhSeSePh, the maximum values were obtained by compounds **C** and **D**. Results are summarized in Table 2.

In order to compare the catalytic cycle of the model system with that of actual GPx, according to the equation of the model reaction (eq 1) was determined varying the PhSH concentration.

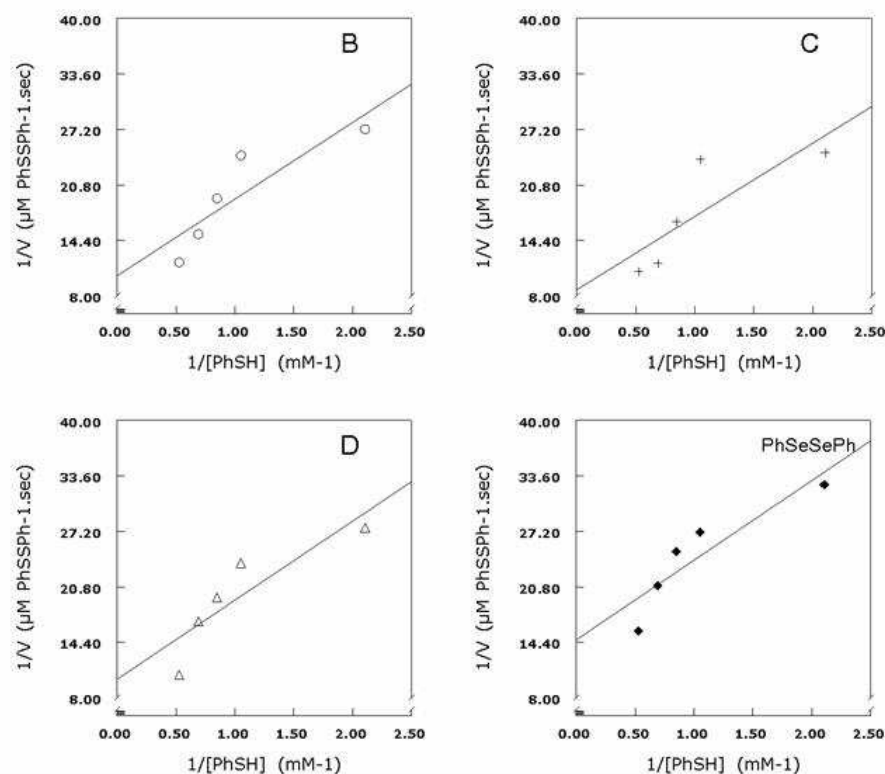


Figure 3. Lineweaver-burk plot ($1/v$ vs $1/[\text{PhSH}]$ plot) for different compounds (**B**, **C**, **D** and PhSeSePh). Concentration of H_2O_2 was fixed to 5 mM and the calysts were fixed to 100 μM .

Table 2. Kinetics parameters for different diselenides-catalyzed reduction of H_2O_2 by PhSH tested. Concentration of H_2O_2 was fixed to 5 mM and the calysts were fixed to 100 μM .

Compound	$K_m_{\text{PhSH}}(\mu\text{M})$	$V_{max}(\mu\text{M s}^{-1})$	$V_{max}/K_m(\text{s}^{-1})$
B	0.950	0.081	0.085
C	0.862	0.097	0.112
D	0.896	0.098	0.109
PhSeSePh	0.856	0.087	0.101

3.3 Determination of kinetic parameters for the reduction of different concentrations of H_2O_2 (5 – 30 mM) by PhSH catalyzed by diselenides

Thus, owing to the lower activity of compound **B** (V_{max_B} 0.081) compared with PhSeSePh showed in Table 2, authors decided to investigate diselenides **C** and **D** throughout Lineweaver-Burk plot, changing the H_2O_2 concentrations (Fig. 4). Indeed, catalysts showed a dependence of concentration to reach a higher affinity to

substrate. Both, compound **C** and **D** showed ability to increase V_{max} . The values of V_{max}/K_m , which denotes the affinity of the enzyme to the substrate (Xie *et al.*, 2007) were determined and compared, and the results showed that the affinity of these catalysts to the hydroperoxide depends on increasing catalysts concentration. Results are summarized in Table 3.

