

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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE BETA-
SELENOAMINAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Alessandro de Souza Prestes

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE BETA- SELENOAMINAS

Alessandro de Souza Prestes

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nilda Berenice de Vargas Barbosa

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

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

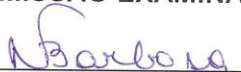
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE
DE BETA-SELENOAMINAS**

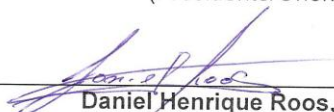
elaborada por
Alessandro de Souza Prestes

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

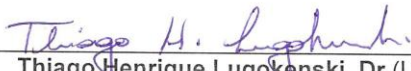
COMISSÃO EXAMINADORA:



Nilda B. de Vargas Barbosa, Dr.^a.
(Presidente/Orientadora)



Daniel Henrique Roos, Dr.(UFRGS)



Thiago Henrique Lugokenski, Dr.(UFSM)

Santa Maria, 22 de fevereiro de 2013.

Aos meus pais
Ao meu irmão e à minha namorada
Aos meus amigos, colegas e professores
Pessoas especiais que formam a base que sustenta minha caminhada

*'A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.'*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade da vida e, independente da crença ou pessoa a mencioná-lo, por sempre ter me levado as melhores escolhas.

Agradeço aos meus pais, Adair e Rita, pelo apoio incondicional sempre prestado, bem como o exemplo de força nas horas mais difíceis. Pelos bons ensinamentos sobre honestidade, sinceridade, força de vontade e fé no que diz respeito à vida profissional e, principalmente, pessoal. Também agradeço ao meu irmão Rafael pela amizade, companheirismo e auxílio nos momentos em que realmente precisei.

À minha namorada Lise, por me apoiar, auxiliar, repetir e aguentar em todas as horas, especialmente naquelas em que as circunstâncias não eram muito favoráveis. Obrigado por tudo, te amo! Também gostaria de agradecer aos pais, familiares, parentes e amigos da Lise pelas inúmeras horas de alegria, bem como o esforço para me deixar confortável, à vontade e tranquilo, sempre.

Aos meus amigos, colegas e companheiros dos laboratórios, assim como os professores Félix, Cris, Gilson, Rose e especialmente João, pelo convívio diário, brincadeiras, trabalho, exemplo de dedicação e conciliação entre trabalho, resultados e momentos de descontração nas horas vagas.

Também gostaria de agradecer aos demais professores, funcionários e alunos envolvidos no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, por darem todas as condições para que juntos possamos chegar a nossos objetivos.

Agradeço à minha banca, formada pelo Daniel Roos, Caroline Wagner, e Thiago Lugokenski, por se disponibilizarem a ler, corrigir e avaliar minha dissertação, deixando de lado interesses pessoais e horas de trabalho para esse fim.

Gostaria de fazer um agradecimento especial aos meus colegas do laboratório 3239, bem como à Professora Nilda. Não existem palavras para demonstrar o apoio e união prestados incondicionalmente nos momentos mais difíceis destes últimos semestres. Muito obrigado, professora, por ter aceitado me orientar, e também pelo incentivo e conhecimento que transmitiste nessa etapa da minha vida.

Muito obrigado também ao grande Matheusito, um dos meus melhores amigos que, juntamente com a Claudinha, pude e poderei sempre contar a toda e qualquer hora, independente da situação em que me encontre.

Agradeço também aos valores passados por todos com que tive a oportunidade de conviver e me aperfeiçoar pessoal e profissionalmente. A dedicação, alegria e força de vontade da Fran, que contagiaram não só a mim, mas a todos que a conheceram. A simpatia, trabalho e fé do Rafa, que não tinha capacidade de causar ressentimentos e sempre dar valor à amizade verdadeira. Ao trabalho, amizade e dedicação da Kelli. À força da Tailana. Ao apoio e amizade da Angelica. Ao esforço do Assis e do Rodrigo. Ao apoio do Carlos. Ao auxílio e compreensão da Sandra, bem como todas as pessoas que passaram tanto pelos laboratórios da professora Nilda quanto do professor João, e que tive o prazer de conviver e aprender nestes últimos anos.

Prefiro não citar mais nomes, pois não caberiam em poucas páginas os agradecimentos. Contudo, gostaria de agradecer a todos que de certa forma fazem parte da minha história. Cada pessoa citada aqui, bem como as não citadas, não têm ideia da importância que exerceram para que eu pudesse atingir meus objetivos. Logo, o que me resta é mais uma vez dizer: muito obrigado, de coração.

RESUMO

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

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE BETA-SELENOAMINAS

AUTOR: ALESSANDRO DE SOUZA PRESTES
ORIENTADORA: NILDA BERENICE DE VARGAS BARBOSA
CO-ORIENTADOR: JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 22 de fevereiro de 2013

As propriedades antioxidantes de compostos orgânicos de selênio têm sido amplamente investigadas nas últimas décadas, especialmente pelo fato do estresse oxidativo estar diretamente relacionado a uma grande variedade de doenças crônico-degenerativas. Contudo, poucos estudos têm verificado a ação exercida por radicais nucleofílicos ou eletrofílicos na atividade protetora de compostos de selênio. Neste trabalho foi avaliada a influência de diferentes radicais substituintes sobre a atividade antioxidante de β -selenoaminas. A capacidade das β -selenoaminas em mimetizar a atividade da glutathiona peroxidase (GPx) e/ou serem substratos para a enzima tioredoxina redutase hepática (TrxR) também foram investigadas em modelos experimentais *in vitro*. No ensaio de DPPH[•], as β -selenoaminas testadas não apresentaram atividade antioxidante quando comparadas ao ácido ascórbico (AA). Contudo, assim como o composto disseleneto de difenila (PhSe)₂, as β -selenoaminas com grupos *p*-metóxi e *tosil* na estrutura foram efetivas em prevenir a peroxidação lipídica induzida por Fe₂SO₄. Os compostos com outros radicais não apresentaram a mesma atividade. A β -selenoamina com o grupo substituinte *p*-metóxi também apresentou atividade mimética à GPx e foi reduzida pela TrxR hepática. Além disso, uma correlação positiva foi encontrada entre estes parâmetros para as β -selenoaminas; o que não foi observado quando considerados os resultados obtidos com o composto (PhSe)₂. Os dados do presente trabalho mostram a influência de diferentes radicais substituintes na atividade de compostos orgânicos de selênio, bem como, aponta o uso de β -selenoaminas como compostos promissores farmacologicamente em modelos experimentais *in vivo*.

Palavras-chave: Antioxidantes, β -selenoaminas, glutathiona peroxidase, selênio, tioredoxina redutase

ABSTRACT

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

Evaluation of Antioxidant Potential of β -selenoamines

AUTHOR: Alessandro de Souza Prestes
ADVISOR: Nilda Berenice de Vargas Barbosa
CO-ADVISOR: João Batista Teixeira da Rocha
Place and Date of the Defense: Santa Maria, 22nd february, 2013.

The antioxidant properties of selenium organic compounds have been largely investigated in the last decades, especially because the oxidative stress is directly related to various chronic-degenerative diseases. However, a few studies verify the action of nucleophilic or electrophilic radicals on the protective activity of selenium compounds. In this work, it was evaluated the influence of different substituent radicals on the antioxidant activities of β -selenoamines. The capacity of β -selenoamines in mimicry the glutathione peroxidase (GPx) activity and/or be substrate to the hepatic thioredoxin reductase (TrxR) enzyme were also investigated in experimental models *in vitro*. In DPPH' assay, the β -selenoamines tested did not show antioxidant activity when compared to ascorbic acid (AA). However, similar to compound (PhSe)₂, the β -selenoamines with *p*-methoxy and *tosyl* radicals were effective in preventing the lipid peroxidation induced by Fe₂SO₄. The compounds with other radicals did not exhibit the same activity. The β -selenoamine with the substituent group *p*-methoxy also showed mimetic activity to GPx and was reduced by hepatic TrxR. Furthermore, a positive correlation was observed among these parameters to β -selenoamines, which was not found in the results obtained with (PhSe)₂. The data of this work show the influence of different substituent radicals on activity of organic selenium compounds and point the use of β -selenoamines as pharmacological promissory compounds in *in vivo* experimental models.

Key words: Antioxidants, β -selenoamines, glutathione peroxidase, selenium, thioredoxin reductase

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Estrutura química do disseleneto de difenila (PhSe)₂ 4
- Figura 2.** Estrutura química das β-selenoaminas5
- Figura 3.** Etapas no processo de peroxidação lipídica 7

PARTE II – ARTIGO CIENTÍFICO

- Figura 1.** Chemical structure and nomenclature of β-selenoamines and diphenyl diselenide.....16
- Figura 2.** Effect of β-selenoamines (c1–c6) and diphenyl diselenide (PhSe)₂ on TBARS production in brain of rats18
- Figura 3.** Effect of β-selenoamines (c1–c6) and diphenyl diselenide ((PhSe)₂) on DPPH reduction using ascorbic acid as a standard antioxidant.....19
- Figura 4.** Determination of thiol-peroxidase-like activity of β-selenoamines compared with (PhSe)₂ 200 μM.....19
- Figura 5.** Representative graph of NADPH oxidation by hepatic TrxR determined in the presence of 15 μM β-selenoamines or 15 μM (PhSe)₂ as substrate.....20

PARTE II – RESULTADOS COMPLEMENTARES

- Figura 1.** Correlação entre as atividades miméticas à GPx (Tiol Peroxidase) das β-selenoaminas e suas reduções pela TrxR de mamíferos (TrxR): considerando os resultados sem o (PhSe)₂ (A) e os com o (PhSe)₂ (B).....25

Figura 2. Correlação entre a capacidade de redução do radical DPPH[•] das β-selenoaminas e suas atividades miméticas à GPx (A) e à proteína Trx de mamíferos, servindo de substrato para a enzima TrxR isolada do fígado de ratos (B) ambos desconsiderando os resultados com o (PhSe)₂.....26

LISTA DE ESQUEMAS

INTRODUÇÃO

Esquema 1. Ciclo da glutathiona peroxidase9

Esquema 2. Atividade da enzima tioredoxina redutase.....9

ARTIGO CIENTÍFICO

Scheme 1. Antioxidant pathways of diphenyl diselenide (PhSe)₂ and ebselen (Ebs).....16

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

(PhSe) ₂	Disseleneto de difenila
c1	(S)-2-amino-3-fenil-1-(benzilselanil)-propano
c2	(S)-terc-butil-3-fenil-1-(fenilselanil)-propan-2-il-carbamato
c3	(S)-4-metil-N-[1-fenil-1-(fenilselanil)propan-2-il]benzenosulfonamida
c4	(S)-2-amino-3-fenil-1-(4-toluilselanil)propano
c5	(S)-2-amino-3-fenil-1-(4-metoxifenilselanil)propano
c6	(S)-2-amino-3-fenil-1-(4-clorofenilselanil)propano
AA	Ácido Ascórbico
Cl	Cloro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH [•]	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
Ebs	Ebselen
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fe ²⁺	Íon férrico
GPx	Glutaciona peroxidase
H	Hidrogênio
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH	Radical hidroxil
ONOO ⁻	Peróxinitrito
<i>p</i>	<i>para</i>
PhSeSePh	Disseleneto de difenila (<i>esquema do artigo</i>)
RO [•]	Radical alcóxil
ROO [•]	Radical peróxil
ROOH	Hidroperóxido
RSH	Grupos tióis reduzidos
RSSH	Grupos tióis oxidados
S	Enxofre

Se	Selênio
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
Te	Telúrio
<i>tosil</i>	<i>p</i> -toluenossulfonilo
Trx	Tiorredoxina
Trx-(SH) ₂	Tiorredoxina reduzida
TrxR	Tiorredoxina redutase
α	Alfa
β	Beta

SUMÁRIO

<i>AGRADECIMENTOS</i>	<i>vii</i>
<i>RESUMO</i>	<i>ix</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>x</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>xi</i>
<i>LISTA DE ESQUEMAS</i>	<i>xiii</i>
<i>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</i>	<i>xiv</i>
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O Selênio.....	1
1.2. Compostos orgânicos de Se	2
1.3. Ebselen, (PhSe) ₂ e as β-selenoaminas.....	3
1.4. Radicais livres e Estresse Oxidativo	4
1.5. Peroxidação Lipídica	6
1.6. Antioxidante Enzimáticos e Não-Enzimáticos	7
1.7. Glutathiona Peroxidase (GPx).....	8
1.8. Tiorredoxina Redutase (TrxR)	9
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo Geral	12
3.2. Objetivos Específicos	12
4. RESULTADOS	13
4.1. Parte 1: Artigo científico: Atividade antioxidante de β-selenoaminas e suas capacidades de mimetizar diferentes enzimas	16
Abstract.....	16
Introduction.....	16
Materials and Methods	18
Results	19
Discussion	21
References	22

4.2. Parte 2: Resultados complementares	25
4.2.1. Materiais e Métodos	25
4.2.1.1. Análise estatística	25
4.2.2. Resultados	25
4.2.2.1. Correlação entre as atividades tiol peroxidase-like das β -selenoaminas e suas capacidades de redução pela TrxR	25
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÕES	31
8. PERSPECTIVAS	32
9. REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Selênio

Assim como os elementos enxofre (S) e telúrio (Te), o selênio (Se) pertence à família dos calcogênios (16 ou VIA) da Tabela Periódica dos elementos. O Se possui número atômico 34, massa atômica 78 e é encontrado em estado sólido à temperatura ambiente. Este elemento foi descoberto no ano de 1817 por Jöns Jacob Berzelius, quando investigava as substâncias químicas responsáveis por surtos de doenças entre os trabalhadores de uma fábrica de ácido sulfúrico sueca.

