

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos**  
**Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção**

**Dissertação**



**Sais de piridínio contendo selênio: um estudo sobre propriedades antioxidantes *in vitro* e potencial de toxicidade em camundongos**

**Ediandra Tissot Castro**

**Pelotas, 2022.**

**Ediandra Tissot Castro**

**Sais de piridínio contendo selênio: um estudo sobre propriedades antioxidantes *in vitro* e potencial de toxicidade em camundongos**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiani Folharini Bortolatto

Coorientador: Prof. Dr. César Augusto Brüning

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

C355s Castro, Ediandra Tissot

Sais de piridínio contendo selênio: um estudo sobre propriedades antioxidantes in vitro e potencial de toxicidade em camundongos / Ediandra Tissot Castro ; Cristiani Folharini Bortolatto, orientadora ; César Augusto Brüning, coorientador. — Pelotas, 2022.

102 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Sais de piridínio. 2. Selênio. 3. Atividade antioxidante. 4. Fígado. 5. Toxicidade oral. I. Bortolatto, Cristiani Folharini, orient. II. Brüning, César Augusto, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

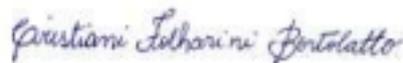
Ediandra Tissot Castro

Sais de piridínio contendo selênio: um estudo sobre propriedades antioxidantes *in vitro* e potencial de toxicidade em camundongos

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

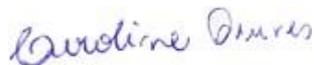
Data da defesa: 18 de março de 2022.

Banca Examinadora:



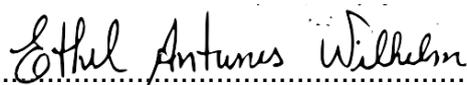
.....  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiani Folharini Bortolatto (orientadora)

Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).



.....  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Caroline Brandão Quines

Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).



.....  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ethel Antunes Wilhelm

Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha família por sempre me apoiarem em diversos momentos difíceis, incentivar nas minhas escolhas, por não me deixarem desistir em nenhum momento. Meus pais Claudio e Mara são meus pilares, fontes da minha força, orgulho, admiração, respeito, princípios, esforço e me criaram muito bem! A minha tia Sônia Tissot meu carinho, admiração e respeito é parte da minha inspiração, símbolo de força e de mulher guerreira.

A minha querida amiga Theodora meu agradecimento, pois em diversos momentos me fez rir quando achei ser impossível, que me ouviu, apoiou, incentivou, abraçou e disse verdades quando precisei ouvir. Te Amo.

A todos colegas do LABIONEM por serem maravilhosos, amigos, sinceros, pela união, pelas risadas, cumplicidade, dividir conhecimentos, conselhos e tornarem meus dias de pesquisa incríveis, vou levar vocês para toda minha vida. Especialmente a colega que hoje é amiga Taís, pelas risadas, por ter paciência de me ensinar tudo, por compartilhar seu conhecimento comigo, por ter sido a pessoa que mais me ouviu desde o início, por ter sido solícita e entendido as entrelinhas. A Amália que também dividiu seu conhecimento e experiências, pelas conversas, risadas e seu carinho, sou grata. A Lari, Mari, didi e Lê por me ajudarem a finalizar meus experimentos, sem vocês não sei o que, nem como teria sido, vocês são maravilhosas.

Ao coorientador César, por estar sempre disponível para tirar dúvidas, por seus conselhos e dicas, pela paciência, por teus ensinamentos e por ter contribuído ativamente nesses dois anos. Sou grata e por ti meu carinho e admiração.

A minha orientadora Cris, por ter me recebido como aluna e ter acreditado na possibilidade de realizar o mestrado, mesmo não tendo experiência nessa parte. Acreditou que conseguiríamos e conseguimos (apesar do projeto inicial não ter saído como queríamos). Agradeço por compartilhar seu conhecimento, vivências, tutoriais e paciência. Fui capaz de descobrir pontos sobre mim que não acreditava, e graças a ti evolui como pesquisadora. Obrigada por tudo!

A Ethel e Caroline pela disponibilidade em avaliar e contribuir com nosso estudo.

A UFPel por ter me abrigado nesses anos, por ter me proporcionado bons momentos durante essa jornada pela busca de conhecimento. Ao PPGBBio pela oportunidade e a todo corpo docente pelo aprendizado.

Ao Biotério Central da universidade pela produção e fornecimento dos animais. Também ao pessoal que cuida e mantém o biotério meu muito obrigada pelos ensinamentos, educação e atenção.

A CAPES pelo financiamento.

Se és capaz de aceitar teus alunos como são, com suas diferentes realidades  
sociais, humanas e culturais; se os levas a superar  
dificuldades, limitações ou fracassos, sem humilhações,  
sem inúteis frustrações; se os levas a refletir mais do que decorar;  
se te emocionas com a visão de tantas criaturas que de ti dependem  
para desabrochar em consciência, criatividade, liberdade e responsabilidade,  
então podes dizer: sou mestre!

(Rui Barbosa)

## Resumo

CASTRO, Ediandra Tissot. **Sais de piridínio contendo selênio: um estudo sobre propriedades antioxidantes *in vitro* e potencial de toxicidade em camundongos.** Orientadora: Cristiani Folharini Bortolatto. 2022. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

O estresse oxidativo é o desequilíbrio redox envolvendo a produção de oxidantes e a capacidade de resposta por antioxidantes, a favor da primeira, desencadeando danos oxidativos às biomoléculas. Perturbações no estado redox estão envolvidas em diversas doenças, incluindo as doenças hepáticas. Desta forma, destaca-se a importância da busca por substâncias antioxidantes que sejam seguras e capazes de atuar como hepatoprotetoras. Diferentes sais de piridínio contendo selênio (Se) têm sido obtidos e apresentam-se como potenciais candidatos terapêuticos em razão de seus componentes estruturais (Se e anel piridínico) e a sua relativa solubilidade em água. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de três sais de piridínio contendo Se através de ensaios *in vitro*. Este estudo também teve como proposta selecionar um destes sais para a realização de um estudo de toxicidade com o intuito de prever a sua segurança. Para os ensaios *in vitro*, foram utilizadas diferentes concentrações ( $\mu\text{M}$ ) dos compostos brometo de 1-(2-oxo-2-feniletil)-2-((fenilselanil)metil)piridín-1-íio, brometo de 1-(2-oxo-2-(*p*-tolil)etil)-2-((fenilselanil)metil)piridín-1-íio e brometo de 1-(2-(4-clorofenil)-2-oxoetil)-2-((fenilselanil)metil)piridín-1-íio, nomeados de **3A**, **3B** e **3C**, respectivamente. A atividade antioxidante em tecido hepático de camundongos foi realizada através dos ensaios de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas. Técnicas para a detecção de atividade sequestradora de radicais sintéticos (ABTS e DPPH) e de atividade mimética às enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST) foram executadas para apontar possíveis mecanismos. Os resultados revelaram que os três sais foram capazes de reduzir os níveis hepáticos de peroxidação lipídica e de carbonilação de proteínas induzidas por nitroprussiato de sódio. Além disso, estes compostos causaram o sequestro dos radicais ABTS e DPPH e foram capazes de agir de maneira semelhante à GST. Estes resultados foram validados pelo emprego de controles positivos, tais como trolox, ácido ascórbico e  $(\text{PhSe})_2$ . O composto **3C** foi selecionado para o estudo de toxicidade oral aguda (protocolo 423), em que camundongos *Swiss* fêmeas foram oralmente tratados com as doses de 50 ou 300 mg/kg e acompanhados por 14 dias. Nenhum óbito ocorreu em animais tratados com ambas as doses do composto. Além disso, não houve alterações dos marcadores plasmáticos de função hepática e renal. Embora não tenham sido detectadas diferenças significativas no ganho de peso corporal, consumo médio de água e atividade motora, houve uma redução significativa do consumo médio de comida em animais expostos à dose mais alta (300 mg/kg) do composto **3C**. Em conjunto, os dados indicam que os sais de piridínio contendo Se testados (**3A**, **3B** e **3C**) apresentam ação antioxidante, que parece ser mediada, ao menos em parte, por mecanismos envolvendo o sequestro de radicais livres e a atividade mimética à GST. Ademais, o composto **3C** apresenta um baixo potencial para causar toxicidade, o que sugere sua relativa segurança, embora mais estudos sejam

necessários. Portanto, este sal é um potencial candidato a ser testado em modelos de dano hepático envolvendo o estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** sais de piridínio; selênio; atividade antioxidante; fígado; toxicidade oral.

## Abstract

CASTRO, Ediandra Tissot. **Selenium containing pyridinium salts: a study on *in vitro* antioxidant properties and toxicity potential in mice.** Advisor: Cristiani Folharini Bortolatto. 2022. 90f. Dissertation (Master of Science) - Biochemistry and Bioprospecting Postgraduate Program - Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022.