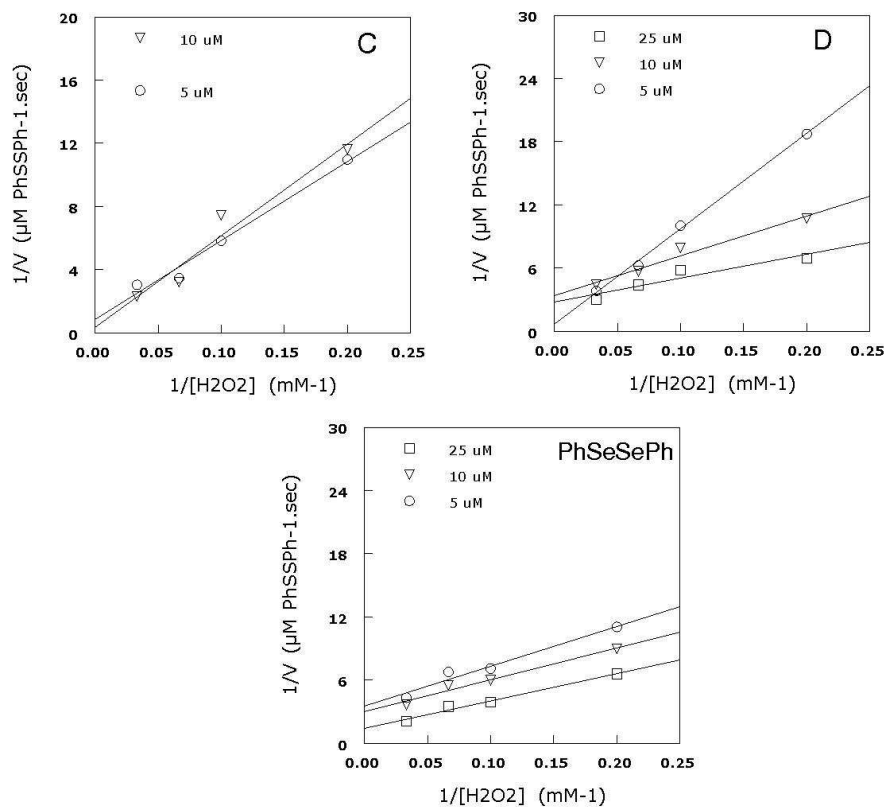


Figure 4. Lineweaver-burk plot ($1/v$ vs $1/[H_2O_2]$ plot) for compound **C**, **D** and PhSeSePh. Concentration of PhSH was fixed to 1.9 mM and the catalysts were tested at 5 μM, 10 μM and 25 μM

Tabela 3. Kinetics parameters for compounds **C**, **D** and PhSeSePh. Concentration of PhSH was fixed to 1.9 mM and the catalysts were tested at 5 μM , 10 μM and 25 μM .

Compound		$K_m \text{H}_2\text{O}_2(\mu\text{M})$	$V_{max} (\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1})$	$V_{max}/K_m (\text{s}^{-1})$
C	5 μM	60.79	1.21	0.020
	10 μM	20.12	0.546	0.027
D	5 μM	26.8	0.460	0.017
	10 μM	11.13	0.294	0.026
	25 μM	8.05	0.358	0.044
PhSeSePh	5 μM	10.80	0.284	0.026
	10 μM	10.07	0.334	0.033
	25 μM	18.48	0.711	0.038

3.4 Interaction of diselenides with sulfhydryls.

The interaction of diselenides with the thiol groups of GSH, captopril and DTT was examined. Since the GPx activity of selenium/tellurium compounds also depends on the reactivity of these compounds with thiols in addition to their reactions with peroxides, it has been shown that the GPx activity of selenium compounds not only depends on the reactivity of the selenol intermediates towards hydrogen peroxide, but also depends on the reactivity of the selenenyl sulfide intermediates towards thiols (MISHRA *et al.*, 2006). Thus, in this case, it is possible suggest that highest reactivity with thiol groups could be associated with increasing GPx like activity, because simple organoselenium compounds can accelerate the rate of thiol oxidation even in the absence of peroxide (WIRTH, 1998; NOGUEIRA *et al.*, 2004;). For this reason, it was quantified the behavior of diselenides in thiol oxidation. Thiol groups of DTT were more susceptible to oxidation by catalysts than monothiols. In fact, this high reactivity of DTT (Table 6) could be explained by the presence of a vicinal dithiol in its structure that gives it a markedly different reactivity than monothiols like GSH and captopril (Table 4 and 5, respectively). Compounds **C** and **D** showed more potent effect in oxidize thiol groups for both monothiols (GSH and Captopril) and dithiol (DTT) (Table 6) tested. The maximum thiol consumption for diselenides **C** and **D** occurred in the presence of DTT, the SH groups consumed of DTT (120 min) compared with initial time reaction (0 min) for compound **C** and **D** were 35.55 % and

65.6%, respectively (Table 6). Compound **A** and **B** also showed ability to consume SH groups but these compounds were not so pronounced as **C** and **D**.