O Se está amplamente distribuído na crosta terrestre e pode ser encontrado em várias formas alotrópicas. Possui 28 isótopos, sendo que 5 são estáveis e 4 estados de oxidação: Se^0 , Se^{+6} , Se^{+4} , Se^{-2} (Al-Saleh, 2000). É um elemento cuja maioria dos compostos que forma são insolúveis em água e etanol, sendo solúveis em outros solventes orgânicos como dimetilsulfóxido, por exemplo. O primeiro composto orgânico de Se foi sintetizado 30 anos após a descoberta deste elemento, em 1847, por Wöhler and Siemens.

Com o passar dos anos, diferentes compostos de Se foram sintetizados para a utilização industrial em diversas áreas. Dentre elas, pode-se destacar na fabricação de vidros, xampus anticaspa, borracha vulcanizada, equipamentos eletrônicos, células fotoelétricas, entre outros (Kavlak e Graedel, 2013). No entanto, atualmente a síntese de compostos contendo Se está amplamente direcionada para a busca de propriedades biológicas e de possíveis aplicações farmacológicas (Nève, 1995).

O Se é reconhecido como um microelemento essencial para a maioria das formas de vida desde a década de 1950. Nos seres humanos, sua distribuição global é de 30% no fígado, 30% nos músculos, 15% nos rins, 10% no plasma, e os outros 15% ficam distribuídos nos outros órgãos (Zachara e cols., 2001). Salvo a exposição ambiental ou medicamentosa, quase que sua totalidade provém da alimentação (Alaejos e cols 2000).

Grande parte dos alimentos possui Se em suas composições. Contudo, alimentos como pães, pescados, carnes e ovos são reconhecidamente ricos neste elemento. Após a ingestão destes alimentos, o Se é absorvido no intestino delgado e posteriormente incorporado a proteínas ou outras moléculas por mecanismos que

variam consideravelmente dependendo da função e localização da molécula ou proteína em questão.

1.2. Compostos Orgânicos de Se

Apesar da crescente importância dada aos organocalcogênios, especialmente os contendo o átomo Se, somente a partir da década de 1970 eles começaram a ser difundidos na síntese orgânica. A partir daí, uma grande quantidade destes compostos, com funções biológicas conhecidas ou hipotéticas, foram desenvolvidos e estudados. Como exemplo de moléculas orgânicas de Se atualmente sintetizadas, podemos destacar os selenocarbohidratos, selenoaminoácidos e selenopeptídios (Hocman, 1988).

De forma geral, uma gama cada vez maior de organocalcogênios sintéticos contendo Se vêm sendo desenvolvidos e investigados em meios biológicos diversos. Boa parte dos mesmos geralmente exibe alguma propriedade farmacológica ativa. Uma particularidade que tem levado ao atual interesse por essa classe de compostos é o conceito de que moléculas contendo Se podem ser melhores nucleófilos (e, portanto antioxidantes) do que os antioxidantes clássicos (Arteel e Sies, 2001). Como conseqüência, vários compostos de Se vêm sendo apontados como possíveis agentes terapêuticos para uma grande variedade de doenças, incluindo dislipidemias, hipertensão, doenças neurológicas, doenças hepáticas, entre outras (Kieliszek e Błażejczak, 2013; Parnhan e Graf, 1991).

Dentre os organocalcogênios amplamente estudados nas últimas décadas em termos de toxicologia e farmacologia, destacam-se o ebselen e o disseleneto de difenila (PhSe)₂ (Hassan e cols., 2009; Schewe, 1995). Ambos impulsionariam a síntese de novos compostos orgânicos de Se com estruturas análogas ou até então inéditas, como as β-selenoaminas por exemplo.

1.3. Ebselen, (PhSe)₂ e as β-selenoaminas

Possuindo o nome científico de 2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona, o ebselen é um composto orgânico de Se com notável atividade antioxidante. Contudo, além desta atividade, é conhecido por possuir, como propriedades farmacológicas, efeito anti-inflamatório; analgésico; neuroprotetor e hepatoprotetor

(Meotti et al., 2003; Porciúncula et al., 2003; Borges et al., 2005; Nogueira et al., 2004; Borges et al., 2006; Bürger et al., 2004; Zasso et al., 2005). O estudo deste composto não se restringiu a trabalhos *in vitro* ou a modelos animais. O ebselen chegou a ser testado com êxito no tratamento de indivíduos com dano cerebral (Jozsef and Filep, 2003; Yamaguchi e cols., 1998; Saito e cols., 1998; Ogawa e cols., 1999). No entanto, sem esclarecimentos claros, as investigações clínicas com o ebselen foram abandonadas pelo grupo de japoneses detentores de sua patente. Desde então, o desenho e síntese de novos compostos de selênio com propriedades antioxidantes têm sido explorados para o desenvolvimento de potenciais agentes terapêuticos (Yamagata e cols., 2008), especialmente pelo fato de alguns destes poderem mimetizar atividades antioxidantes fisiológicas (Wilson e cols., 1989; Nogueira e cols., 2004; Nogueira e Rocha, 2010).

O disseleneto de difenila (PhSe_2) (Figura 1), assim como o ebselen, é um composto orgânico de Se que reage eficientemente com hidroperóxidos e peróxidos orgânicos através de uma reação similar a catalizada pela enzima glutathione peroxidase (GPx). Todavia, o disseleneto de difenila é mais ativo como mimético da GPx (Wilson et al., 1989) e menos tóxico em roedores do que o ebselen (Nogueira et al., 2003b; Meotti et al., 2003). Dados da literatura também demonstram que ambos os compostos podem ser reduzidos pelo sistema tioredoxina redutase (TrxR), formando intermediários que são potentes nucleófilos (Roos e cols., 2012; Fang e cols., 2005; Lu e cols., 2009; Straliozzo e cols., 2013). Neste contexto, um estudo recente avaliando ambos os compostos, demonstrou que somente o (PhSe)_2 foi substrato para o sistema tioredoxina redutase de cérebro de ratos (Freitas e Rocha, 2011).

Além da atividade antioxidante, propriedades anti-inflamatória, anticarcinogênica, neuroprotetora e antidiabetogênica têm sido referenciadas ao (PhSe)_2 em diferentes modelos experimentais de patologias humanas com roedores (Nogueira e cols., 2004; Nogueira e Rocha, 2010). Assim, o (PhSe)_2 tem sido comumente utilizado como composto padrão na análise de organocalcogênios contendo Se e com potencial antioxidante (Freitas e cols., 2012; Puntel e cols., 2013; Hodage e cols., 2012).

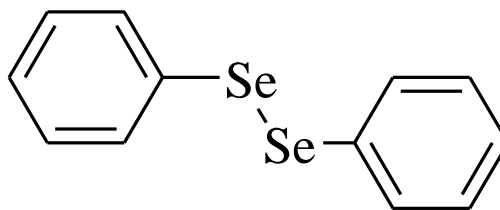


Figura 1: Estrutura química do disseleneto de difenila (PhSe)₂

De forma geral, organocalcogênios como o ebselen e o (PhSe)₂, os quais mimetizam a atividade de enzimas que desempenham um importante papel redox nos sistemas biológicos (Prigol e cols., 2012), tornam-se importantes alvos de estudos farmacológicos/toxicológicos, principalmente em modelos experimentais de doenças associadas com o desenvolvimento de estresse oxidativo (Barbosa e cols, 2008).

Assim, o estudo de novos compostos orgânicos de Se contendo diferentes grupos, como aminas ou grupos nucleofílicos e eletrofílicos, torna-se importante na busca por compostos com propriedades farmacológicas promissoras. Como exemplo podemos citar as β -selenoaminas do presente estudo (Figura 2). Estes compostos diferem-se dos anteriores por possuir um grupamento amino na estrutura bem como grupamentos nucleofílicos (que tendem a doar elétrons) ou eletrofílicos (que tendem a atrair elétrons) em posição *para* com relação ao átomo de Se.

1.1. Radicais Livres e Estresse Oxidativo

Durante o metabolismo basal das células aeróbicas normais existe uma produção constante de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), acompanhadas pela sua contínua inativação através da ação de antioxidantes, de forma a manter a integridade estrutural e funcional das biomoléculas (Pelicano e cols, 2004). Contudo, quando ocorre uma diminuição nos níveis das defesas antioxidantes tanto enzimáticas quanto não enzimáticas, uma elevada produção de espécies reativas e/ou uma combinação de ambos os fatores, desencadeia-se eventos celulares que caracterizam um fenômeno conhecido como estresse oxidativo (Hopps e cols., 2010).

Entre as principais espécies reativas capazes de gerar estresse oxidativo, destaca-se o radical ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), e o peroxinitrito (ONOO^-) (Halliwell e Gutteridge, 1989), bem como moléculas de

peróxido de hidrogênio ou óxido nítrico. A extensão e o tipo de dano causado por ERO ou ERN dependem da quantidade e da natureza dos mesmos, bem como das defesas antioxidantes celulares (Davies, 1991).

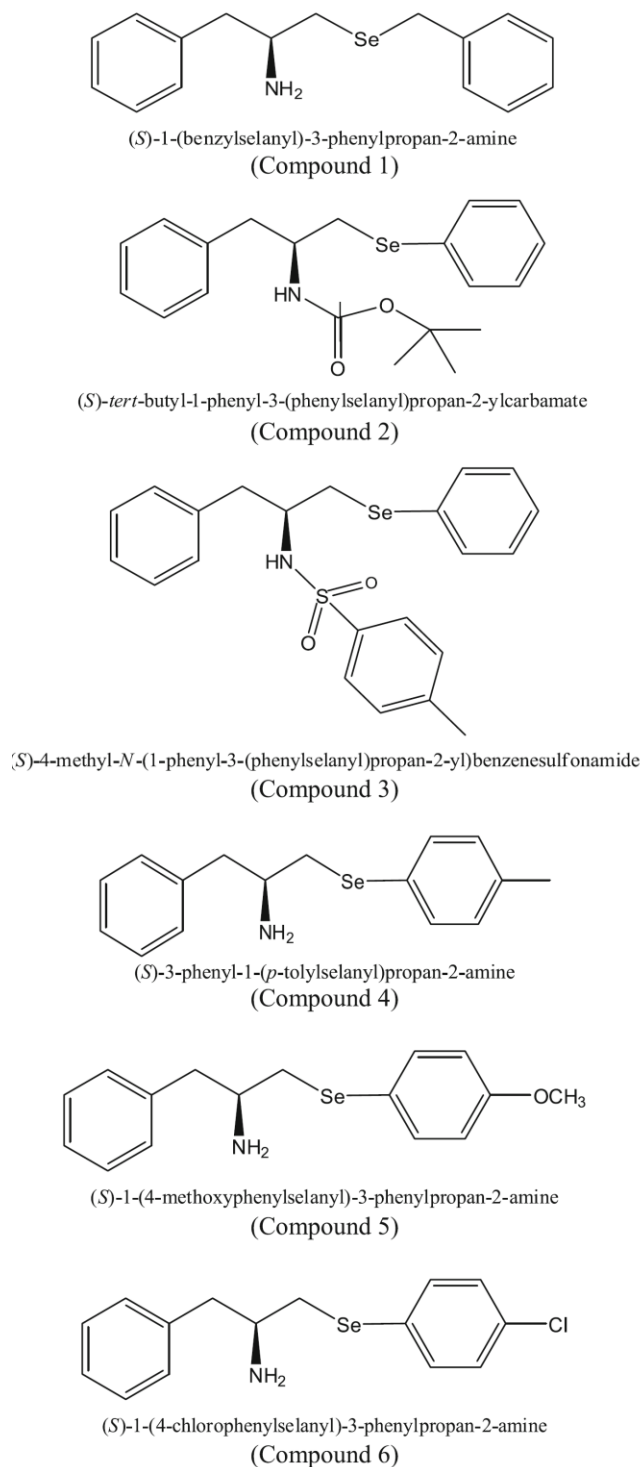


Figura 2: Estrutura química das β -selenoaminas do presente estudo.