Oxidative stress is the redox imbalance involving the production of oxidants and the response ability by antioxidants, in favor of the former, triggering oxidative damage to biomolecules. Disturbances in the redox state are involved in several diseases, including liver diseases. In this way, the importance of the search for antioxidant substances that are safe and capable of acting as hepatoprotective is highlighted. Different selenium (Se)-containing pyridinium salts have been obtained and present themselves as potential therapeutic candidates due to their structural components (Se and pyridinium ring) and their relative solubility in water. Thus, the objective of this study was to evaluate the antioxidant activity of three of these pyridinium salts containing selenium through *in vitro* assays. This study also aimed to select one of these salts to carry out a toxicity study in order to predict its safety. For the *in vitro* assays, different concentrations ( $\mu\text{M}$ ) of the compounds 1-(2-oxo-2-phenylethyl)-2-((phenylselanyl)methyl)pyridin-1-ium bromide, 1-(2-oxo-2-(p-tolyl)ethyl)-2-((phenylselanyl)methyl)pyridin-1-ium bromide and 1-(2-(4-chlorophenyl)-2-oxoethyl)-2-((phenylselanyl)methyl)pyridin-1-ium bromide, named **3A**, **3B** and **3C**, respectively. The antioxidant activity in liver tissue of mice was performed by lipid peroxidation and protein carbonylation assays. Techniques for the detection of synthetic radical scavenging activity (ABTS and DPPH) and of mimetic activity to the enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GST) were performed to identify possible mechanisms. The results revealed that the three salts were able to reduce hepatic levels of lipid peroxidation and protein carbonylation induced by sodium nitroprusside. Furthermore, these compounds caused the scavenging of ABTS and DPPH radicals and were able to act in a similar way to GST. These results were validated by the use of positive controls, such as trolox, ascorbic acid and  $(\text{PhSe})_2$ . Compound **3C** was selected for the acute oral toxicity study (protocol 423), in which female Swiss mice were orally treated with doses of 50 or 300 mg/kg and accompanied for 14 days. No deaths occurred in animals treated with both doses of the compound. In addition, there were no changes in plasma markers of liver and kidney function. Although no significant differences were detected in body weight gain, mean water consumption and motor activity, there was a significant reduction in mean food consumption in animals exposed to the highest dose (300 mg/kg) of compound **3C**. Taken together, the data indicate that the tested Se-containing pyridinium salts (**3A**, **3B** and **3C**) have antioxidant action, which seems to be mediated, at least in part, by mechanisms involving free radical scavenging and GST mimetic activity. Furthermore, the **3C** compound has a low potential to cause toxicity, which suggests its relative safety, although more studies are needed. Therefore, this salt is a potential candidate to be tested in liver damage models involving oxidative stress.

**Keywords:** pyridinium salts; selenium; antioxidant activity; liver; oral toxicity.

## Lista de figuras

Figura 1 - Principais alvos dos radicais livres no organismo aeróbico. ....	22
Figura 2 - Estrutura química do ácido ascórbico (vitamina C).....	26
Figura 3 - Estrutura química do $\alpha$ -tocoferol (vitamina E).....	27
Figura 4 - Estrutura química do retinol (vitamina A). ....	27
Figura 5 – [A] estrutura química BHT e [B] estrutura do BHA. ....	28
Figura 6 - Estrutura química do trolox. ....	28
Figura 7 - Ciclo catalítico da GPx reduzindo $H_2O_2$ , resultando na produção de $H_2O$ e regenerando a GSH por meio de GR. ....	29
Figura 8 -Critérios para avaliação e aplicação das metodologias antioxidantes in vitro. ....	31
Figura 9 - Reação envolvida no ensaio DPPH, onde AH é uma forma genérica de simbolizar o antioxidante.....	33
Figura 10 - [a] Reação de ABTS com persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ) resultando em $ABTS^{\cdot+}$ ; [b] Reação de antioxidante com $ABTS^{\cdot+}$ resultando em ABTS. ....	34
Figura 11 - Reação de oxidação de ácido graxo poliinsaturado resultando na formação de MDA. ....	35
Figura 12 - Reação de formação do complexo $[MDA-(TBA)_2]$ de coloração vermelha ou rosa.....	35
Figura 13 - Reação proposta para a autooxidação do pirogalol.....	36
Figura 14 - Reação da proteína carbonilada com o DNPH formando o complexo de cor Proteína-DNP. ....	37
Figura 15 - Reação de conjugação da GSH com CNDB formando o complexo CNDB-GS.....	38
Figura 16 - Estrutura química da piridina. ....	41
Figura 17 - Estrutura química dos três sais de piridínio. ....	42

## Lista de abreviaturas e siglas

AA	Ácido ascórbico
ABTS	2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
C	Carbono
CAT	Catalase
CDNB	2,4-dinitroclorobenzeno
CH <sub>3</sub>	Metil
Cl	Cloro
COOH	Ácido carboxílico
Cu	Cobre
DHGA	Doença hepática gordurosa alcoólica
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
FDA	do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
Fe	Ferro

GP	Galato de propila
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona dissulfeto/glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
<i>HAT</i>	Transferência de átomo de hidrogênio (do inglês, <i>Hydrogen atom transfer</i> )
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Persulfato de potássio
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
N	Nitrogênio
NADP/NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NPS	Nitroprussiato de sódio
O <sub>2</sub>	Oxigênio
Pb	Chumbo
(PhSe) <sub>2</sub>	Disseleneto de difenila
S	Enxofre
Se	Selênio
SET	Transferência de elétron (do inglês, <i>Single electron transfer</i> )
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico (do inglês, <i>thiobarbituric acid</i> )

TBARS Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid reactive substances*)

## Sumário

1. Introdução .....	17
2. Revisão bibliográfica .....	19
2.1. Espécies reativas de oxigênio.....	19
2.2. Radicais livres .....	21
2.3. Estresse oxidativo .....	22
2.4. O fígado .....	23
2.5. A ligação do estresse oxidativo com a DHGNA .....	23
2.6. Os antioxidantes .....	25
2.7. Metodologias antioxidantes <i>in vitro</i> .....	30
2.7.1. Atividade <i>scavenger</i> do radical DPPH .....	32
2.7.2. Atividade <i>scavenger</i> do radical ABTS.....	33
2.7.3. Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	34
2.7.4. Atividade mimética à SOD .....	36
2.7.5. Ensaio de carbonilação de proteínas.....	36
2.7.6. Atividade mimética à GST .....	37
2.8. Toxicidade.....	38
2.9. O elemento selênio (Se) .....	39
2.10. O anel de seis membros piridina.....	40
2.11. Sais de piridínio contendo Se .....	41
3. Objetivos .....	42
3.1. Objetivo geral.....	42
3.2. Objetivos específicos .....	42
4. Manuscrito.....	44
5. Discussão.....	83
6. Conclusão .....	88
7. Referências .....	89
ANEXOS .....	101

ANEXO A – Carta de aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA).....	102
--	-----



## 1. Introdução

A adenosina trifosfato amplamente conhecida como ATP, é a principal fonte de energia dos organismos vivos, representando ser essencial para a vida aeróbica. Os processos para a síntese de ATP envolvem uma cadeia de reações químicas empregando o oxigênio (O<sub>2</sub>) presente na atmosfera (ar), que é altamente reativo e um potente agente oxidante devido aos seus dois elétrons desemparelhados. Circunstância que faz com que o elemento receba um par de elétrons de um doador, tornando-o parte do sistema redox que é importante para os organismos vivos (Gulcin, 2020; Zhang et al., 2019).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) é importante para a manutenção da homeostase celular dos organismos vivos, em que as defesas antioxidantes conseguem manter um equilíbrio. O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre os oxidantes e antioxidantes, ou seja, os agentes oxidantes estão níveis maiores do que a capacidade de neutralização pelas defesas antioxidantes (Gulcin, 2020; Munteanu & Apetrei, 2021; Sindhi et al., 2013). O aumento das EROs levam à desregulação de diversas funções celulares, modificação de macromoléculas, lesão tecidual, morte celular acelerada, alteração nas funcionalidades de órgãos e ao surgimento de diversas doenças (Gulcin, 2020; Murphy et al., 2011; Sindhi et al., 2013; Zhang et al., 2019).

O fígado é um órgão que desempenha funções de metabolização, detoxificação, síntese, distribuição, entre outras. O fígado é capaz de armazenar glicose na forma de glicogênio, oxidar lipídios e também, quando em excesso, os transporta para serem armazenados em outros tecidos. Por ser um órgão versátil, quando sofre danos pode desencadear uma série de alterações em diversos outros órgãos e suas funções. O desenvolvimento de diferentes doenças hepáticas, a exemplo das doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) estão associadas à ação dos radicais livres, decorrentes de subprodutos do metabolismo energético de algumas células hepáticas. Como resultado, há desequilíbrio das funções hepáticas, levando a uma sobrecarga do fígado (Arab, Arrese, & Trauner, 2018; Chen, Tian, She, Cai, & Li, 2020; Chen, Yu, Cai, & Li, 2019; Trefts, Gannon, & Wasserman, 2017).