Table 4. Effect of different diselenide compounds on the Ellman's reaction (1959) using glutathione (1 mM) as a thiol group. Values (expressed as μM) are the mean \pm S.E.M from 3 to 4 independent experiments performed in duplicate or triplicate.

GSH					SH group
	0'	30'	60'	120'	consumed (%)
blank	90.75 \pm 6.4	94.33 \pm 5.8	93.75 \pm 11.2	88.53 \pm 10.6	2.44
control	92.75 \pm 4.7	90.05 \pm 8.0	89.25 \pm 7.3	87.02 \pm 9.2	6.17
<i>Compound</i>					
A	92.49 \pm 4.6	86.95 \pm 4.1	81.36 \pm 9.5	75.98 \pm 12.3	17.86
B	90.62 \pm 11.8	85.63 \pm 9.8	81.54 \pm 9.9	74.23 \pm 8.8	18.08
C	86.2 \pm 4.8	74.17 \pm 7.2	69.25 \pm 4.6	64.59 \pm 5.9	25.06
D	85.2 \pm 9.8	81.14 \pm 5.9	67.75 \pm 11.3	55.61 \pm 6.3	34.73

Table 5. Effect of different diselenide compounds on the Ellman's reaction (1959) using captopril (1 mM) as a thiol group. Values (expressed as μM) are the mean \pm S.E.M from 3 to 4 independent experiments performed in duplicate or triplicate.

Captopril					SH group
	0'	30'	60'	120'	consumed (%)
blank	90.25 \pm 15.29	89.5 \pm 9.6	85.69 \pm 16.1	82.94 \pm 4.46	8.09
control	93.2 \pm 14.22	87.56 \pm 14.4	84.37 \pm 14.7	82.15 \pm 6.79	11.85
<i>Compound</i>					
A	89.3 \pm 10.4	84.69 \pm 10.3	78.1 \pm 12.6	72.7 \pm 4.4	18.5
B	89.11 \pm 9.6	82.09 \pm 9.5	76.71 \pm 9.5	69.84 \pm 5.3	21.6
C	87.04 \pm 13.3	80.31 \pm 7.4	71.43 \pm 7	62.04 \pm 9.1	28.6
D	93.04 \pm 12.2	77.13 \pm 11.8	66.64 \pm 10.4	57.29 \pm 4.3	38.4

Table 6. Effect of different diselenide compounds on the Ellman`s reaction (1959) using DTT (0.5 mM) as a thiol group. Values (expressed as μM) are the mean \pm S.E.M from 3 to 4 independent experiments performed in duplicate or triplicate.

DTT					SH group
	0`	30`	60`	120`	consumed (%)
<i>blank</i>	92.01 \pm 11.3	85.69 \pm 11.6	82.56 \pm 3.4	79.97 \pm 10.4	13.07
<i>control</i>	94.12 \pm 14.4	88.3 \pm 9.6	84.26 \pm 5.4	80.01 \pm 7.8	15.00
<i>Compound</i>					
<i>A</i>	94.27 \pm 16.1	91.56 \pm 3.1	85.16 \pm 2.8	79.13 \pm 10.6	16.06
<i>B</i>	93.13 \pm 9.1	81.05 \pm 5.2	79.14 \pm 7.4	75.04 \pm 5.6	19.42
<i>C</i>	89.37 \pm 13.73	83.71 \pm 10.9	70.77 \pm 5.3	59.75 \pm 9.4	33.55
<i>D</i>	95.12 \pm 8.5	77.18 \pm 3.7	49.54 \pm 4.9	33.14 \pm 5.3	65.6

3.5 Thiobarbituric acid reactive substances measurement

If the sulfhydryls are modified, physiological functions of molecules containing thiols would be altered, thereby inducing oxidative stress, because of that, we have carried out the effect of catalysts against lipid peroxidation. Figure 5 shows the extent of protection afforded by catalysts (compound **C** and **D**, because their better GPx like activity). The TBARS amount caused by Fe (II) was considerably reduced in the presence of both catalysts, and the decrease of TBARS amount was increased with the increase of the concentration of these compounds (concentration dependent-manner). Fe(II) produced a significant increase on TBARS formation ($p < 0.05$) in rat brain homogenates that was blocked significantly by diphenyl diselenide at 40 and 80 μM , used as a positive control. Compound **C** also showed ability to reduce the MDA levels increased by Fe(II) but it was significantly only at 80 μM . However, compound **D** reduced TBARS levels, but this decrease observed did not show any significance for concentrations tested (Figure 5), suggesting that the TBARS formation inhibition by diselenides can be mediate by a different mechanism in place of GPx activity. Compound **C** and PhSeSePh, both at 80 μM reduced the TBARS levels under basal values.