O quadro de estresse oxidativo usualmente é prejudicial a todas as estruturas celulares, incluindo lipídios e proteínas de membranas biológicas (Halliwell e Gutteridge, 1989; Dawson e Dawson, 1996). Assim, avaliar a efetividade redutora de compostos de Se, bem como a habilidade dos mesmos em otimizar defesas antioxidantes celulares, torna-se crucial tendo em vista que compostos contendo Se vêm sendo amplamente apontados e testados na prevenção de danos oxidativo em diferentes modelos experimentais (Brenneisen e cols, 2005).

1.2. Peroxidação Lipídica

Como citado anteriormente, todos os componentes celulares são afetados pela condição conhecida como estresse oxidativo. Contudo, os ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídeos das membranas biológicas são particularmente suscetíveis ao dano oxidativo causado por espécies reativas, devido ao fenômeno chamado de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (Niki, 2012).

A interação de espécies reativas com os ácidos graxos poliinsaturados causa modificações nos lipídios de membrana e conseqüentemente perda das características das membranas biológicas. Este processo pode culminar com a formação de fendas iônicas que alteram a permeabilidade das membranas favorecendo o trânsito exacerbado de metabólitos/moléculas, e a lise celular (Josephy, 1997).

Resumidamente, a peroxidação lipídica pode ser iniciada pelo ataque de uma espécie reativa, que remove um átomo de hidrogênio (H) de um ácido graxo insaturado, resultando na formação de um radical de fosfolipídio (L^{\bullet}) (Slater, 1984; Janero, 1990; Halliwell, 1992; Holley e Cheeseman, 1993). Após, ocorre uma adição de oxigênio ao radical formado, resultando num radical peroxil (LOO^{\bullet}), que irá retirar um átomo de H de alguma molécula vizinha, culminando na formação de um hidroperóxido lipídico (LOOH) e mais um radical (L^{\bullet}), o qual pode desencadear uma nova sequência de reações de cunho oxidativo.

Na segunda fase da lipoperoxidação, os ROOH primários formados são convertidos em produtos mais estáveis, porém esta quebra pode gerar radicais alcóxil (RO^{\bullet}), especialmente na presença de metais de transição como o Fe^{2+} , favorecendo o processo de propagação. Os radicais alcóxil são análogos altamente

reativos do radical hidroxil (OH^\bullet), uma potente espécie reativa de oxigênio (Graf e cols., 1984; Janero, 1990; Namiki, 1990; Halliwell, 1992). Todo o processo de peroxidação lipídica está resumido na Figura 3 (Lima e Abdalla, 2001).

O hidroperóxido também pode formar outros produtos como o malondialdeído (MDA), um aldeído que serve como marcador químico da peroxidação lipídica. Estudos que visam investigar a peroxidação lipídica podem ser feitos utilizando uma técnica de determinação indireta das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico na qual o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), originando um produto que pode ser quantificado espectrofotometricamente no comprimento de onda de 532 nm (Ohkawa, 1979).

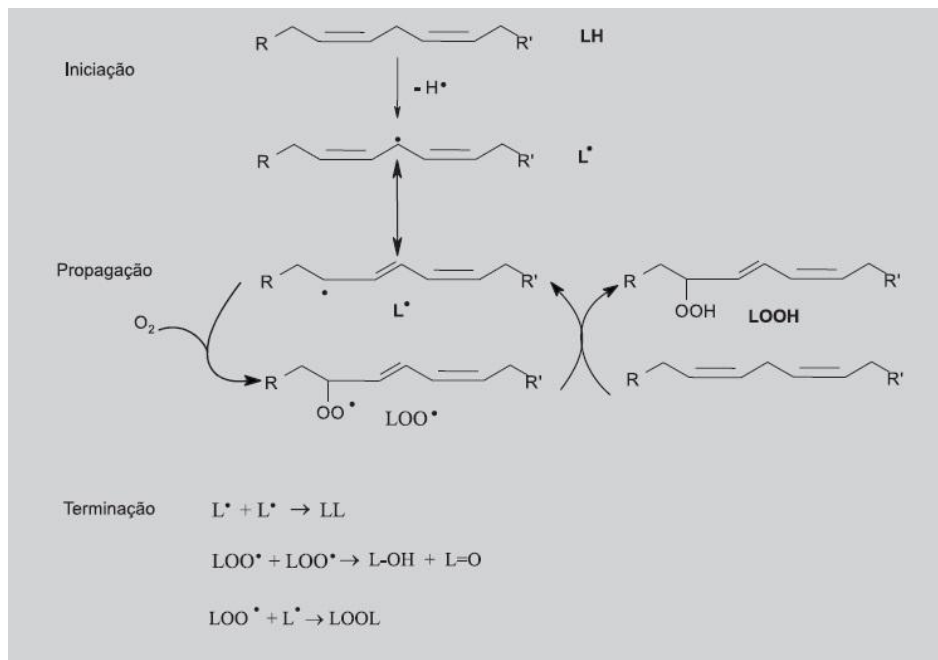


Figura 3: Etapas no processo de peroxidação lipídica.

Retirado de Lima e Abdalla, 2001.

1.3. Antioxidantes Enzimáticos e Não-Enzimáticos

Antioxidantes são compostos com capacidade de neutralizar radicais livres formados durante reações oxidativas. Essa ação pode ocorrer de maneira direta, ou seja, não enzimática, ou por enzimas com função antioxidante (Sies, 1993). Existem várias classes de compostos com atividade antioxidante não enzimática. Além dos flavonoides e polifenóis, presentes naturalmente em plantas, destacam-se as

vitaminas α -tocoferol, ácido ascórbico (AA) e as do complexo B. (Taulikar e Manyonda, 2011; Cadenas e cols 1995; Hu e cols., 1995).

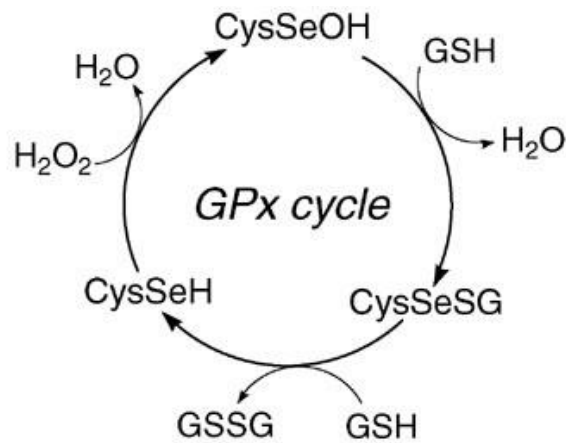
Além das substâncias com papel antioxidante presentes naturalmente nos alimentos, outras, sintéticas, são adicionadas com o objetivo de prolongar a validade destes produtos. Grupos presentes nestes compostos orgânicos sintéticos exercem ação antioxidante doando elétrons em reações oxidativas que aumentam com o envelhecimento do produto. Como exemplo pode-se citar o grupo amina. Por estar completamente ionizado em pH fisiológico e possuir um par de elétrons disponíveis, as aminas se tornam importantes antioxidantes, que cada vez são mais estudados em meios biológicos diversos.

Além dos antioxidantes exógenos, a ação dos sistemas antioxidantes endógenos é fundamental para o controle da homeostase redox das células e, conseqüentemente, da situação oxidativa geral do organismo. Juntamente com os antioxidantes não enzimáticos, duas classes de sistemas enzimáticos destacam-se na função de neutralizar e/ou reduzir eventos que caracterizam uma situação de estresse oxidativo: as enzimas Glutaciona peroxidase (GPx) e Tiorredoxina redutase (TrxR).

1.4. Glutaciona Peroxidase (GPx):

Um importante sistema enzimático de defesa contra radicais livres envolve a ação das enzimas glutacionas peroxidases (GPx), as quais são encontradas em muitos tecidos de origem animal. O envolvimento de algumas GPx no controle dos níveis de hidroperóxidos fosfolipídicos, formados a partir do ataque de espécies radiculares às membranas é bem estudado, assim como seus parâmetros cinéticos e mecanismos catalíticos envolvendo glutaciona e peróxido de hidrogênio.

Alguns compostos orgânicos de Se, como o $(\text{PhSe})_2$, possuem atividades miméticas à GPx. Desta forma, eles podem decompor peróxidos utilizando glutaciona reduzida (GSH) (Esquema 1) ou outros tióis, sendo doadores de elétrons (Nogueira e cols. 2004; Nogueira e Rocha, 2010; Wilson e cols, 1989). Esta habilidade faz destes compostos bons agentes redutores. Contudo, a possível atividade mimética de compostos nucleofílicos à GPx ainda não se encontra bem esclarecida.

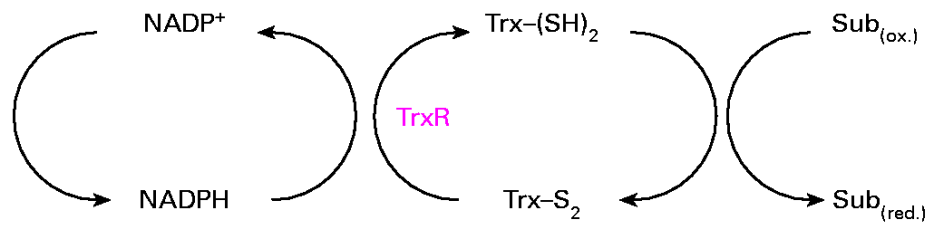


Esquema 1: Ciclo da glutatona peroxidase. Adaptado de Singh e cols, 2010.

1.5. Tiorredoxina redutase (TrxR)

O sistema tiorredoxina, composto pela enzima tiorredoxina redutase (TrxR), pela tiorredoxina (Trx) e pelo NADPH, é essencial para a manutenção do balanço redox de células eucarióticas (Holmgren, 1989). A TrxR é uma enzima dimérica contendo FAD, que catalisa a redução NADPH-dependente do sítio ativo dissulfeto na Trx oxidada (Trx-S₂) para levar a uma Trx reduzida (Trx-(SH)₂) (Esquema 2) (Holmgren, 1989; Mustacich e Powis, 2000).

Os mamíferos possuem TrxR com notável especificidade para seus substratos. Contudo, estas não reduzem apenas diferentes tiorredoxinas, mas também, entre outros, selenetos (Kumar e cols., 1992), selenodiglutationa (Björnstedt e cols., 1992), e selenocisteína (Björnstedt e cols., 1997). No esquema 2, estes compostos estão representados como Sub_(ox.), que tornam-se reduzidos (Sub_(red.)) por ação da TrxR. Contudo, não existem dados na literatura comparando a atividade tiorredoxina redutase de compostos de Se a radicais doadores ou receptores de elétrons, bem como à β-selenoaminas.



Esquema 2: Atividade da enzima tiorredoxina redutase. Adaptado de Mustacich e Powis, 2000.

2. JUSTIFICATIVA

A grande maioria das doenças crônicas e degenerativas em humanos tem durante sua origem e/ou progressão o envolvimento de eventos oxidativos, os quais são, em parte, responsáveis pelas principais injúrias moleculares que ocorrem a nível celular. Assim, pesquisas voltadas para a análise e triagem farmacológica de diferentes compostos com potencial antioxidante oferecerão apoio para estudos clínicos na busca de estratégias terapêuticas para tratar as diversas patologias humanas. Neste sentido, torna-se relevante avaliar o potencial antioxidante de novos compostos orgânicos, especialmente os organocalcogênios contendo o elemento Se. Por possuir propriedades benéficas diversas e ser amplamente reconhecido por suas propriedades farmacológicas, é relevante estudar a disponibilidade do Se, a interferência de grupos eletrofílicos e nucleofílicos, e a ação de outros grupos antioxidantes, como aminas, na atividade antioxidante de novos compostos orgânicos de Se. Neste sentido, estes fatores serão avaliados comparando a ação de diferentes β -selenoaminas à ação do $(\text{PhSe})_2$, composto orgânico de Se que contém dois átomos de Se em sua estrutura.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

A fim de obter informações sobre o potencial farmacológico de uma nova classe de compostos orgânicos de Se, o presente estudo investigou a atividade antioxidante de seis diferentes β -selenoaminas, observando e relacionando a influência de diferentes grupos substituintes nestas atividades, bem como comparando suas atividades com a do organocalcogênio (PhSe)₂.