Pesquisadores têm investido em desenvolver estratégias para regular o estresse oxidativo, sem que a homeostase seja completamente alterada não prejudicando a fisiologia de células e tecidos (Alam, Bristi, & Rafiquzzaman, 2013; Zhang et al., 2019). A aplicação de testes para o rastreio de novas moléculas antioxidantes é o primeiro passo, nesse sentido diferentes metodologias *in vitro* estão disponíveis na literatura. Muitos dos diferentes testes antioxidantes *in vitro* geralmente são relativamente simples, baratos, rápidos, de fácil reprodutibilidade e de confiabilidade (Alam et al., 2013; Nwachukwu, Sarteshnizi, Udenigwe, & Aluko, 2021; Pinchuk, Shoval, Dotan, & Lichtenberg, 2012). Com esse intuito, diferentes ensaios podem ser aplicados para testar a ação antioxidante de compostos de interesse, com base no modo de ação e de inibição, do poder de redução ou agindo de forma mimética às enzimas antioxidantes.

As piridinas são compostos heterocíclicos que possuem seis carbonos (C) e um átomo de nitrogênio (N) em sua estrutura química. São espécies químicas de ocorrência natural, e possuem diferentes propriedades biológicas sendo muito empregadas em medicamentos. A piridina é uma substância facilmente metabolizada por meio de vias de oxidação e metilação, também faz parte da estrutura de vitaminas, no sistema redox como a coenzima NADP/NADPH. Aproximadamente 62% dos medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), contém esta unidade cíclica sendo considerada a segunda mais comumente utilizada. A piridina quando funcionalizada com diferentes substituintes pode ter a sua atividade aumentada como, por exemplo, as funções antioxidantes (Alptuzun, Parlar, Tasli, & Erciyas, 2009; Hu et al., 2014; Podlekareva et al., 2016; Vitaku, Smith, & Njardarson, 2014).

As piridinas formam sais estáveis, que são frequentemente formados para alcançar propriedades desejáveis de constituição farmacologicamente ativa (D. Gupta, Bhatia, Dave, Sutariya, & Varghese Gupta, 2018; Katritzky, Ramsden, Joule, & Zhdankin, 2010). Os sais de piridínio são razoavelmente solúveis em água, facilitando sua aplicação *in vivo* e reduzindo possíveis efeitos tóxicos no organismo. Também espera-se que se portem como a maioria dos sais de piridina, ou seja, serem capazes de exercer sua ação e, após, serem facilmente excretados (Madaan & Tyagi, 2008). Intermediários na síntese de indolizinas, os

sais de piridínio contém em sua estrutura cíclica átomos de C e N que formam a estrutura da piridina, o elemento selênio (Se) ligado à molécula e alguns substituintes como o cloro (Cl) ou o metil (-CH<sub>3</sub>) ligados a um anel aromático (Penteado et al., 2019).

O oligoelemento Se está presente na rotina alimentar de muitas pessoas, e sua importância cada vez mais tem ganhado destaque. Conhecido por seu envolvimento nas funções relacionadas ao equilíbrio redox, é capaz de proteger contra o estresse oxidativo e a inflamação. O Se é fundamental na síntese de aminoácidos como a selenocisteína, sendo incorporado às selenoproteínas como as subfamílias das glutationas e tioredoxina redutases (Solovyev, 2015; D. J. Torres, Alfulajj, & Berry, 2021). Compostos naturais e sintéticos contendo o microelemento Se têm sido incorporados em áreas terapêuticas (Chuai et al., 2021).

Nesse sentido, investigou-se a atividade antioxidante de sais de piridínio contendo Se, por meio de metodologias *in vitro*, bem como sua potencial toxicidade *in vivo* em camundongos Swiss fêmeas.

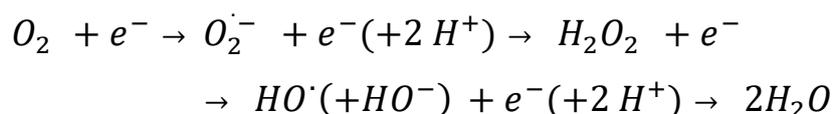
## **2. Revisão bibliográfica**

### **2.1. Espécies reativas de oxigênio**

Espécies reativas de oxigênio (ERO) que tem como base o elemento oxigênio (O<sub>2</sub>) podem ser radiculares ou moleculares. Este elemento é um não-metal altamente reativo, tornando-se um agente oxidante que facilmente reage com a maioria dos elementos e outros compostos. Foi devido ao surgimento de grandes concentrações do elemento que a vida aeróbica se desenvolveu, presente na atmosfera em sua forma fundamental estável (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>), ele pode passar por etapas de redução devido aos pares de elétrons desemparelhados (Collin, 2019; Gulcin, 2020; Taslimi & Gulçin, 2018).

Nos seres aeróbicos, o O<sub>2</sub> está envolvido na cadeia respiratória mitocondrial, Ciclo de Krebs e é fundamental para a síntese de energia (ATP), dentre muitas outras reações. Na cadeia respiratória mitocondrial, o O<sub>2</sub> participa passando por quatro etapas de redução, sendo produzidos intermediários em baixa quantidade (Esquema 1) (Collin, 2019).

Esquema 1:



Etapas de redução do O<sub>2</sub> na cadeia respiratória.

As espécies formadas ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical hidroxila (HO<sup>·</sup>) são ERO, pois contêm o oxigênio altamente reativo (Collin, 2019; Gulcin, 2020; Singh, Kukreti, Saso, & Kukreti, 2019; Zhang et al., 2019). Além disso, quando os radicais livres HO<sup>·</sup> e O<sub>2</sub><sup>·-</sup> reagem com outras moléculas atacando ligações de carbono (CH), formam radicais peroxil RO<sub>2</sub><sup>·</sup>, alcoxila RO<sup>·</sup>. Entre as ERN temos o óxido nítrico (NO<sup>·</sup>), dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub><sup>·</sup>) e peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) que amplamente estão englobados como ERO (Gulcin, 2020; Zhang et al., 2019).

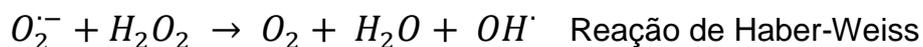
Radicais livres são produzidos no organismo em baixas concentrações e estão envolvidos em diversas reações bioquímicas, mantendo a homeostase, sinalização celular e regulação do metabolismo (Collin, 2019; Singh et al., 2019). As fontes endógenas de ERO são a NADPH oxidase, mieloperoxidase (MPO), lipoxigenase e angiotensina II, estas fontes estão nas mitocôndrias, metabolismo do citocromo P450, peroxissomos, ativação de células inflamatórias, neutrófilos e macrófagos. Já as fontes exógenas englobam a poluição do ar atmosférico e da água, uso de tabaco, álcool, drogas, contaminação por metais pesados ou de transição, solventes industriais, radiação, na culinária (óleo usado, processo de defumação de carnes) (Liguori et al., 2018; Rahman, 2007).

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é uma espécie não radicalar de longa vida útil, é formado por meio da redução de O<sub>2</sub>, pode formar HO<sup>·</sup> através da reação de O<sub>2</sub> com íons de metais de transição como o Fe, explicada pela reação de Fenton (Esquema 2) e pela reação de Haber-Weiss (Esquema 3). É uma ERO que possui facilidade em atravessar as biomembranas. Pode reagir com Fe-S, metais fracos ligados às glutationsas, resíduos de aminoácidos como cisteína (Cys) e metionina (Met). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é facilmente convertido à água pela enzima catalase (CAT) e pelas peroxidases (Gulcin, 2020; Zhang et al., 2019).

Esquema 2:



Esquema 3:



## 2.2. Radicais livres

O radical  $O_2^{\cdot-}$  é fraco quando comparado a outros radicais e devido a sua carga aniônica não consegue acessar regiões ricas em elétrons. Possui tempo de meia-vida relativamente curto, pois geralmente é transformado em  $H_2O_2$  por processo de dismutação via superóxido dismutase (SOD). Reage com diversos componentes celulares, principalmente com ligações duplas conjugadas, como os ácidos graxos poliinsaturados, a base nitrogenada guanina, além de poder interagir com moléculas através de combinações químicas (Gulcin, 2020; Zhang et al., 2019).

O  $HO^\cdot$  é a forma neutra do íon hidróxido ( $OH^-$ ), é altamente reativo de meia-vida curta e pode ser gerado por meio da micróglia e macrófagos que foram expostos a alguns patógenos, certas bactérias. Também há relatos da formação por meio de irradiação de altas energias por clivagem hemolítica da água corporal ou do  $H_2O_2$  endógeno em processos catalisados por metais, além de que a luz ultravioleta (UV) pode clivar esse peróxido e produzir duas moléculas do radical (Collin, 2019; Gulcin, 2020).

O  $NO^\cdot$  é formado por meio de enzimas óxido nítrico sintases a partir da arginina. É um sinalizador para o relaxamento dos músculos do tipo lisos presentes nas paredes de vasos sanguíneos levando à redução da pressão arterial. É um mensageiro em processos patológicos e fisiológicos, produzido em macrófagos, contribuindo nas defesas imunológicas primárias. Quando em grandes quantidades, reage com biomoléculas, ou com  $O_2^{\cdot-}$  e forma o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Gulcin, 2020; Halliwell, 2012).

O  $ONNO^-$  é um agente oxidante forte e nitrante, pode danificar uma ampla gama de moléculas celulares, como proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA), leva à lipoperoxidação e interferir nas sinalizações celulares. Reage com grupamentos ricos em elétrons como sulfidrilas, zinco-tiolatos, ferro-enxofre e o

sítio ativo sulfidrílico das tirosinas fosfatases (Di Meo & Venditti, 2020; Gulcin, 2020; Gülçin, 2012).