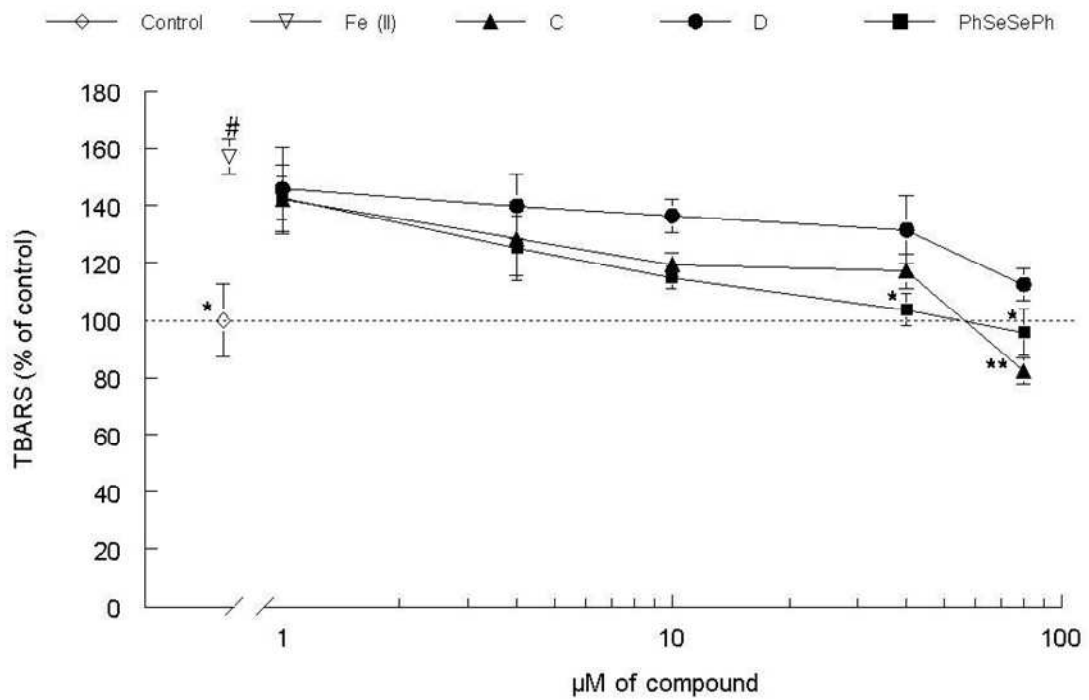


Figure 5. Effect of different concentrations of compound C, D and PhSeSePh, used as a positive control, on TBARS formation induced by Fe(II). Values are expressed as mean \pm S.E.M from 3 to 4 independent experiments performed in triplicate. ^{*}^{**} Represent difference in relation Fe(II)-induced TBARS when compared to those induced by Fe(II) and treated with compounds. [#] Represents significant difference between Fe(II)-induced TBARS formation and basal values.

4. CONCLUSIONS

In summary, we have evaluated a new class of chiral diselenoamino acid derivatives as GPx mimics, catalyzing the reduction of H₂O₂ to water at expense of thiophenol using a very low amount of catalyst. These diselenides tested in this work showed promising mimetic properties. Our study showed that there are two key factors for improving catalytic efficiency of GPx mimics. First, diselenides are influenced by steric effect of aminoacid residue (best catalyst: compound **D**), and second, the number of carbon between the aminoacid residue and the Se atom in diselenide structure (best catalyst: compound **C**). The protective effect against lipid peroxidation presented by diselenides (**C** and **D**) could be associated with thiol peroxidase activity, but this inhibition of lipid peroxidation could be mediated by a different mechanism of thiol peroxidase activity. We conclude that these conditions are significant considering the design mimics with high catalytic efficiency. This investigation of selenium-containing enzyme models may yield useful as artificial catalysts for medical applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CNPq, CAPES, and FAPERGS for financial support.