3.2. Objetivos Específicos

1. Verificar o efeito das diferentes β -selenoaminas em reduzir o radical DPPH;
2. Verificar o efeito das β -selenoaminas na formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), induzidas por Fe₂SO₄ em cérebro de ratos;
3. Analisar a capacidade das β -selenoaminas de mimetizar a atividade da enzima GPx;
4. Testar a capacidade das β -selenoaminas em servir como substrato para a enzima TrxR, agindo como miméticos à selenoproteína Trx;
5. Correlacionar as atividades miméticas à GPx e Trx das diferentes β -selenoaminas com as suas possíveis atividades antioxidantes.

4. RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação são apresentados em duas partes.

Os resultados da parte I estão apresentados sob a forma de um artigo científico intitulado “Antioxidant activity of β -selenoamines and their capacity to mimic diferente enzymes”. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo, que está disposto da mesma forma que foi publicado na revista *Molecular and Cellular Biochemistry*.

Os resultados da Parte II são os dados não demonstrados no artigo científico. Assim, esta parte está dividida em Materiais e Métodos, ou seja, a metodologia utilizada na análise estatística das correlações realizadas entre os resultados do artigo científico, juntamente com os resultados obtidos para esse parâmetro.

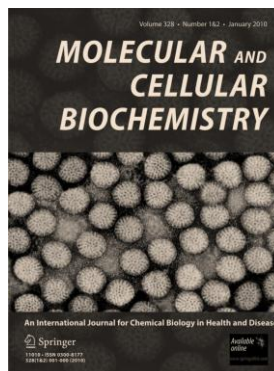
Parte I

4.1 Parte I: Artigo Científico

Atividade antioxidante de β -selenoaminas e suas capacidades de mimetizar diferentes enzimas

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF β -SELENOAMINES AND THEIR CAPACITY TO MIMC DIFFERENT ENZYMES

Alessandro de Souza Prestes · Sílvio Terra Stefanello · Syed M. Salman · Andréia Martini Pazini · Ricardo S. Schwab · Antônio Luiz Braga · Nilda B. V. Barbosa · João Batista T. da Rocha



Mol. Cell. Biochem. (2012) 365: 85-92

Antioxidant activity of β -selenoamines and their capacity to mimic different enzymes

Alessandro de Souza Prestes · Sílvia Terra Stefanello · Syed M. Salman ·
Andréia Martini Pazini · Ricardo S. Schwab · Antônio Luiz Braga ·
Nilda Berenice de Vargas Barbosa · João B. T. Rocha

Received: 1 November 2011 / Accepted: 14 January 2012 / Published online: 7 February 2012
© Springer Science+Business Media, LLC. 2012

Abstract The antioxidant properties of organoselenium compounds have been extensively investigated because oxidative stress is a hallmark of a variety of chronic human diseases. Here, we reported the influence of substituent groups in the antioxidant activity of β -selenoamines. We have investigated whether they exhibited glutathione peroxidase-like (GPx-like) activity and whether they could be substrate of thioredoxin reductase (TrxR). In the DPPH assay, the β -selenium amines did not exhibit antioxidant activity. However, the β -selenium amines with *p*-methoxy and tosyl groups prevented the lipid peroxidation. The β -selenium amine compound with *p*-methoxy substituent group exhibited thiol-peroxidase-like activity (GPx-like activity) and was reduced by the hepatic TrxR. These results contribute to understand the influence of structural alteration of non-conventional selenium compounds as synthetic mimetic of antioxidant enzymes of mammalian organisms.

Keywords Antioxidants · Enzymes · Selenoamines

Introduction

Free radicals are now accepted as mediators of a variety of physiological processes [1]. However, overproduction of

free radicals can cause tissue injury and can be involved in the installation and progression of a variety of degenerative diseases [2–4] and in other pathological conditions [5, 6]. In fact, free radicals can attack membrane lipids, proteins and nucleic acids, disrupting normal cell physiology [7]. Nevertheless, interventional or epidemiological studies have not indicated a protective role of the consumption of purified natural antioxidants (such as α -tocopherol and ascorbic acid) against the progression of neurological disorders [8–10]. On the other hand, regular intake of vegetables and fruits, which are rich in several antioxidants of different chemistry, can prevent or retard the installation of disorders associated with excessive production of free radicals and oxidative stress [11]. Of particular nutritional significance, some of these plants are rich in selenium, and their regular consumption can contribute to the adequate synthesis of antioxidant selenoenzymes, such as glutathione peroxidase (GPx) and thioredoxin reductase (TrxR) [12].

Ebselen, a seleno-organic compound, is known for its antioxidant and anti-inflammatory properties and different in vitro and in vivo models have indicated its neuroprotective effects [13–15]. Of particular therapeutic significance, ebselen was used with borderline efficacy in human trials associated with oxidative brain damage [16–18]. Since clinical investigations with ebselen were no longer performed, the design and synthesis of new organoselenium compounds with antioxidant properties have been exploited for the development of potential therapeutic agents [19] particularly because some of them can mimic physiological antioxidant activities [19–21].

Antioxidant properties of ebselen, diphenyl diselenide (PhSe)₂, and other organochalcogens have been linked mainly to their GPx- or thiol-peroxidase-like activity, i.e., these compounds can decompose peroxides using either reduced glutathione or other thiols as electron donors

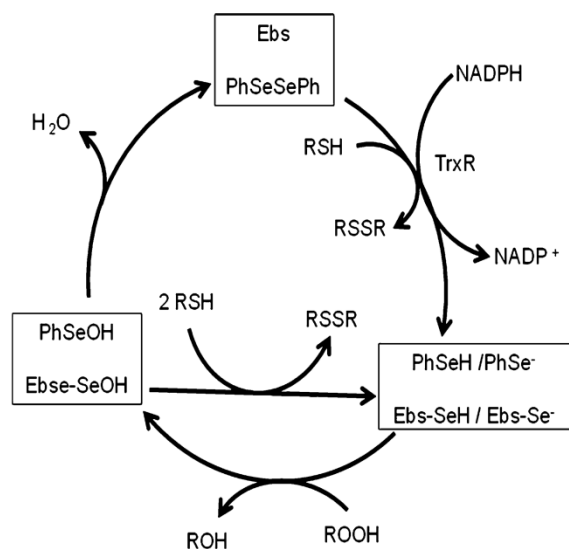
A. de Souza Prestes · S. T. Stefanello · A. M. Pazini ·
R. S. Schwab · A. L. Braga · N. B. de Vargas Barbosa ·
J. B. T. Rocha (✉)
Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e
Exatas, Universidade Federal de Santa Maria,
Santa Maria, RS CEP 97105-900, Brazil
e-mail: jbtrocha@yahoo.com.br

S. M. Salman
Islamia College University, KPK, Pakistan

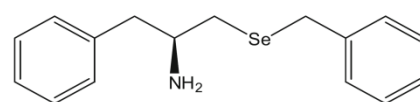
(Scheme 1) [19–22]. Recently, literature data have indicated that these compounds can be substrates of mammalian TrxR (Scheme 1) [22, 23], which can be an efficient route for selenol formation and, consequently, peroxide degradation (Scheme 1) [24, 25]. However, the exact contribution of each pathway for the antioxidant properties of different organochalcogens is still unknown [25]. Hypothetically, the operation of the two routes can be considered advantageous to the living cells, because the actual concentration of selenol is expected to be higher when the two pathways are active.

Mammalian TrxR isoforms have broad substrate specificity, reducing not only thioredoxins but also inorganic and organic selenium compounds, such as selenite [26], selenodiglutathione [27], selenocystine [28], ebselen, and $(\text{PhSe})_2$ [22, 23, 25]. Therefore, selenium compounds can be substrates of TrxR and the introduction of a substituent group in a non-substituted selenium molecule can modify its biochemical and pharmacological properties [29–32], including its interaction with thiols and its reduction by TrxR [23, 25].

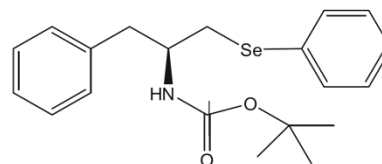
Taking this in account, the objective of this study was to evaluate the potential influence of different radical substituent on the antioxidant capacity of β -selenium amine compounds and how these substituent groups could



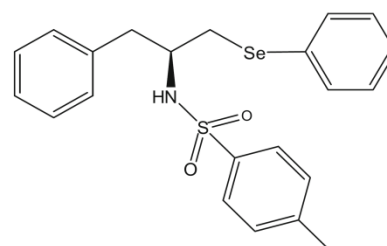
Scheme 1 Antioxidant pathways of diphenyl diselenide $(\text{PhSe})_2$ and ebselen (Ebs). The scheme shows the two pathways that can be involved in the formation of the powerful nucleophile and antioxidant selenol/selenolate intermediates of ebselen and diphenyl diselenide. The thiol-peroxidase-like activity pathway requires a direct interaction of thiol groups (RSH) with the organochalcogens (Ebs and PhSeSePh), resulting in the oxidation of RSH to its oxidized form (RSSR). The pathway catalyzed by TrxR uses the electrons from NADPH to reduce the organochalcogens



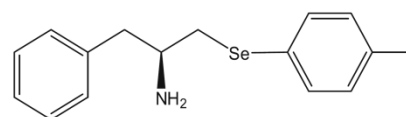
(*S*)-1-(benzylselenanyl)-3-phenylpropan-2-amine
(Compound 1)



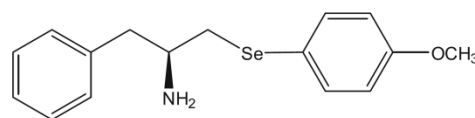
(*S*)-*tert*-butyl-1-phenyl-3-(phenylselenanyl)propan-2-ylcarbamate
(Compound 2)



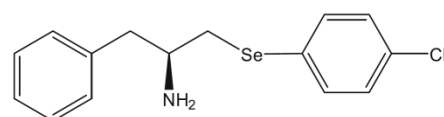
(*S*)-4-methyl-*N*-(1-phenyl-3-(phenylselenanyl)propan-2-yl)benzenesulfonamide
(Compound 3)



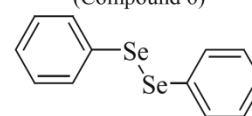
(*S*)-3-phenyl-1-(*p*-tolylselenanyl)propan-2-amine
(Compound 4)



(*S*)-1-(4-methoxyphenylselenanyl)-3-phenylpropan-2-amine
(Compound 5)



(*S*)-1-(4-chlorophenylselenanyl)-3-phenylpropan-2-amine
(Compound 6)



Diphenyl Diselenide

Fig. 1 Chemical structure and nomenclature of β -selenoamines and diphenyl diselenide

interfere with their potential GPx-like activity and whether or not this activity could be correlated with their capacity to be substrate of TrxR using in vitro models (Fig. 1).

Materials and methods

Animals

Adult male Wistar rats (250–350 g) from our own breeding colony were maintained in an air-conditioned room (22–25°C) under natural lighting conditions, with water and food ad libitum. Animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of this University.

Chemicals

Ethanol, acetic acid, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, hydrogen peroxide, iron sulfate (FeSO₄), and ascorbic acid were obtained from Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Dimethylsulfoxide (DMSO), Tris-HCl, thiobarbituric acid, diphenyl-2'-picrylhydrazyl (DPPH), sodium dodecyl sulfate (SDS), ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), and benzenothiol were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Compounds

β -selenoamines were prepared following the methodology described by Braga et al. [33] and Kumar and Engman [34]. The compounds tested were (*S*)-(benzylselenyl)-3-phenylpropan-2-amine (c1), (*S*)-*tert*-butyl-3-(phenylselenyl) propan-2-ylcarbamate (c2), (*S*)-4-methyl-*N*-(1-phenyl-3-(phenylselenyl) propan-2-yl) benzenesulfonamide (c3), (*S*)-3-phenyl-1-(*p*-tolylselenyl) propan-2-amine (c4), (*S*)-1-(4-methoxyphenylselenyl)-3-phenylpropan-2-amine (c5), and (*S*)-1-(4-chlorophenylselenyl)-3-phenylpropan-2-amine (c6) which were compared with a standard antioxidant, (PhSe)₂. (PhSe)₂ was included as a positive control because vast literature data have indicated that it has antioxidant and neuroprotective effects in different in vitro and in vivo models (for additional references, see [19, 21]).

Tissue preparation

Animals were killed by decapitation. Brains or livers were removed and placed in plaques on ice. The brains were homogenized in Tris-HCl 100 mM (10 volumes) and centrifuged for 10 min at 2,000 rpm. Supernatant fraction (S1) was collected immediately for thiobarbituric acid reactive species (TBARS) assay.