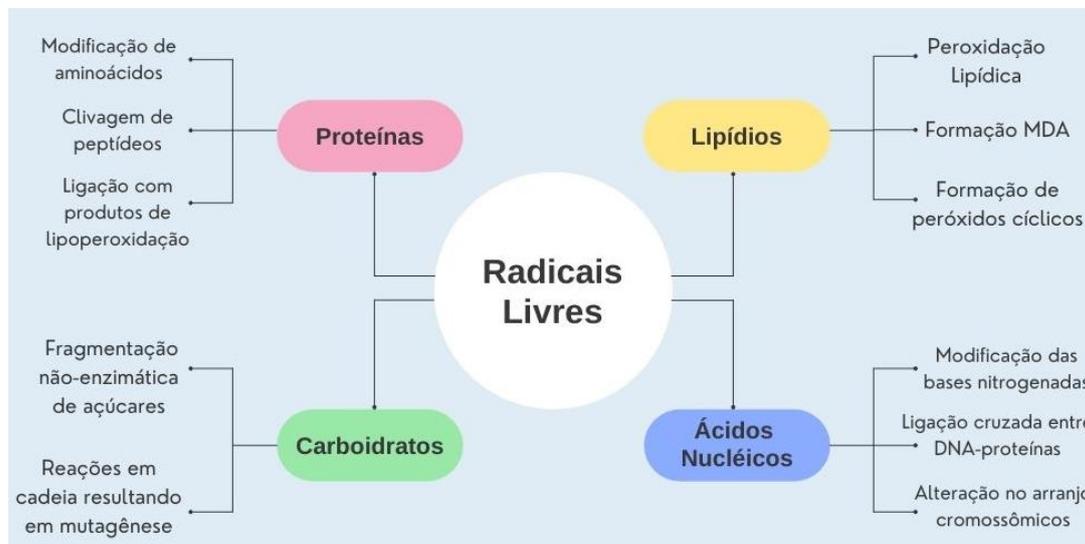


Figura 1 - Principais alvos dos radicais livres no organismo aeróbico.

Fonte: Figura do autor.

### 2.3. Estresse oxidativo

Trata-se do desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes no sistema biológico, em que as substâncias oxidantes encontram-se em maior concentração do que os sistemas antioxidantes são capazes de eliminar (Gülçin, 2012; Mayne, 2003; Neha, Haider, Pathak, & Yar, 2019; Singh et al., 2019). Como resultado desse desequilíbrio, observa-se a alteração de várias funções celulares e de macromoléculas, lesão tecidual, morte celular e também o surgimento de condições patológicas (Gulcin, 2020; Sindhi et al., 2013; Singh et al., 2019).

O papel do estresse oxidativo está atrelado ao envelhecimento e a doenças como doenças coronárias vasculares conhecidas como doenças cardíacas, doenças renais agudas e crônicas, doenças hepáticas, doenças neurodegenerativas, doenças biliares, obesidade, diabetes, hipertensão, aterosclerose e câncer, dentre outras (Collin, 2019; Liguori et al., 2018; Rahman, 2007; Singh et al., 2019).

## **2.4. O fígado**

O fígado é o órgão central para diversos processos fisiológicos, como o metabolismo de macronutrientes, homeostase de lipídios e colesterol, detoxificação de xenobióticos, controle endócrino de vias de sinalização do crescimento, possui capacidade de armazenar glicose na forma de glicogênio, entre outras funções (Trefts et al., 2017). Devido as suas capacidades metabólicas e secretoras está sujeito a sofrer doenças hepáticas e morte hepatocelular. A patogênese das doenças hepáticas envolve estresse oxidativo por meio de danos a lipídios, proteínas e alterações no DNA, incluindo também a modulação de vias de sinalização funcionais. Um exemplo de mecanismo que leva ao estresse oxidativo é a modulação da expressão proteica por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que leva a apoptose dos hepatócitos (células que desempenham importantes funções hepáticas) (Cichoz-Lach & Michalak, 2014; Farzaei et al., 2018).

Fatores etiológicos como o consumo de álcool, drogas e até de certos medicamentos estão ligados a doenças hepáticas, principalmente pela alta produção de ERO. O consumo de etanol envolve a alta produção de ERO mitocondriais nos hepatócitos. O uso de drogas e medicamentos também induz estresse oxidativo aumentando os oxidantes celulares, a peroxidação lipídica e causando depleção de antioxidantes no fígado. Por exemplo, o consumo de paracetamol leva a um aumento de MDA, nitrito, nitrato e reduz a atividade da SOD total e SOD-Cu/Zn (Farzaei et al., 2018).

Doenças hepáticas relacionadas ao estresse oxidativo podem causar um comprometimento cerebral e insuficiência renal. A doença hepática gordurosa alcoólica (DHGA) e a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) são doenças referentes ao fígado que apresentam uma gama de alterações que se iniciam em uma esteatose simples até cirrose e carcinoma. A DHGNA geralmente acomete pessoas que não consomem álcool abusivamente, e está associada à obesidade, diabetes *mellitus* tipo II e hiperlipidemia. A DHGA, como o nome propõe, está relacionada ao consumo abusivo de bebidas alcoólicas e envolve esteatose, hepatite e cirrose.

## **2.5. A ligação do estresse oxidativo com a DHGNA**

Doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) como esteatose simples, esteato-hepatite, fibrose e cirrose podem levar a um extremo terminal

chegando ao carcinoma hepatocelular. As ERO  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  são subprodutos do metabolismo energético em algumas células hepáticas, em casos de inflamação em que há um acúmulo de lipídios no fígado e, conseqüentemente, indução de ERO afetando as funções do órgão (Chen et al., 2020).

O desenvolvimento de DHGNA é resultado do desequilíbrio entre a produção e a degradação de lipídios, tornando o fígado sobrecarregado e alterando suas funções. O excesso de lipídios induz estresse metabólico ao fígado, levando à lipotoxicidade com conseqüente ativação das vias inflamatórias, lesão hepática crônica e fibrose (Chen et al., 2020; Chen et al., 2019). Quando há excesso na produção ou danos na eliminação de ácidos graxos livres, eles tornam-se substratos na produção de espécies lipotóxicas. As fontes de ácidos graxos livres são provenientes da lipólise periférica e da lipogênese (Arab et al., 2018; Yu, Cai, She, & Li, 2019).

O acúmulo de ácidos graxos livres no fígado originados da lipólise de triglicerídeos, se dá através do aumento de ácidos graxos não esterificados entregue por meio da corrente sanguínea (Bai & Li, 2019; Chen et al., 2019). A resistência à insulina é caracterizada pela pouca sensibilidade e baixo metabolismo de glicose nos tecidos periféricos. Esta resistência à insulina leva à lipólise desenfreada nos tecidos adiposos, sendo o fígado o principal alvo do influxo do excesso de ácidos graxos não esterificados, que posteriormente é convertido a acil-CoA graxo nos hepatócitos (Chen et al., 2020; Fuchs, Claudel, Trauner, & Metabolism, 2014).

Altos níveis de glucagon e epinefrina são liberados na corrente sanguínea durante a inanição e exercício físico, transferem acil-CoA graxo citoplasmático para as mitocôndrias pelo auxílio da carnitina palmitoiltransferase (CPT-1). Na matriz mitocondrial, o acil-CoA graxo passa por  $\beta$ -oxidação, resultando em acetil-CoA que, por sua vez, passa pelo Ciclo de Krebs e forma ATP. A insulina, principalmente após a alimentação, faz com que o processo de esterificação dos ácidos graxos forme triglicerídeos em excesso rapidamente, e esse excesso é armazenado nos hepatócitos (Chen et al., 2020; Chen et al., 2019; Samuel & Shulman, 2018).

A lipogênese é a conversão do excesso de glicose e frutose em ácidos graxos nos hepatócitos. Assim como na lipólise, na lipogênese há a mediação da insulina quando os carboidratos são absorvidos advindos da dieta que chega aos tecidos alvo por meio da corrente sanguínea, e são então direcionados ao fígado (Chen et al., 2019; Friedman, Neuschwander-Tetri, Rinella, & Sanyal, 2018; Samuel & Shulman, 2018). Esse aumento de glicose nos hepatócitos faz com que haja metabolização pela via da glicólise que gera o ácido pirúvico, que é transformado em acetil-CoA que, por sua vez, destina-se ao Ciclo de Krebs para geração de ATP.

Os biomarcadores comumente empregados para investigação de estresse oxidativo no fígado, englobam produtos de dano lipídico como substâncias reativas ao TBARS, MDA, hidroperóxidos e 8-isoprostanos, produtos resultantes da oxidação de DNA como a 8-hidróxi-2'-deoxiguanosina (8-OH-dG) e produtos da oxidação de proteínas como proteínas carboniladas e nitrotirosina (Stiuso et al., 2014; Videla et al., 2004). Dentre os antioxidantes enzimáticos que podem ser avaliados estão a CAT, SOD e GPx, por exemplo. Já entre os antioxidantes não enzimáticos estão a glutathiona reduzida (GSH), Trx,  $\alpha$ -tocoferol e ubiquinona (Chen et al., 2020; Leghi, Domenici, & Vannucchi, 2015; W. Li & Lu, 2018).