5. REFERENCES

ALBERTO, E. E.; SOARES, L. C.; SUDATI, J. H.; BORGES, A. C. A.; ROCHA, J. B.T.; BRAGA A.L. Efficient Synthesis of Modular Amino Acid Derivatives Containing Selenium with Pronounced GPx Like Activity (submitted to the **Eur. J. Org. Chem.**).

BRAGA, A.L.; ALBERTO, E.E.; SOARES, L.C.; ROCHA, J.B.T.; SUDATI, J.H.; ROOS, D.H. Synthesis of telluroamino acid derivatives with remarkable GPx like activity **Org. Biomol. Chem.**7:43–45, 2009.

DETTY, M.R.; Merkel, P.B.; Powers, S. K. **J. Am. Chem. Soc.** 110:5920, 1988.

DETTY, M.R. **Organom.** 10: 702, 1991.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys.** 82:70–77, 1959.

ENGMAN, L.; HALLBERG, A. The strategy for preparing the mimic be improved. **J. Org. Chem.** 54:2964–2966, 1989.

ENGMAN, L.; STERN, D.; PELCMAN, M.; ANDERSSON, C.M. (1994) Thiol Peroxidase Activity of Diorganyl Tellurides. **J. Org. Chem.** 59:1973-1979.

FLOHÉ, L. Glutathione peroxidase brought into focus, in: W.A. Pryor (Ed.), **Free Rad. Biol.**, Academic Press, 1982.

IWAOKA, M.; TOMODA, T. A Model Study on the Effect of an Amino Group on the Antioxidant Activity of Glutathione Peroxidase **J. Am. Chem. Soc.** 116:2557-2561, 1994.

LIU, J.; LUO, G.; REN, X.; MU, Y.; BAI, Y.; SHEN, J. A bis-cyclodextrin diselenide with glutathione peroxidase-like activity. **Biochim. Biophys. Acta** 1481:222-228, 2000.

LUO, G.; ZHU, Z.; DING, L.; SUN, Q.; LIU, Z.; SHEN, J. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 198:1240–1247, 1994.

MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K.I.; MOHANA, H.; MUGESH, G. Horseradish peroxidase inhibition and antioxidant activity of ebselen and related organoselenium compounds **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 16: 5334–5338, 2006.

MÜLLER, A.; CADENAS, E.; GRAF, P.; SIES, H. **Biochem. Pharmacol.** 33: 3235, 1984.

NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G., ROCHA, J.B.T. **Chem. Rev.** 104, 6255, 2004.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.** 95:351– 358, 1979.

PUNTEL, R.L.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T. N-methyl-D-aspartate receptors are involved in the quinolinic acid, but not in the malonate pro-oxidative activity in vitro. **Neurochem. Res.** 30:417–424, 2005.

REICH, H.J. Organoselenium **Chemistry**: Functional Group Manipulation with Organoselenium Reagents *Acc. Chem. Res.* 12: 22-30,1979.

REN, X.; XUE, Y.; ZHANG, K.; LIU, J.; LUO, G.; ZHENG, J.; MU, Y.; SHENA, J. A novel dicyclodextrinyl ditelluride compound with antioxidant activity. **FEBS Letters** 507:377-380, 2001.

RIDDLES, P.W.; BLAKELEY, R.L.; ZERNER, B. Ellman's reagent - 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid): A reexamination, **Anal. Biochem.** 94:75–81, 1979.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; AUMANN, K.D.; ROVERI, A.; SCHOMBURG, D.; FLOHÉ, L. **Methods Enzymol.** 252:38-53, 1995.

WENDEL, A.; FAUSEL, M.; SAFAYHI, H.; TIEGS, G.; OTTER, R. **Biochem. Pharmacol.** 33:3241, 1984.

WILSON, S.R.; ZUCKER, A.P.; HUANG, R.C.; SPECTOR, A. Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity. **J. Am. Chem. Soc.** 111: 5936–5939, 1989.

WIRTH,T. Glutathione Peroxidase-like Activities of Oxygen-Containing Diselenides. **Molec.** 3:164-166, 1998.

XIE, J.J.; SONG, K.K.; QIU, L.; HE, Q.; HUANG, H.; CHEN, Q.X. Inhibitory effects of substrate analogues on enzyme activity and substrate specificities of mushroom tyrosinase. **Food Chem.** 103:1075–1079, 2007.