Partial purification of hepatic TrxR

The livers were homogenized in buffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄—pH 7.3; 9 volumes) and centrifuged at 13,000×g for 30 min/4°C. Supernatant fraction was collected for TrxR isolation and dialyzed against buffered saline for 24 h to remove endogenous low molecular weight thiols. The dialysate was heated at 55°C for 10 min, cooled, and centrifuged at 13,000×g for 30 min [35]. The supernatant was used for TrxR assay.

TBARS assay

Capacity to prevent the lipid peroxidation was determined by measuring TBARS as described by Ohkawa et al. [36] and Puntel et al. [37] with minor modifications. Aliquots of brain supernatants (100 μ L of S1) were incubated for 60 min with freshly prepared Fe₂SO₄ (10 μ M) in the absence or presence of different concentrations of β -selenoamines (at concentrations indicated in the legend of Fig. 2) in a medium containing Tris-HCl buffer 10 mM pH 7.4. The reaction was stopped by addition of SDS (final concentration of 1.35%) and lipid peroxidation products were measured by the addition of acetic acid/HCl buffer pH 3.4 and 0.2% TBA, pH 6. The color reaction was developed by incubating tubes in boiling water for 60 min. TBARS levels were measured at 532 nm.

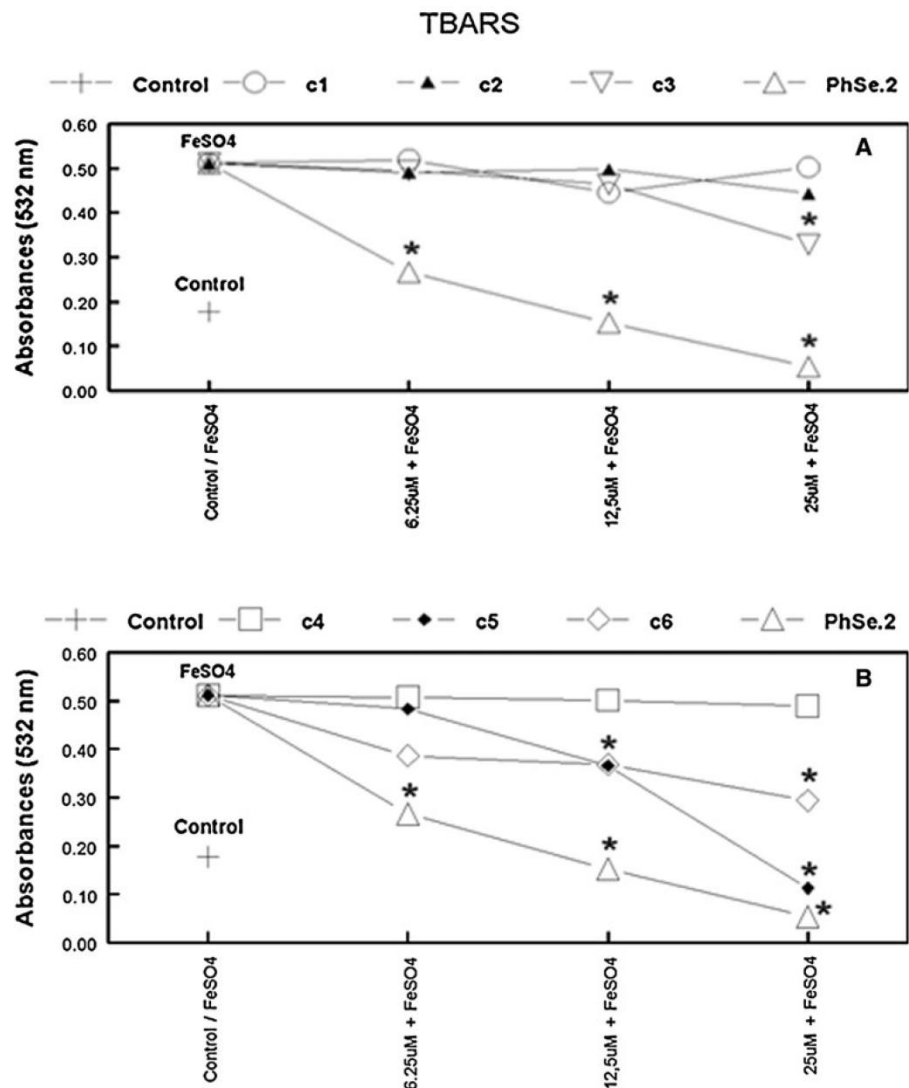
DPPH[•] radical scavenging method

The radical scavenging activities of the compounds were determined according to Brand-Williams et al. [38] with minor modifications. Each compound was tested at 400 μ M in 10% DMSO. Four different concentrations of ascorbic acid (12, 24, 42, and 60 μ M) were used as positive control. DPPH[•] (diluted in ethanol) was added to final concentration of 0.15 mM and allowed to react at room temperature for 30 min. Absorbances were measured at 540 nm (microplate reader Thermo Plate, TP-Reader).

Thiol-peroxidase-like activity assay

The catalytic activity of β -selenoamines as a GPx model enzyme was evaluated according to the Tomoda method [39] using 10 mM benzenethiol (PhSH) as substrate. The reduction of H₂O₂ was monitored at 305 nm for 165 s. β -selenoamines were tested at 200 and 400 μ M, and their activities were compared with the activity of 200 μ M (PhSe)₂ (positive control). Negative control was performed using DMSO (vehicle).

Fig. 2 Effect of β -selenoamines (c1–c6) and diphenyl diselenide (PhSe)₂ on TBARS production in brain of rats. All compounds were tested at final concentrations of 6.25, 12.5, and 25 μ M. Results are expressed using the absorbances, at 532 nm (for the sake of clarity SEM was not included and SEM values were <10% of the respective means), of 14 independent experiments. Panel **a, b** shows the results expressed by c1–3 and c4–6, respectively, and * p < 0.05 in comparison with FeSO₄ group by Duncan's multiple range test



NADPH oxidation by TrxR using β -selenoamines and (PhSe)₂ as substrate

The reduction of β -selenium amines (at 15 μ M) by rat hepatic TrxR was performed by a modification of the method described by Holmgren and Björnstedt [40]. Enzyme was mixed with a medium containing 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5 and then reaction was started by adding NADPH (final concentration 120 μ M) in the absence or presence of 1 μ M AuCl₃.

Statistical analysis

Individual dependent variable data were analyzed statistically by one-way (TBARS and DPPH levels) or two-way (thiol peroxidase and TrxR activity) analysis of variance

(ANOVA) followed by Duncan's multiple range test, when appropriate. Differences between groups were considered to be significant when p < 0.05.

Results

Effect of β -selenoamines and (PhSe)₂ against TBARS production in brain of rats

(PhSe)₂ (6.25, 12.5, and 25 μ M) blunted FeSO₄-induced TBARS production (Fig. 2). Similarly, β -selenium amines 3 and 6 (at 25 μ M) and 5 (at 12.5 or 25 μ M) inhibited Fe(II)-induced TBARS production. On the other hand, the β -selenium amines 1, 2, and 4 did not inhibit lipid peroxidation (Fig. 2).

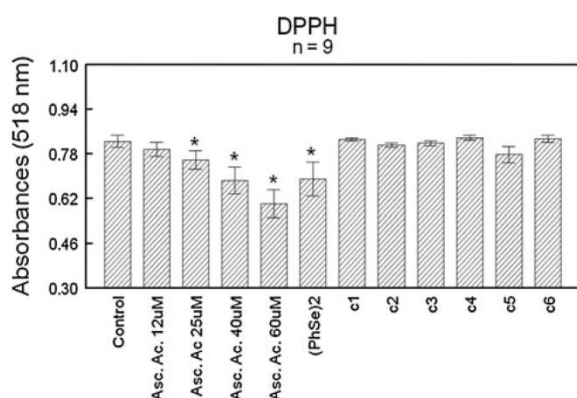


Fig. 3 Effect of β -selenoamines (c1–c6) and diphenyl diselenide ((PhSe)₂) on DPPH reduction using ascorbic acid as a standard antioxidant. β -selenoamines and diphenyl diselenide were tested at a final concentration of 400 μ M and the results are expressed as absorbances at 540 nm (mean \pm SE), with $n = 3$. Readings were performed 30 min after the end of the experiment. * $p < 0.05$ comparing with control by Duncan's multiple range test

Effect of β -selenoamines on DPPH[•] reduction

Ascorbic acid (25, 40, and 60 μ M) quenched DPPH[•] radical and only (PhSe)₂ 400 μ M caused a modest but

significant reduction in DPPH[•] color (Fig. 3). In contrast, β -selenoamines (c1–c6) did not scavenge DPPH[•] radical (Fig. 3).

Determination of thiol-peroxidase-like activity of β -selenoamines and (PhSe)₂

Beta-selenium amines 2 and 3 had no GPx-like activity, whereas β -selenium amine 6 exhibited negligible GPx-like activity (Fig. 4). On the other hand, at concentration of 400 μ M, c1, c4, and c5 were better mimetic of GPx than 200 μ M (PhSe)₂ (Fig. 4). At 200 μ M, c1 exhibited GPx-like activity comparable to (PhSe)₂, and at 200 μ M c5 was a better mimetic of GPx than (PhSe)₂ (Fig. 4).

NADPH oxidation by TrxR using β -selenoamines and (PhSe)₂ as substrate

In the presence of hepatic TrxR, (PhSe)₂ oxidized about 35% of NADPH after 5 min. In contrast, compounds 1 and 5 only marginally stimulated NADPH oxidation (about 10%). All the other compounds did not increase NADPH oxidation in the presence of rat hepatic TrxR (Fig. 5).

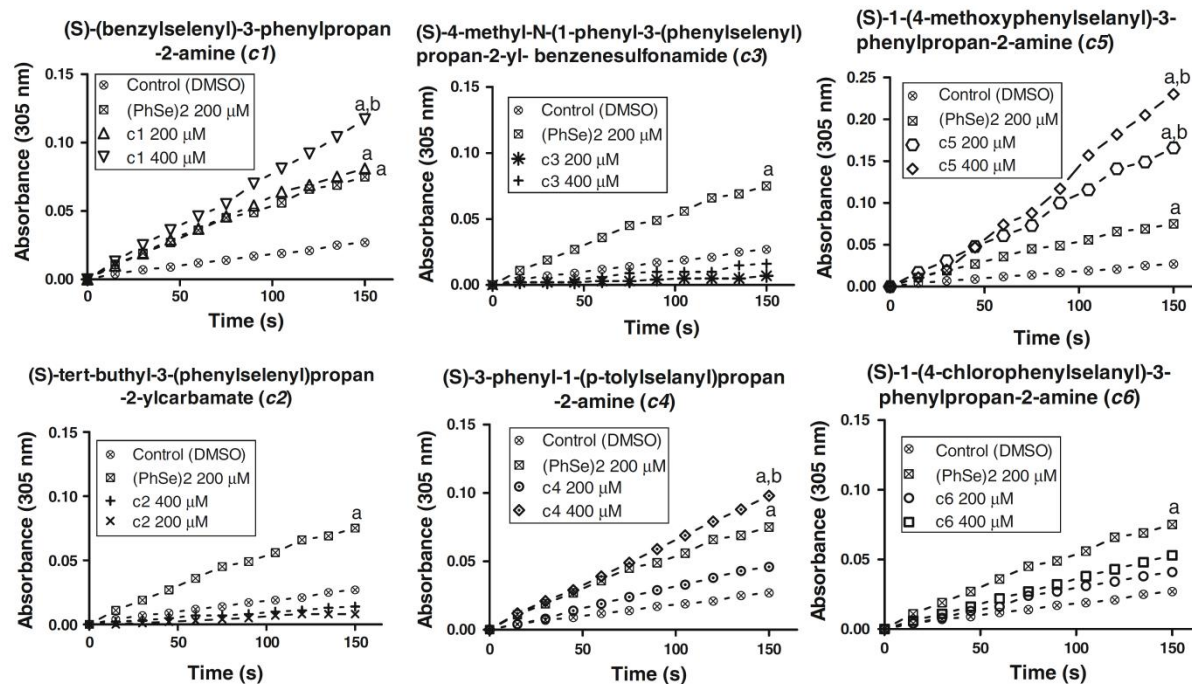


Fig. 4 Determination of thiol-peroxidase-like activity of β -selenoamines compared with (PhSe)₂ 200 μ M. β -selenoamines were tested at 200 and 400 μ M. Control was performed using DMSO (vehicle). Letters "a" and "b" mean significantly higher than control and

(PhSe)₂, respectively, by Duncan's multiple range test. Standard error values were omitted for the sake of clarity and they were $<5\%$ of the respective means for $n = 5$