A interpretação clínica da atividade de enzimas antioxidantes pode ser em dois aspectos. O primeiro é visto quando as enzimas antioxidantes se encontram em baixos níveis (ou com atividade reduzida) que pode ser uma perda da capacidade protetora. Já a segunda opção é que o aumento da atividade antioxidante das enzimas é uma resposta positiva como mecanismo de resposta para detoxificar metabólitos prejudiciais (Chen et al., 2020; Leghi et al., 2015; Sumida et al., 2003).

## **2.6. Os antioxidantes**

O organismo de seres humanos possui defesas antioxidantes que devem ser capazes de remover ou reparar moléculas danificadas e inibir a oxidação de moléculas. Antioxidantes são conhecidos como quaisquer moléculas com capacidade de inibir ou estabilizar outras moléculas de cunho oxidante. Eliminam ou inibem a produção de ERO, e podem retardar o progresso de diversas doenças crônicas, e envelhecimento (Gulcin, 2020; Rahman, 2007).

Os antioxidantes podem ser naturais como vitaminas A, C, E, flavonóides e carotenoides ou sintéticos como hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), trolox, galato de propila (GP). Considerando os endógenos, pode-se citar os enzimáticos como a GPx, SOD e CAT e os não enzimáticos como o ácido úrico, ácido lipóico, bilirrubina, GSH e melatonina (Collin, 2019; Liguori et al., 2018; Neha et al., 2019).

O ácido ascórbico (Fig. 2), popularmente conhecido como vitamina C, é um dos mais potentes antioxidantes, facilmente solúvel em água e encontrado em altas concentrações em plantas e alimentos consumidos no dia-a-dia. Age transferindo um elétron sendo um agente redutor, ou também pode transferir um hidrogênio. Ele interrompe reações de radicais em cadeia, é capaz de aumentar os níveis de glutathiona intracelular e é eficaz na eliminação de  $H_2O_2$ ,  $HO^*$ ,  $O_2^{*-}$ ,  $O_2$  singlete e também  $NO_2$  (Ashor, Siervo, & Mathers, 2016; Bradshaw, Barril, Clark, Prenzler, & Scollary, 2011; Gülçin, 2012; Rahman, 2007).

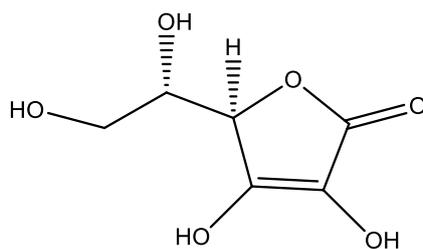


Figura 2 - Estrutura química do ácido ascórbico (vitamina C).

Fonte: Figura do autor.

A vitamina E (Fig. 3) é lipossolúvel, está presente em níveis traço em alimentos sendo as maiores concentrações encontradas em óleos vegetais, nozes, sementes e grãos integrais. A vitamina E é classificada como tocoferol ou tocotrienol, sendo os isômeros das duas classes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , somando um total de oito isômeros. O  $\alpha$ -tocoferol é a forma mais importante das classes, a biologicamente mais ativa nos mamíferos, estando presente em organelas e membranas externas celulares. Atua doando hidrogênios do grupo hidroxila presente no anel aromático para o radical peroxil lipídico, inibindo a peroxidação lipídica e a produção hidroperóxidos lipídicos (Atkinson, Manor, & Parker, 2013; Gülçin, 2012; Mayne, 2003; Rahman, 2007).

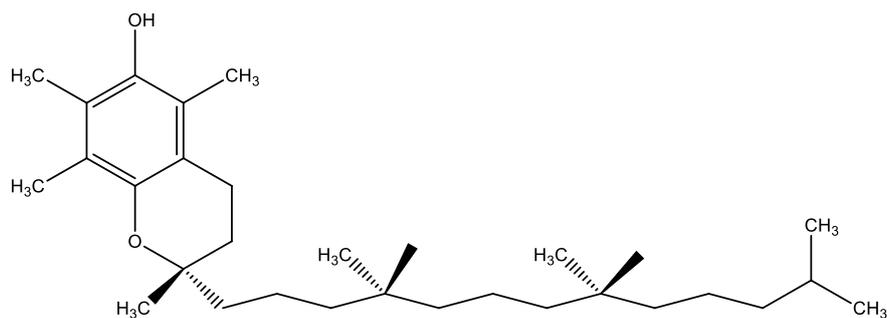


Figura 3 - Estrutura química do  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E).

Figura do autor.

O retinol (Fig. 4) mais conhecido como vitamina A é um carotenóide que possui cerca de doze formas diferentes, pode ser sintetizado no fígado como resultado da degradação do  $\beta$ -caroteno. Sua capacidade de combinar com  $\text{ROO}^{\bullet}$  e eliminá-lo juntamente com  $\text{O}_2$  singlete, caracteriza sua eficiência como antioxidante (Dao, Ngo, Thong, & Nam, 2017; Gulcin, 2020; Monego, da Rosa, & do Nascimento, 2017).

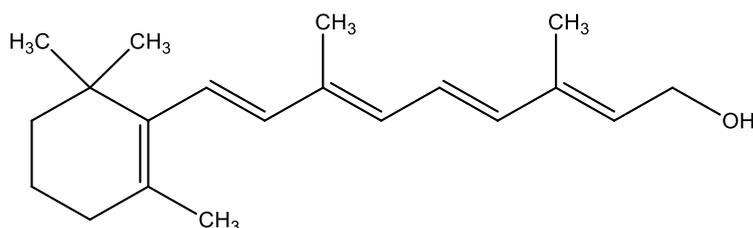


Figura 4 - Estrutura química do retinol (vitamina A).

Figura do autor.

O BHT (Fig. 5A) e BHA (Fig. 5B) foram os antioxidantes sintéticos mais utilizados, porém não são os mais eficazes quando comparados a outros sintéticos. Já foram adicionados na lista de aditivos limitados pela FDA, devido a algumas dúvidas quanto a sua segurança. Geralmente servem como aditivos alimentares, são adicionados durante o processamento e armazenamento de gorduras e óleos, prevenindo ou retardando a oxidação lipídica (Gulcin, 2020; Shahidi & Ambigaipalan, 2015; Sindhi et al., 2013).

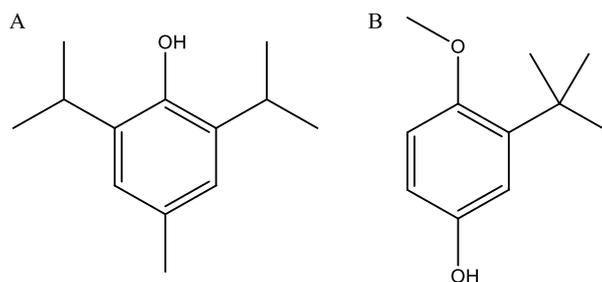


Figura 5 – [A] estrutura química BHT e [B] estrutura do BHA.

Figura do Autor.

O trolox (Fig. 6) é um análogo do tocoferol amplamente usado como controle positivo em testes bioquímicos, farmacêuticos, biológicos e é moderadamente solúvel em água. Possui capacidade antioxidante devido à parte cromanol presente em sua estrutura química que possibilita interação com radicais livres, sendo capaz de prevenir a oxidação lipídica e apoptose. Há também um ensaio em que é avaliada a capacidade equivalente de trolox (TEAC) (Çelik, Rubio, & Gökmen, 2018; Socrier et al., 2019).

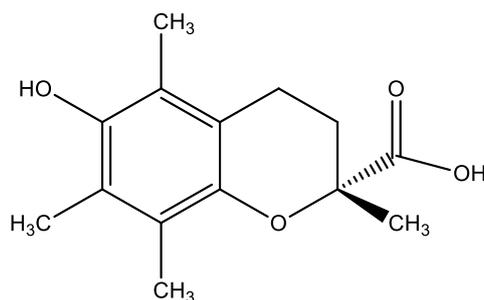


Figura 6 - Estrutura química do trolox.

Figura do autor.

A GPx é uma isoenzima da família das glutatonas, atua transformando o  $H_2O_2$  e peróxidos lipídicos ( $ROO^*$ ), os convertendo em  $H_2O$  e álcoois. São biocataliticamente ativas por possuírem em suas estruturas um centro contendo selenocisteína. A porção contendo o Se é a responsável pelo poder antioxidante (Brigelius-Flohé & Flohé, 2019; van Lith & Ameer, 2016). Wirth (2015) demonstra em seu trabalho um exemplo de como a GPx atua reduzindo o  $H_2O_2$ , produzindo  $H_2O$  e regenerando a GSH por meio de GR (fig. 7).