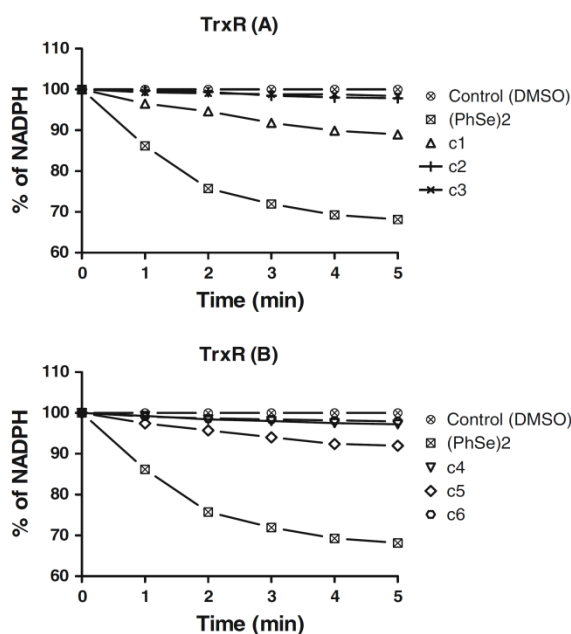


Fig. 5 Representative graph of NADPH oxidation by hepatic TrxR determined in the presence of 15 μ M β -selenoamines or 15 μ M (PhSe)₂ as substrate. Results are expressed using the percentage of NADPH oxidized during 5 min. The reduction of compounds by TrxR were compared with DMSO (vehicle) and (PhSe)₂ 15 μ M

Discussion

In this study, we have evaluated the influence of substituent groups in the antioxidant activity of selenium compounds and how these substituent groups could interfere with the GPx-like activity of β -selenium amines and whether or not their GPx-like activity could be correlated with their capacity to be reduced by hepatic TrxR. Compound c5 containing a free amine and the electron donating *p*-methoxy group, showed the highest antioxidant activity against Fe(II)-induced TBARS when compared to other β -selenium amines. The β -selenium amines without a substituent in the aromatic ring bound to Se atom (compounds 1–3) did not inhibit iron-induced TBARS formation. Compound 6, which has the electron withdrawing Cl as a substituent in the aromatic ring bound to Se atom, exhibited a modest antioxidant activity. Taken together, these results indicate that the antioxidant activity of these compounds cannot be explained only in terms of electronic effects, because compounds without a substituent had no activity and compounds 5 and 6, which have substituent groups with opposite electronic inductive effects inhibited lipid peroxidation.

The GPx-like activity of β -selenium amines was determined and compounds 4 and 5, with electron donating methyl and methoxy groups bound to the aromatic ring

bound to Se atom, exhibited good thiol-peroxidase-like activity. Indeed, compounds 4 and 5 reduced H₂O₂ with a similar potency to (PhSe)₂. Similarly, compound 1 (which has no substituent on the aromatic ring bound to Se) exhibited a thiol-peroxidase-like activity equivalent to that of (PhSe)₂. In contrast, the compound 6, which has an electron withdrawing group, exhibited only a weak thiol-peroxidase-like activity. The β -selenoamines containing blocked amine groups (compounds 2 and 3) did not exhibit thiol-peroxidase-like activity; indicating a critical role for the –NH₂ in the thiol-peroxidase-like activity of selenoamines. Accordingly, it can be suggested that GPx-like activity of β -selenium amines is enhanced by electron donating groups at *para* position in relation to selenium. In contrast, the activity is reduced by the presence of electron withdrawing groups at the same position.

In accordance with previous data from our group [23], (PhSe)₂ was reduced by hepatic TrxR; whereas β -selenium amines 1 and 5 were weakly reduced by TrxR. Consequently, the main pathway for the antioxidant activity of β -selenium amines can be associated with the thiol-peroxidase-like activity pathway and not with their reduction via TrxR (Scheme 1). This can be considered a disadvantage of this class of monoselenide molecules, when compared to diselenides because restricts the antioxidant activity of β -selenium amines to a single pathway.

One point that can explain some unexpected effects observed here is the fact that some of the assays were performed in the absence of tissue. For instance, in the DPPH assay all the tested compounds have negligible antioxidant properties, which reinforce the fact that metabolism and/or interaction with thiols are required for the action of these antioxidants. On the other hand, some compounds exhibited Gpx-like and TrxR activities, indicating that these could be their mechanisms of action, and not by radical scavenger activity.

The results presented indicated the β -selenium amines compounds can have interesting antioxidant properties. Particularly, compound 5, which had a methoxy substituent in the aromatic ring bound to Se. Indeed, compound 5 exhibited antioxidant activities in three different assays (TBARS, thiol-peroxidase-like activity, and as a substrate of TrxR). The analog compound 1 without a substituent in the aromatic ring bound to Se had thiol-peroxidase-like activity and was a weak substrate of TrxR. In contrast, the compounds containing a blocking group bound to the amino group (compounds 2 and 3) did not exhibit antioxidant properties, indicating an important role of the free amino group in the antioxidant properties of β -selenoamines. Taken together, these results indicate that β -selenoamines 1 and 5 should be studied in more complex and physiologically relevant *in vitro* systems, including brain and liver slices and mitochondrial preparations

[15, 24, 41, 42] in order to confirm their potential antioxidant activity and to determine whether or not they should be tested in in vivo models of diseases associated with oxidative stress.

Acknowledgments This study was supported by the CNPq, INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection, IBNet-FINEP, CAPES, FAPERGS-PRONEX, and VITAE Foundation, Brazil.

Conflict of interest The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47–95
2. Beal MF (1996) Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol* 6:661–666
3. Simonian NA, Coyle JT (1996) Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 36:83–106
4. Farina M, Rocha JTB, Aschner M (2011) Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. *Life Sci* 89:555–563
5. Ji XY, Tan BKH, Zhu YC, Linz W, Zhu YZ (2003) Comparison of cardioprotective effects using ramipril and Dan Shen for the treatment of acute myocardial infarction in rats. *Life Sci* 73:1413–1426
6. Sun J, Huang SH, Zhu YC, Whiteman M, Wang MJ, Tan BK, Zhu YZ (2005) Anti-oxidative stress effects of *Herbaleonuri* on ischemic rat hearts. *Life Sci* 76:3043–3056
7. Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609–1623
8. Kieburz K, McDermott M, Como P, Growdon J, Brady J, Carter J, Huber S, Kanigan B, Landow E, Rudolph A (1994) The effect of deprenyl and tocopherol on cognitive performance in early untreated Parkinson's disease. *Neurology* 44:1756–1759
9. The Parkinson Study Group (1993) Effects of α -tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. *N Engl J Med* 328:176–183
10. The Parkinson Study Group (1996) Impact of deprenyl and tocopherol treatment on Parkinson's disease in DATATOP patients requiring levodopa. *Ann Neurol* 139:37–45
11. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerate diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7915–7922
12. Pyrzyńska K (2009) Selenium speciation in enriched vegetables. *Food Chem* 114(4):1183–1191
13. Farina M, Dahm KC, Schwalm FD, Brusque AM, Frizzo ME, Zeni G, Souza DO, Rocha JBT (2003) Methylmercury increases glutamate release from brain synaptosomes and glutamate uptake by cortical slices from suckling rat pups: modulatory effect of ebselen. *Toxicol Sci* 73:135–140
14. Yamagata K, Ichinose S, Miyashita A, Tagami M (2008) Protective effects of ebselen, a seleno-organic antioxidant on neurodegeneration induced by hypoxia and reperfusion in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Neuroscience* 153:428–435
15. Roos DH, Puntel RL, Santos MM, Souza DO, Farina M, Nogueira CW, Aschner M, Burger ME, Barbosa NB, Rocha JB (2009) Guanosine and synthetic organoselenium compounds modulate methylmercury-induced oxidative stress in rat brain cortical slices: involvement of oxidative stress and glutamatergic system. *Toxicol In Vitro* 23:302–307
16. Yamaguchi T, Sano K, Takakura K, Saito I, Shinohara Y, Asano T, Yasuhara H (1998) Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Ebselen Study Group. Stroke* 29:12–17
17. Saito I, Asano T, Sano K, Takakura K, Abe H, Yoshimoto T, Kikuchi H, Ishibashi S (1998) Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 42:269–277
18. Ogawa A, Yoshimoto T, Kikuchi H, Sano K, Saito I, Yamaguchi T, Yasuhara H (1999) Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Cereb Dis* 9:112–118
19. Nogueira CW, Rocha JBT (2010) Diphenyl diselenide a janus-faced molecule. *J Braz Chem Soc* 21:2055–2071
20. Wilson SR, Zucker PA, Huang RRC, Spector A (1989) Development of synthetic compounds with glutathione-peroxidase activity. *J Am Chem Soc* 111:5936–5939
21. Nogueira CW, Rocha JBT (2011) Toxicology and pharmacology of selenium: Emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol* 85:1313–1359
22. Zhao R, Holmgren A (2002) A novel antioxidant mechanism of ebselen involving ebselen diselenide, a substrate of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 277:39456–39462
23. Freitas AS, Prestes AS, Wagner C, Sudati JH, Alves D, Porciúncula LO, Kade IJ, Rocha JBT (2010) Reduction of diphenyl diselenide and analogs by mammalian thioredoxin reductase is independent of their glutathione peroxidase-like activity: a possible novel pathway for their antioxidant activity. *Molecules* 15:7699–7714
24. Posser T, Franco JL, dos Santos DA, Rigon AP, Farina M, Dafré AL, Rocha JBT, Leal RB (2008) Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. *Brain Res* 1199:138–147
25. Freitas AS, Rocha JBT (2011) Diphenyl diselenide and analogs are substrates of cerebral rat thioredoxin reductase: a pathway for their neuroprotective effects. *Neurosci Lett* 503:1–5
26. Kumar S, Björnstedt M, Holmgren A (1992) Selenite is a substrate for calf thymus thioredoxin reductase and thioredoxin and elicits a large non-stoichiometric oxidation of NADPH in the presence of oxygen. *Eur J Biochem* 207:435–439
27. Björnstedt M, Kumar S, Holmgren A (1992) Selenodiglutathione is a highly efficient oxidant of reduced thioredoxin and a substrate for mammalian thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 267:8030–8034
28. Björnstedt M, Kumar S, Bjorkhem L, Spyrou G, Holmgren A (1997) Selenium and the thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biomed Environ Sci* 10:271–279
29. Nogueira CW, Meotti FC, Curte E, Pilissão C, Zeni G, Rocha JBT (2003) Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology* 183:29–37
30. Kade IJ, Paixão MW, Rodrigues OED, Barbosa NBV, Braga AL, Ávila DS, Nogueira CW, Rocha JBT (2008) Comparative studies on dicholesteroyl diselenide and diphenyl diselenide as antioxidant agents and their effect on the activities of Na^+/K^+ ATPase and δ -aminolevulinic acid dehydratase in the rat brain. *Neurochem Res* 33:167–178
31. Kade IJ, Rocha JBT (2010) Comparative study on the influence of subcutaneous administration of diphenyl and dicholesteroyl diselenides on sulfhydryl proteins and antioxidant parameters in mice. *J Appl Toxicol* 30:688–693
32. Alberto EE, Soares LC, Sudati JH, Borges ACA, Rocha JBT, Braga AL (2009) Efficient synthesis of modular amino acid derivatives containing selenium with pronounced GPx-like activity. *Eur J Org Chem* 25:4211–4214

33. Braga AL, Schwab RS, Alberto EE, Salman SM, Vargas J, Azeredo JB (2009) Ring opening of unprotected aziridines by zinc selenolates in a biphasic system. *Tetrahedron Lett* 50:2309–2311
34. Kumar S, Engman L (2006) Microwave-assisted copper-catalyzed preparation of diaryl chalcogenides. *J Org Chem* 71:5400–5403
35. Wagner C, Sudati JH, Nogueira CW, Rocha JBT (2010) In vivo and in vitro inhibition of mice thioredoxin reductase by methylmercury. *Biometals* 23:1171–1177
36. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358
37. Puntel RL, Roos DH, Grotto D, Garcia SC, Nogueira CW, Rocha JB (2007) Antioxidant properties of Krebs cycle intermediates against malonate pro-oxidant activity in vitro: a comparative study using the colorimetric method and HPLC analysis to determine malondialdehyde in rat brain homogenates. *Life Sci* 81:51–62
38. Brand-Williams W, Cuvelier MC, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT* 28:25–30
39. Iwaoka M, Tomoda S (1994) A model study on the effect of an amino group on the antioxidant activity of glutathione peroxidase. *J Am Chem Soc* 116:2557–2561
40. Holmgren A, Björnstedt M (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 252:199–208
41. Roos DH, Puntel RL, Farina M, Aschner M, Bohrer D, Rocha JB, Barbosa NBV (2011) Modulation of methylmercury uptake by methionine: prevention of mitochondrial dysfunction in rat liver slices by a mimicry mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol* 252:28–35
42. Wagner C, Vargas AP, Roos DH, Morel AF, Farina M, Nogueira CW, Aschner M, Rocha JB (2010) Comparative study of quercetin and its two glycoside derivatives quercitrin and rutin against methylmercury (MeHg)-induced ROS production in rat brain slices. *Arch Toxicol* 84:89–97

Parte II

4.2. Parte II: Resultados Complementares

4.2.1. Materiais e Métodos:

4.2.1.1. Análise estatística

A correlação entre as atividades tiol peroxidase e TrxR foram analisadas por coeficiente não paramétrico de Spearman, e foi considerado significativo o $p < 0,01$. As variáveis dependentes foram analisadas estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de uma via utilizando teste de Duncan, quando apropriado. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.2.2. Resultados

4.2.2.1. Correlação entre as atividades tiol peroxidase-like das β -selenoaminas e suas capacidades de redução pela TrxR

A figura 1(quadro A) mostra que existiu uma correlação positiva entre a redução das β -selenoaminas pela TrxR isolada de mamífero e a atividade mimética a GPx destes compostos ($r = 0.8082$ and $p = 0.0059$) (Fig. 1, quadro A). Contudo, esta correlação não foi observada quando a atividade do $(\text{PhSe})_2$ foi considerada ($r = 1,149$ e $p = 0,4115$). As correlações entre a redução das β -selenoaminas pela TrxR ou entre as atividades miméticas a GPx e as capacidades de reduzir o radical DPPH não foram significativas (Fig. 2, A e B).