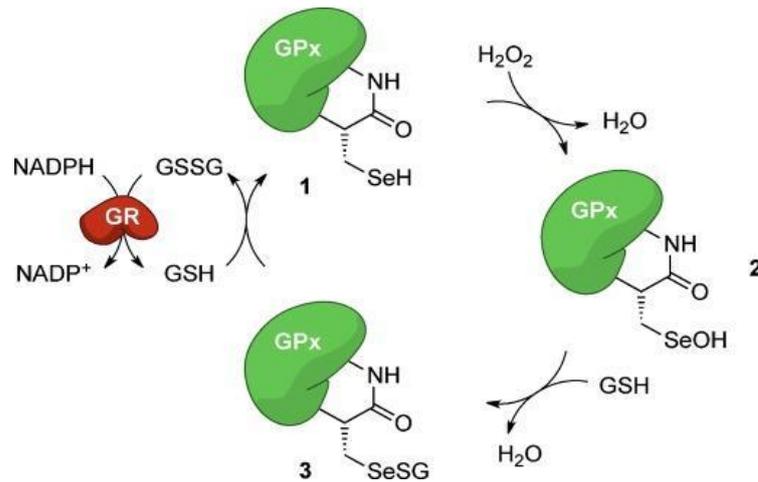


Figura 7 - Ciclo catalítico da GPx reduzindo  $H_2O_2$ , resultando na produção de  $H_2O$  e regenerando a GSH por meio de GR.

Fonte: Wirth (2015).

A SOD é uma metaloenzima que regula os processos de oxidação em células biológicas, e converte o  $O_2^{\cdot -}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . As SOD possuem em sua composição estrutural metais como cofatores enzimáticos, sendo 4 isoformas: SOD cobre-zinco (CuZnSOD), SOD manganês (MnSOD), SOD ferro (FeSOD) e SOD níquel (NiSOD). Os centros ativos das isoformas são compostos pelo mesmo conteúdo, a histidina e íons metálicos coordenados com o nitrogênio presentes nos resíduos de aminoácidos (Rahman, 2007; Székács et al., 2019; Zhao, Zhang, Yan, & Fan, 2021).

A CAT é uma enzima tetramétrica localizada nos peroxissomos que reduz o  $H_2O_2$  à  $H_2O$  e  $O_2$ . É uma enzima que tem as maiores taxas de renovação, podendo converter cerca de 6 milhões de moléculas de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  a cada minuto. Geralmente a enzima entra em ação após a ação da SOD. Quando há aumento exacerbado de ERO, a atividade da CAT pode ser inibida, resultando em um acúmulo de  $H_2O_2$ , com consequente inibição da SOD (Abdel-Shafy, 2021; Marín-García, 2014; Rahman, 2007).

A GSH é um tripeptídeo presente na maioria dos tecidos, mas em altas concentrações no fígado. No fígado exerce função de proteção dos hepatócitos, mas também protege eritrócitos e outras células contra potenciais processos tóxicos. Visto que os hepatócitos possuem habilidade em reduzir oxigênio, eles também são o local de síntese da GSH. É importante em processos de detoxificação, eliminando xenobióticos eletrofílicos reativos no fígado, formando

conjugados menos tóxicos e facilmente excretáveis na bile, ou convertidos em ácido mercaptúrico nos rins com posterior eliminação através da urina (Feldman, Friedman, & Brandt, 2020; Rahman, 2007).

A GSH age como cofator para várias vias antioxidantes que envolvem o grupamento tiol-dissulfeto, também está envolvida na catálise de reações por meio da enzima glutathione S-transferase (GST). A glutathione pode apresentar-se também na forma oxidada, a qual é a dissulfeto de glutathione (GSSG) que possui o átomo de enxofre (S) que facilmente pode ajudar a regenerar os níveis de GSH. A depleção desse tripeptídeo leva à hepatotoxicidade e mutagenicidade (Feldman et al., 2020; P. K. Gupta, 2016; Rahman, 2007).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio indoleamina sintetizado na glândula pineal, mas também em tecidos como coração, fígado, rins, entre outros. Este hormônio geralmente é liberado conforme o ciclo circadiano e regula processos fisiológicos e homeostáticos. Ela exerce funções antioxidantes direta e indiretamente, elimina radicais livres, estimula enzimas antioxidantes endógenas e melhora a eficiência de outros antioxidantes. A melatonina consegue eliminar radicais como  $\text{OH}^{\bullet}$ ,  $\text{ROO}^{\bullet}$ , transferindo um átomo de hidrogênio, um elétron, ou formando um aduto radicalar. Pode também inibir reações de oxidação envolvendo metais como no caso do Cu, como quelante de Fe, Zn e Pb, além de inibir enzimas pró-oxidantes como a xantina oxidase através da mediação de alguns receptores (Al-Omary, 2013; Chitimus et al., 2020; Rahman, 2007; Reiter et al., 2016).

Os antioxidantes conhecidos podem ser empregados na pesquisa como controles positivos para as técnicas *in vitro*, auxiliando na validação e na confiabilidade dos resultados obtidos para triagem de substâncias inéditas.

## **2.7. Metodologias antioxidantes *in vitro***

Existem distintos ensaios *in vitro* visando investigar o potencial antioxidante de compostos. É importante que múltiplos e diferentes ensaios sejam empregados, para que uma maior certeza acerca do potencial e modo de ação sejam comprovados. As metodologias desenvolvidas e presentes na literatura são relativamente simples, baratas, rápidas e de fácil reprodutibilidade. Antes de aplicar as metodologias, os analistas devem considerar que na grande

maioria, não é possível que os compostos investigados sejam tão abrangentes, ou seja, que deem resultados positivos por meio de todas metodologias empregadas, então deve-se perguntar e selecionar critérios para a execução da triagem antioxidante, para que tempo seja poupado, não haja desperdícios e que uma hipótese seja alcançada (Fig. 8) (Alam et al., 2013; Murphy et al., 2011; Pinchuk et al., 2012; Romulo, 2020; Shahidi & Zhong, 2015).



Figura 8 -Critérios para avaliação e aplicação das metodologias antioxidantes *in vitro*.

Fonte: Adaptado de Murphy et al. (2011) e Munteanu and Apetrei (2021).

Os métodos antioxidantes podem ser divididos em dois tipos de acordo com os mecanismos de reação:

1. Métodos baseados na transferência de um elétron (*SET*, do inglês *single electron transfer*);
2. Métodos baseados na transferência de átomos de hidrogênio (*HAT*, do inglês *hydrogen atom transfer*).

Metodologias *SET* detectam a capacidade de um potencial composto antioxidante de transferir um elétron reduzindo íons metálicos, grupos carbonilas e radicais livres. A oxidação pode ser verificada por tecnologias de detecção como, por exemplo, métodos espectrofotométricos, fluorimétricos, e quimioluminescentes utilizando infravermelho e também ressonância magnética

nuclear (RMN). Geralmente são comparados com antioxidantes de referência como trolox, ou vitamina C, ou ainda outros compostos positivamente antioxidantes presentes na literatura, já testados anteriormente (Apak, Özyürek, Güçlü, & Çapanoğlu, 2016; Munteanu & Apetrei, 2021; Shahidi & Zhong, 2015).

Metodologias *HAT* detectam se um potencial composto pode ser um antioxidante, por meio da transferência do átomo de hidrogênio. Uma molécula só será eficientemente antioxidante se conseguir reagir rapidamente com os radicais livres, e proteger os alvos antes que sofram oxidação. Diferente dos ensaios *SET*, os ensaios *HAT* não dependem do pH e do solvente da reação, sendo então reações com resultado muito rápido. Independente do mecanismo da metodologia, os equipamentos capazes de detectar o resultado são os mesmos (Apak et al., 2016; Gulcin, 2020; Munteanu & Apetrei, 2021).

### **2.7.1. Atividade *scavenger* do radical DPPH**

O ensaio de eliminação ou de captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) é o método mais utilizado dentre todos os métodos disponíveis. É um ensaio misto, porém apenas um mecanismo é seguido ao final, além de ser rápido, fácil e muito eficiente. É um radical cromógeno estável, solúvel em solventes orgânicos como metanol, etanol, porém não em água, cujo teor não deve ultrapassar 60% e alterar a solubilidade do radical. Por ser um ensaio colorimétrico, a alteração da coloração púrpura indica um resultado positivo para antioxidante doador de elétrons, e o resultado é baseado na diminuição da absorbância, sendo a leitura geralmente realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 517 nm (Foti, 2015; Gulcin, 2020; Munteanu & Apetrei, 2021; Shahidi & Zhong, 2015).

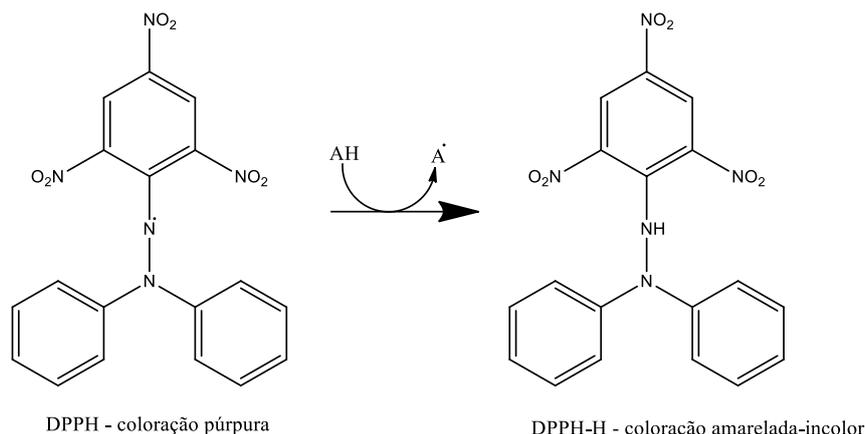


Figura 9 - Reação envolvida no ensaio DPPH, onde AH é uma forma genérica de simbolizar o antioxidante.

Fonte: Figura do autor.

### 2.7.2. Atividade *scavenger* do radical ABTS

O ensaio ABTS mede a capacidade dos potenciais antioxidantes de eliminar/neutralizar o cátion radicalar estável ácido 2,2-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS<sup>•+</sup>). O ABTS é um cromóforo de cor azul-esverdeado que pode ser lido em comprimento de onda 734 nm através de espectrofotômetro, a sua intensidade diminui na presença de agentes antioxidantes. As vantagens deste ensaio é que são simples, e podem tranquilamente ser testados em moléculas hidrofílicas (solubilizadas em água) quanto lipofílicas (solubilizadas em óleos), e em ampla faixa de pH, porém o cátion precisa ser pré-preparado cerca de 12h antes do ensaio. Considerada uma metodologia mista, pois seu princípio é baseado em *SET*, mas *HAT* também se aplica (Durmaz, 2012; Gulcin, 2020; Munteanu & Apetrei, 2021; Pinchuk et al., 2012; Shahidi & Zhong, 2015).

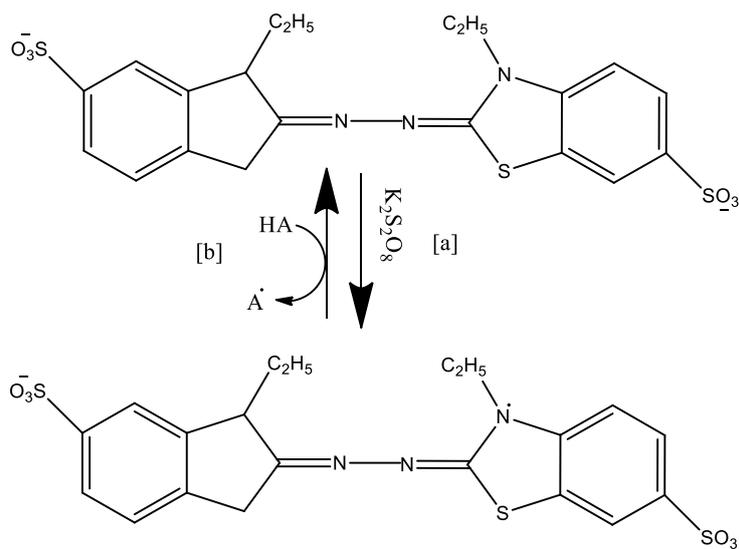


Figura 10 - [a] Reação de ABTS com persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) resultando em ABTS<sup>•+</sup>; [b] Reação de antioxidante com ABTS<sup>•+</sup> resultando em ABTS.

Fonte: Figura do autor.

### 2.7.3. Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O ácido tiobarbitúrico amplamente utilizado como indicador de oxidação, possibilita rastrear e monitorar a peroxidação lipídica. Este ensaio *in vitro* pode empregar tecidos como, por exemplo, cérebro ou fígado de animais de laboratório, e um indutor como o nitroprussiato de sódio (NPS) que é um gerador de NO<sup>•</sup>, um radical. Quando a reação começa, radicais peróxil e peróxidos lipídicos começam a ser formados, os lipídios são decompostos resultando na formação de aldeídos reativos sendo um deles o MDA. Posteriormente, o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA - do inglês, *thiobarbituric acid*), e produzem um complexo [MDA-(TBA)<sub>2</sub>] de coloração vermelha ou rosa. Lipídios poliinsaturados fazem parte da estrutura das membranas celulares que quando sofrem ataque de ERO são degradadas e têm sua função e permeabilidade alteradas (Apak et al., 2016; Gulcin, 2020; Morales & Munné-Bosch, 2019; Romulo, 2020; Shahidi & Zhong, 2015). Os passos envolvidos utilizando inicialmente os ácidos graxos poliinsaturados até a produção do MDA estão expressos na Fig.11.

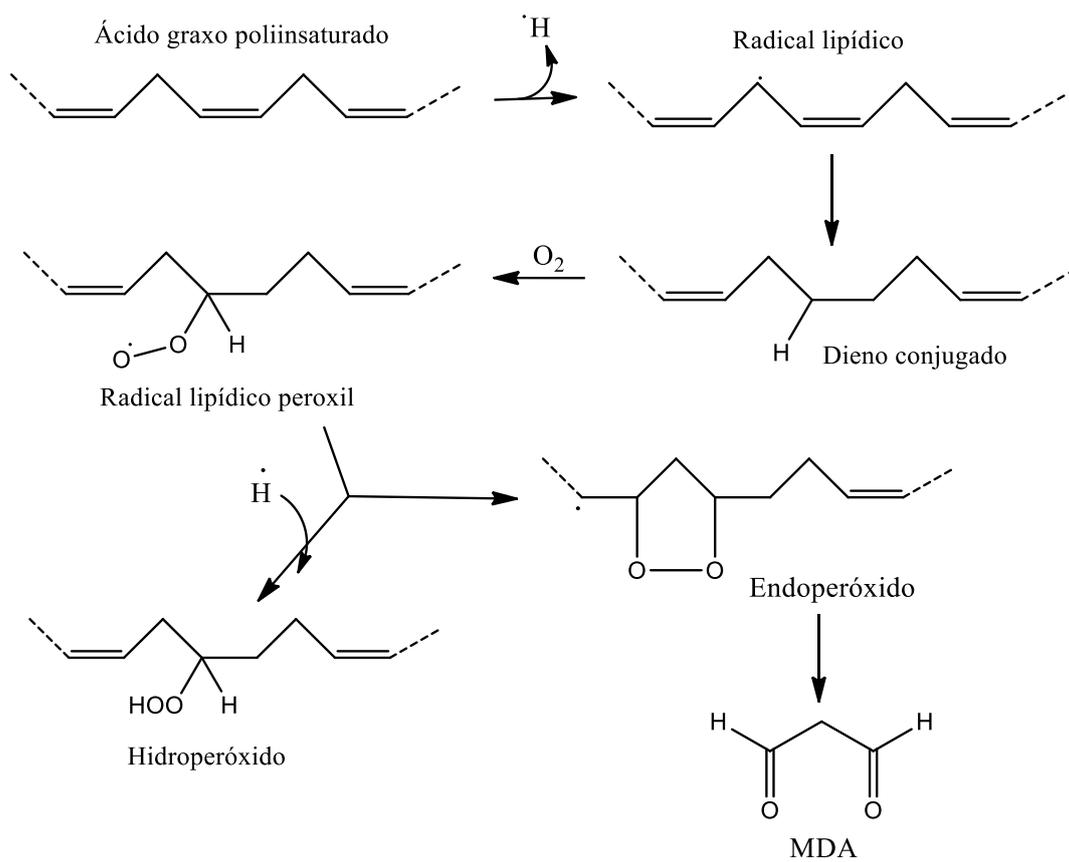


Figura 11 - Reação de oxidação de ácido graxo poliinsaturado resultando na formação de MDA.

Fonte: Figura do autor.

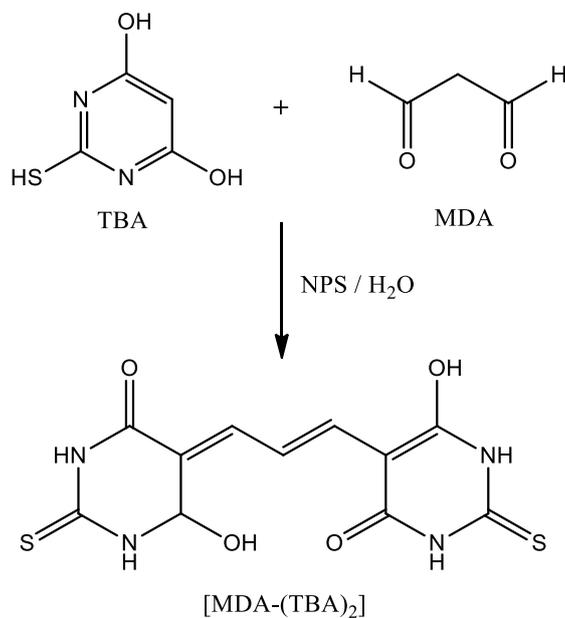


Figura 12 - Reação de formação do complexo [MDA-(TBA)<sub>2</sub>] de coloração vermelha ou rosa.

Fonte: Figura do autor.

#### 2.7.4. Atividade mimética à SOD

A inibição da autooxidação do pirogalol é vista como mimética à atividade da enzima SOD, uma enzima capaz de converter  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Marklund and Marklund (1974) citam em seu trabalho que o oxigênio total consumido aumenta conforme o aumento da concentração de pirogalol, então quando na ausência de  $O_2$  a reação para, como na atividade da SOD quando todo  $O_2^{\cdot-}$  foi convertido à  $O_2$ . Conforme a reação acontece, a solução de pirogalol fica cada vez mais amarela acastanhada, devido a sua autooxidação com a formação do produto quinona. Devido a este fato, pode-se medir a concentração da quinona formada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm (Lim, Cho, Choi, & Kim, 2010; Ramasarma et al., 2015; Székács et al., 2019).