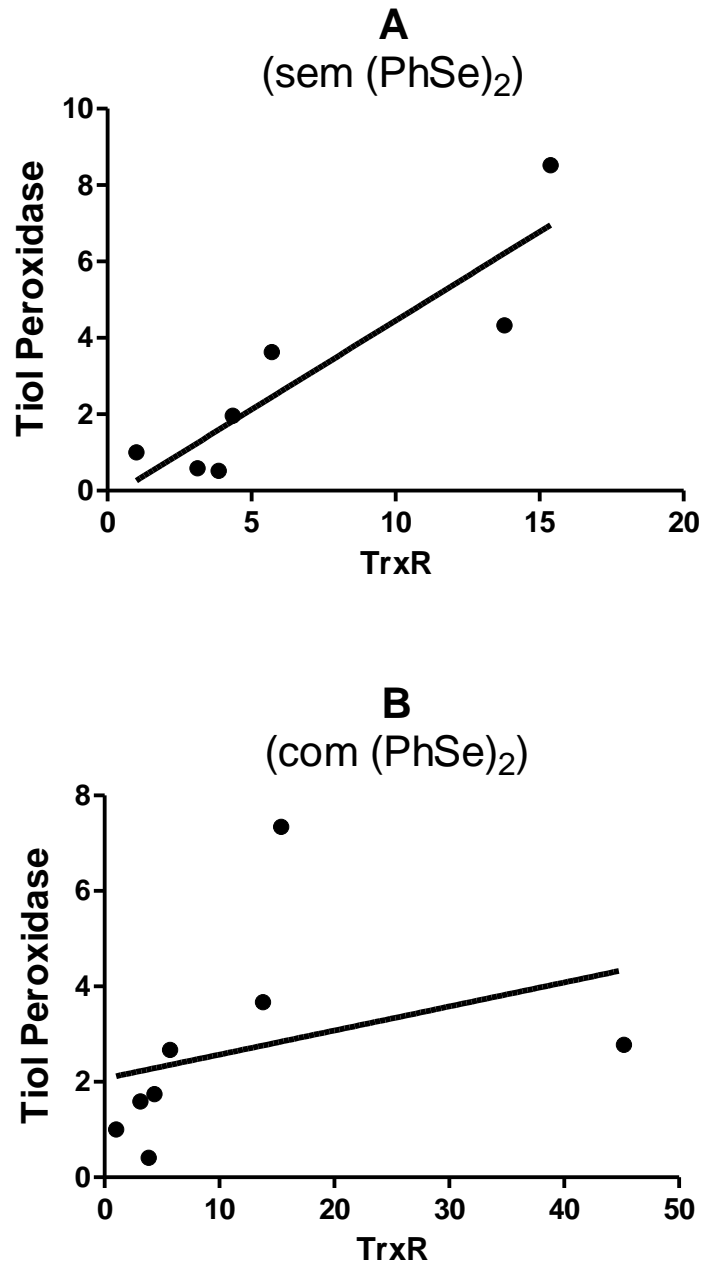


Figura 1: Correlação entre as atividades miméticas à GPx (TioI Peroxidase) das β -selenoaminas e suas reduções pela TrxR de mamíferos (TrxR): desconsiderando os resultados com o $(\text{PhSe})_2$ (A) e os considerando (B). Os valores de p e r foram calculados considerando as atividades relativas do controle, $(\text{PhSe})_2$ e β -selenoaminas de cada experimento.

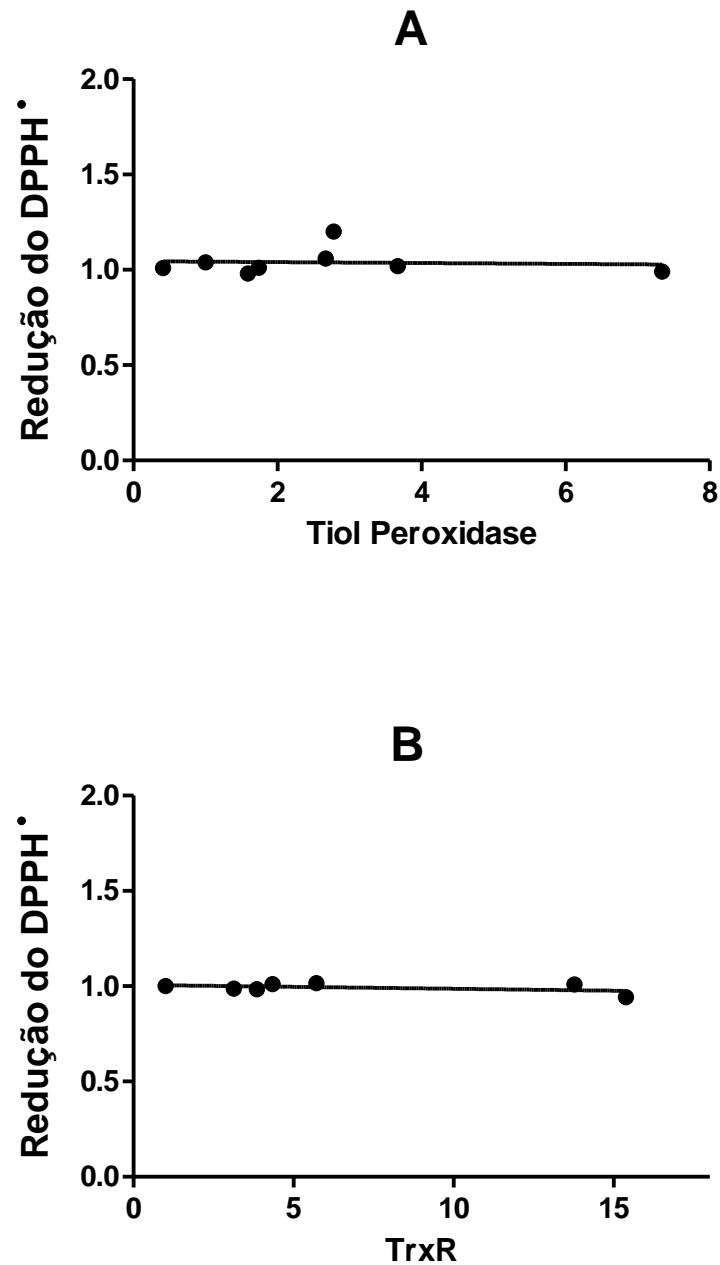


Figura 2: Correlação entre a capacidade de redução do radical DPPH[•] das β -selenoaminas e suas atividades miméticas à GPx (A) e à proteína Trx de mamíferos, servindo de substrato para a enzima TrxR isolada do fígado de ratos (B) ambos desconsiderando os resultados com o $(\text{PhSe})_2$. Assim, os valores de p e r foram calculados considerando apenas as atividades relativas ao controle e às β -selenoaminas de cada experimento.

6. DISCUSSÃO

Compostos antioxidantes que não são comumente testados em sistemas biológicos, como alguns fenóis e aminas (primárias e secundárias), agem usualmente por transferência de cadeias (Gugumus, 1990). A primeira etapa da reação com este tipo de substância é a transferência de um átomo de hidrogênio de uma molécula antioxidante para um radical intermediário reativo. Neste estudo, avaliamos a influência de radicais substituintes sobre a propriedade antioxidante de compostos de selênio contendo um grupamento amina (β -selenoaminas); e se estes radicais poderiam interferir na atividade mimética destes compostos à enzima GPx. Além disso, foi avaliado se estas atividades poderiam estar correlacionadas com a capacidade dos compostos de servirem como substrato para a TrxR, usando modelos *in vitro*.

Com relação à proteção contra a produção de TBARS induzida por Fe(II), o composto c5, contendo uma amina livre e um grupo *p*-metóxi em sua estrutura, apresentou uma maior atividade quando comparado às outras β -selenoaminas. De fato, os grupos metóxi em posição *para* estabilizam o produto formado por ressonância (Barreiros e cols., 2006). Contudo, os compostos c3, contendo um grupo *tosil* protegendo a amina e sem outros radicais, e c6, contendo um átomo eletrofílico (Cl) na posição *para* com relação ao átomo de selênio, preveniu a peroxidação lipídica apenas na maior concentração testada.

As β -selenoaminas não reduziram o radical DPPH[•], não demonstrando, assim, atividade antioxidante direta. Por outro lado, o (PhSe)₂ causou uma redução significativa do radical. De tal modo, podemos observar a importância da disponibilidade do Se sobre as propriedades antioxidantes destes organocalcogênios, especialmente pelo fato do (PhSe)₂ conter dois átomos de Se em sua estrutura (Figura 1), enquanto as β -selenoaminas apresentam apenas um (Nogueira e cols., 2004). Além disso, as capacidades antioxidantes não se correlacionaram com as outras atividades (dado não apresentado).

A possível atividade mimética à GPx das β -selenoaminas, utilizando H₂O₂ como substrato e PhSH como co-substrato doador de tiol, foi analisado. O (PhSe)₂, descrito na literatura como catalisador da decomposição de H₂O₂ (Iwaoka e Tomoda, 1994), foi usado como um controle positivo. Com relação a este parâmetro, c5, com um grupo nucleofílico, apresentou a maior atividade, reduzindo o substrato mais do

que o controle positivo em ambas as concentrações testadas. Contudo, todas as β -selenoaminas contendo o grupamento amina livre (com exceção do c6, com um radical eletrofílico), apresentaram moderada ou boa atividade catalítica na redução do H_2O_2 . Assim, pode-se sugerir que as atividades miméticas à GPx das β -selenoaminas é aumentada por grupos nucleofílicos na posição *para* ao selênio, e isto vai de acordo com dados prévios sobre a estabilidade de compostos de Se com semelhança estrutural (Barreiros e cols., 2006). Em contraste, esta atividade é reduzida pela presença de grupos eletrofílicos na mesma posição.

Outra observação feita foi da habilidade dos compostos em oxidar o NADPH e se reduzir por ação da TrxR. Neste trabalho apresentou-se um gráfico representativo com a capacidade de oxidar o NADPH. Semelhantemente a atividade mimética à GPx, observou-se que o Se parece ser também essencial para a oxidação do NADPH pela TrxR de mamíferos. A mesma observação foi feita por Freitas e Rocha, em 2011 (Freitas e Rocha, 2011). Além disso, uma correlação positiva foi observada entre a redução das β -selenoaminas pela TrxR e a suas atividades miméticas à GPx. Contudo, esta relação não foi observada quando os resultados apresentados pelo $(PhSe)_2$ foram considerados indicando, provavelmente, que a ação das β -selenoaminas sobre as duas enzimas podem estar ocorrendo por um agente comum a estes compostos.

Esses resultados fornecem evidências adicionais sobre a importância do Se nas propriedades antioxidantes de várias enzimas e compostos contendo Se em sua estrutura (Nogueira e cols., 2004). Além disso, observa-se que a presença do grupamento amina afeta estes parâmetros. Contudo, uma das principais constatações obtidas neste trabalho refere-se à influência que os radicais nucleofílicos (como o grupo *p*-metóxi, presente no c5) podem exercer sobre a atividade de compostos orgânicos de Se contendo aminas.

Além da ação de grupos nucleofílicos e eletrofílicos sobre a ação enzimática de novos compostos de Se, e observando os resultados expostos por Freitas e cols. em 2010 (Freitas e cols, 2010), conclui-se que a relação entre as atividades dos compostos de Se sobre as enzimas GPx e TrxR é de grande importância no que diz respeito ao mecanismo de ação destes compostos. De forma geral os resultados preliminares obtidos *in vitro* aqui podem servir de base para a escolha de compostos que sejam promissores farmacologicamente. Assim, investigações *in vivo*, especialmente utilizando o composto c5, são de crucial importância para determinar

o efeito real desta β -selenoamina sobre diferentes atividades enzimáticas após metabolização, bem como sua possível toxicidade, aguda ou crônica, em um sistema biológico.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- A disponibilidade do Se é essencial para as propriedades antioxidantes indiretas dos compostos orgânicos de Se, ou seja, a capacidade destes compostos exercerem efeitos sobre diferentes enzimas diminui conforme a blindagem do Se por grupamentos adjacentes volumosos;
- O grupamento amina aparentemente influencia nas propriedades antioxidantes dos compostos orgânicos de Se;
- Apesar da maioria das β -selenoaminas possuir capacidade antioxidante como mimética a proteínas endógenas, nenhuma delas é capaz de reduzir diretamente o radical livre DPPH[•] de maneira comparável ao antioxidante AA;
- Somente as β -selenoaminas com grupo *p*-metóxi e *tosil* na estrutura são capazes de prevenir a peroxidação lipídica induzida por Fe₂SO₄ em cérebro de ratos *in vitro*.
- Além de prevenir a peroxidação lipídica, a β -selenoamina contendo o grupo *p*-metóxina estrutura também foi capaz de mimetizar a atividade da enzima GPx e de servir como substrato para a TrxR hepática;
- A atividade mimética à enzima GPx foi maior nos compostos contendo um radical ou grupamento nucleofílico em posição *para* com relação ao Se nas β -selenoaminas;
- Uma correlação positiva foi observada entre as atividades miméticas à GPx e as capacidades de servir como substrato para a enzima TrxR hepática apenas quando são considerados os resultados das β -selenoaminas.

8. PERSPECTIVAS

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

- Investigar o possível efeito toxicológico das β -selenoaminas, realizando ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade de testes *in vitro*;
- Realizar o tratamento de diferentes modelos animais para avaliar a ação *in vivo*, pós-metabolização, das β -selenoaminas aqui estudadas;
- Realizar a análise molecular da expressão gênica de enzimas antioxidantes;
- Analisar o efeito das β -selenoaminas frente a diferentes parâmetros de disfunção mitocondrial.
- Avaliar o potencial antioxidante do c5, notado como a β -selenoamina mais promissora, frente a parâmetros oxidativos não considerados nesta pesquisa, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*.

9. REFERÊNCIAS

ALAEJOS, M. S.; ROMERO, F. D.; ROMERO, C. D. Selenium and cancer: some nutritional aspects. **Nutrition**, v. 16, p. 376-383, 2000.

AL-SALEH. Selenium status in Saudi Arabia. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 14, p. 154-160, 2000.

BARBOSA, N. B. V.; ROCHA, J. B. T. SOARES, J. C. M.; WONDRACEK, D. C.; GONÇALVES, J. F.; SCHETINGER, M. R. C.; NOGUEIRA, C. W. Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ-induced toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 186-194, 2008.

BARREIROS, L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, 2006.

BORGES, L. P.; BOEGES, V. C.; MORO, A. V.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B.; ZENI, G. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology** 210, 1-8, 2005.

BORGES, L. P.; NOGUEIRA, C. W.; PANATIERI, R. B.; ROCHA, J. B. ZENI, G. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 99-107, 2006.

BRENNEISEN, P.; STEINBRENNER, H.; SIES, H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 256-267, 2005.

BURGER, M.; FACHINETO, R.; CALEGARI, L.; PAIXÃO, M. W.; BRAGA, A. L.; ROCHA, J. B. Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. **Brain Research Bulletin**, v. 64, p. 339-345, 2004.

CADENAS, S.; ROJAS, C.; PÉREZ-CAMPO, R.; LÓPEZ-TORRES, M.; BARJA, G. Vitamin E protects guinea pig liver from lipid peroxidation without depressing levels of antioxidants. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 27, p. 1175-1181, 1995.

DAVIES, K.J.A. Oxidative damage and repair: Chemical, biological and medical aspects. **Oxford: Pergamon** p.910, 1991.

DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Free radicals and neuronal cell death. **Cell Death & Differentiation**, v. 3, p. 71-78, 1996.

FANG, J.; ZHONG, L.; ZHAO, R.; HOLMGREN, A. Ebselen: A thioredoxin reductase-dependent catalyst for α -tocopherol quinone reduction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.207, p. 103-109, 2005.

FREITAS Reduction of Diphenyl Diselenide and Analogs by Mammalian Thioredoxin Reductase Is Independent of Their Glutathione Peroxidase-Like Activity: A Possible Novel Pathway for Their Antioxidant Activity

FREITAS, A. S.; PRESTES, A. S.; WAGNER, C.; SUDATI, J. H.; ALVES, D.; PORCIÚNCULA, L. O.; KADE, I. J.; ROCHA, J. B. T. Reduction of Diphenyl Diselenide and Analogs by Mammalian Thioredoxin Reductase Is Independent of Their Gluthathione Peroxidase-Like Activity: A Possible Novel Pathway for Their Antioxidant Activity. **Molecules**, v. 15, p. 7699-7714, 2010.

FREITAS, A. S.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide and analogs are substrates of cerebral rat thioredoxin reductase: A pathway for their neuroprotective effects. **Neuroscience Letters**, v. 503, p. 1-5, 2011.

FREITAS, M. L.; SILVA, A. R. H.; ROMAN, S. S.; BRANDÃO, R. Effects of 4,4'-dichloro-diphenyl diselenide (CIPhSe)₂ on toxicity induced by mercuric chloride in mice: A comparative study with diphenyl diselenide (PhSe)₂. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, p. 985-994, 2012.

GRAF, E.; MAHONEY, J.R.; BRYANT, R.G.; EATON, J.W. Iron catalyzed hydroxyl radical formation: Stringent requirement for free iron coordination site. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 3620-3624, 1984.

GUGUMUS F. Oxidation inhibition in organic materials, v. 1. **CRC Press**, Boca Raton, 1990.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, p. 1609-1623, 1992.

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

HASSAN, W.; IBRAHIM, M.; ROCHA, J. B. T. Towards the mechanism and comparative effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen under various pathophysiological conditions in rat's kidney preparation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 182, p. 52-58, 2009.

HOCMAN, G. Chemoprevention of câncer: Selenium. **International Journal of Biochemistry**, v. 20, p. 123-132, 1988.

HODAGE, A. S.; PRABHU, C. P.; PHADNIS, P. P.; WADAWALE, A.; PRIYADARSINI, K. I.; JAIN, V. K. Synthesis, characterization, structures and GPx mimicking activity of pyridyl and pyrimidyl based organoselenium compounds. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 720, p. 19-25, 2012.

HOLLEY, A.E.; CHEESEMAN, K.H. Measuring free radicals reactions in vivo. **British Medical Buletin**, v. 49, p. 494-505, 1993.

HOPPS, E.; NOTO, D.; CAIMI, G.; AVERNA, M. R. A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, p. 72-77, 2010.

HU, M.L.; CHEN, Y.K.; LIN, Y.F. The antioxidant and prooxidant activity of some B vitamins and vitamin-like compounds. **Chemico-Biological Interactions**, v. 97, p. 63-73, 1995.

IWAOKA, M.; TOMODA, S. A model study on the effect of an amino group on the antioxidant activity of glutathione peroxidase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, p. 2557–2561, 1994.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, p. 515-540, 1990.

JOSEPHY, P.D. Glutamate receptors in cortical plasticity: molecular and cellular biology. **Molecular Toxicology**. **Oxford University Press**, New York, 1997.

JOZSEF, L.; FILEP, J. G. Selenium-containing compounds attenuate peroxynitrite-mediated NF-kappaB and AP-1 activation and interleukin-8 gene and protein expression in human leukocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 1018-1027, 2003.

KAVLAK, G.; GRAEDEL, T.E. Global anthropogenic selenium cycles for 1940–2010. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 73, p. 17–22, 2013.

KIELISZEK, M.; BŁAŻELAK, S. Selenium: significance, and outlook for supplementation. **Nutrition**. 2013. No prelo.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p. 293 – 303, 2001.

LU, J.; BERNDT, C.; HOLMGREN, A. Metabolism of selenium compounds catalyzed by the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects**, v. 1790, p. 1513-1519, 2009.

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

MUSTACICH, D; POWIS, G. Thioredoxin reductase. **Biochemical Journal**, v. 346, p. 1–8, 2000.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Food Science & Nutrition**, v. 29, p. 273-300, 1990.

NÈVE, J. Human Selenium Supplementation as Assessed by Changes in Blood Selenium Concentration and Glutathione Peroxidase Activity. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 9, p. 65-73, 1995.

NIKI, E. Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? **FEBS Letters**, v. 586, p. 3767-3770, 2012.

NOGUEIRA, C. W., ROCHA, J. B. T., Diphenyl Diselenide a Janus-Faced Molecule, **Jornal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 2055-2071, 2010.

NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 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. **Cerebrovascular Diseases**, v. 9, p. 112-118, 1999.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

PARNHAN, M. J.; GRAF, E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. **Progress in Drug Research**, v. 36, p. 10-47, 1991.

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANG, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Resistance Updates**, v. 7, p. 97-110, 2004.

PORCIUNCULA, L. O; ROCHA, J. B.; CIMAROSTI, H. VINADE, L.; GHISLENI, G.; SALBEGO, C.G.; SOUZA, D. O. Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immunoccontent of inducible nitric oxide synthase. **Neuroscience Letters**, v. 346, p. 101-104, 2003.

PUNTEL, R. L.; ROOS, D. H.; SEEGER, R. L.; ROCHA, J. B. T. Mitochondrial electron transfer chain complexes inhibition by different organochalcogens. **Toxicology in Vitro**, v. 27, 59-70, 2013.

ROOS, D. H.; SEEGER, R. L.; PUNTEL, R. L.; VARGAS, N. B. B. . Role of calcium and mitochondria in MeHg-mediated cytotoxicity. **Journal of Biomedicine and Biotechnology** (Print), v. 2012, p. 1-15, 2012.

SAITO, I.; ASANO, T.; SANO, K.; TAKAKURA, K.; ABE, H.; YOSHIMOTO, T.; KIKUCHI, H.; OHTA, T.; ISHIBASHI, S. Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, delayed urological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Neurosurgery**, v. 42, p. 269-277, 1998.

SCHEWE, T. Molecular actions of Ebselen - an antiinflammatory antioxidant. **General Pharmacology**, v. 26, p. 1153-1169, 1995.

SIES, H. Strategies of antioxidants defenses. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SINGH, B. G. ; BAG, P. P.; KUMAKURA, F.; IWAOKA, M.; PRIYADARSINI, K. I. Role of Substrate Reactivity in the Glutathione Peroxidase (GPx) Activity of Selenocystine. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 83, p. 703-708, 2010.

SLATER, T.F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 283-293, 1984.

STRALIOTTO, M. R.; OLIVEIRA, J.; MANCINI, G.; BAINY, A. C. D.; LATINI, A.; DEOBALD, A. M.; ROCHA, J. B. T.; DE BEM, A. F. Disubstituted diaryl diselenides as potential atheroprotective compounds: Involvement of TrxR and GPx-like systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p.717–725, 2013.

TALAULIKAR, V. S.; MANYONDA, I. T. Vitamin C as an antioxidant supplement in women's health: a myth in need of urgent burial. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 157, p. 10-13, 2011.

WILSON S. R. N.; ZUCKER, P. A.; HUANG, R. R. C.; SPECTOR, A. Development of Synthetic Compounds with Glutathione. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, p. 5936-5939, 1989.

YAGAMATA, K.; ICHINOSE, S.; MIYASHITA, A.; TAGAMI, M. Protective Effects of ebselen, A Seleno-Organic Antioxidant on neurodegeneration induced by hypoxia and reperfusion in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Neuroscience**, v. 153, p. 428–435, 2008.

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. **Stroke**, v. 29, p. 12-17, 1998.

ZACHARA, B. A.; PAWLUK, H.; BLOCH-BOGUSLAWA, E.; SLIWKA, K. M.; KORENKIEWICZ, J.; SKOK, Z.; RYC, K. Tissue level, distribution, and total body selenium content in healthy and diseased humans in Poland. **Archives of Environmental Health**, v. 56, p. 461-466, 2001.

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