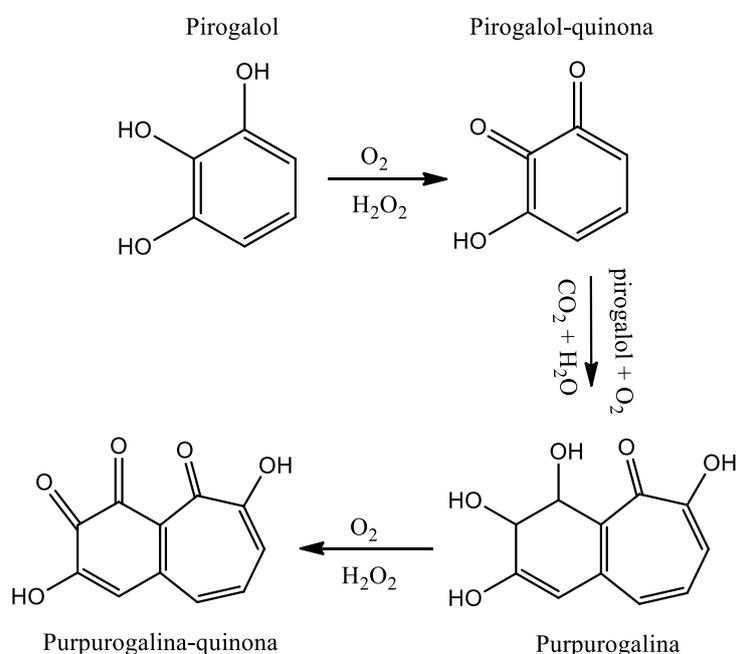


Figura 13 - Reação proposta para a autooxidação do pirogalol.

Fonte: Figura do autor.

#### 2.7.5. Ensaio de carbonilação de proteínas

A carbonilação de proteínas induzida por ERO é irreversível. Pode ser resultado tanto de uma clivagem oxidativa quanto de ataques a cadeias laterais de alguns aminoácidos como a lisina, arginina, prolina ou treonina. Carbonilas de proteínas são os biomarcadores mais utilizados para medir dano oxidativo em proteínas, geralmente por testes colorimétricos, contudo outras metodologias como ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) também podem ser

empregadas. No ensaio de carbonilação de proteínas podem ser empregados tecidos biológicos, como o fígado por exemplo. Então um indutor de oxidação (geralmente NPS) é adicionado junto à molécula de estudo com potencial antioxidante, com a finalidade de proteger contra a carbonilação das proteínas presentes na amostra biológica. É uma metodologia que exige mais tempo do pesquisador, porém é de grande confiabilidade. O reagente 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) é parte fundamental neste ensaio, pois ele possibilita a formação de um complexo colorido amarelado com grupos carbonila com possível leitura em espectrofotômetro (370 nm) (Fig. 14) (Dalle-Donne et al., 2006; Luo & Wehr, 2009; Rabek, Boylston Iii, & Papaconstantinou, 2003; Ruiz-Ojeda, Olza, Gil, & Aguilera, 2018).

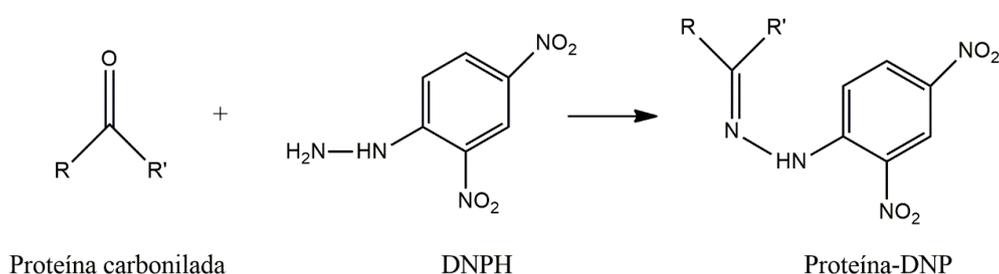


Figura 14 - Reação da proteína carbonilada com o DNPH formando o complexo de cor Proteína-DNP.

Fonte: Figura do autor.

### 2.7.6. Atividade mimética à GST

As GSTs são as principais proteínas solúveis do fígado envolvidas na detoxificação celular de compostos eletrofílicos, os quais são gerados intracelularmente ou encontrados na forma de xenobióticos. Essas proteínas são encontradas em diferentes formas, chamadas de isoenzimas, as quais fazem parte da família do tripeptídeo GSH. As GSTs envolvem a GSH em reações de oxi-redução e a formação de conjugados, e são importantes contra o estresse oxidativo (M. C. L. Torres, Soares, & Pereira, 2006).

No ensaio de atividade mimética à GST, há reação de conjugação da GSH ao 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CNDB), formando o aduto glutathiona-2,4-dinitrobenzeno (Fig.14). A medida que o tempo passa, a concentração do aduto tende a aumentar, pois a concentração do complexo conjugado GST-CNDB é proporcional à taxa da reação. Quando se investiga potenciais moléculas antioxidantes nesse ensaio, o resultado esperado é que os compostos consigam

agir como a GST, formando conjugados com o CNDB ao longo do tempo. Os resultados são expressos em  $\Delta\text{abs}/\text{min}$ , sendo utilizado espectrofotômetro em 340 nm (Henson, Stauffer, & Gallagher, 2001; Kanai, Takahashi, & Inoue, 2006; Luchese, Brandão, Acker, & Nogueira, 2012).

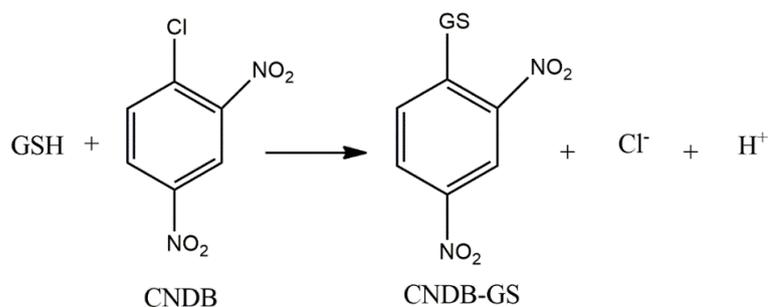


Figura 15 - Reação de conjugação da GSH com CNDB formando o complexo CNDB-GS.

Fonte: Figura do autor.

## 2.8. Toxicidade

Diferentes moléculas químicas sintéticas têm sido produzidas. A avaliação de sua toxicidade é de grande importância para que seja assegurado que seus efeitos serão, em sua maioria, benéficos ao organismo. Protocolos como o de nº 423 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) orientam e auxiliam pesquisadores a como proceder na testagem de novas substâncias.

As respostas bioquímicas do organismo são empregadas no diagnóstico preliminar de toxicidade química. Os biomarcadores representam respostas que podem ser mensuradas se mostrando ferramentas adequadas para analisar diferentes tipos de toxicidade em diferentes órgãos. O fígado é um órgão central na produção de metabólitos tóxicos referente às drogas e interações medicamentosas, visto que em sua maioria impede a ação de toxinas no corpo e gera resíduos metabolizados que serão eliminados através da bile e da urina (Lala, Goyal, Bansal, & Minter, 2022; Ribeiro, Yang, Patel, Madabushi, & Strauss, 2019; Tran & Tran, 2021).

As enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) são utilizadas como biomarcadores de lesão hepática. Sua concentração plasmática/sérica aumenta quando há um grande número de células hepáticas danificadas, gerando o extravasamento destas transaminases para a corrente

sanguínea. A AST e ALT são importantes pois atuam transferindo um grupo amino de um aminoácido para a  $\alpha$ -cetoglutarato, resultando na produção de piruvato ou oxaloacetato, e L-glutamato. No geral, estas enzimas e seus produtos estão envolvidos em vários processos celulares, funções fisiológicas, no metabolismo de aminoácidos e na homeostase energética. As transformações de ambas enzimas ocorrem, em especial, no fígado, especificamente nos hepatócitos, e então os produtos são transportados para outros locais do organismo através da corrente sanguínea (Lala et al., 2022; Martin-Morales et al., 2021; McGill, 2016).

Os rins têm função de filtração, de excreção dos resíduos metabólicos e substâncias químicas estranhas ao organismo, regulação da concentração de eletrólitos osmóticos. A creatinina e a ureia são eliminadas pelos rins, e elevações em seus níveis sanguíneos são um sinal de mau funcionamento dos rins. A creatinina é o produto residual do tecido muscular, enquanto a ureia é o produto final do metabolismo de proteínas. Ambas substâncias são formadas no fígado, filtradas pelos rins e excretadas por meio da urina, servindo então de biomarcadores de dano renal (Emeigh Hart, 2010; Martin-Morales et al., 2021).

Em avaliações da toxicidade de novas moléculas não podem ser considerados apenas os resultados de dosagens dos biomarcadores, também é importante que se avalie ocorrência ou ausência de óbitos, o consumo alimentar e hídrico, o peso corporal, bem como outros tipos de comportamentos e a aparência geral dos animais tratados, todos estes considerados parâmetros relevantes para este tipo de avaliação (OECD, 2002; Tran & Tran, 2021).

## **2.9. O elemento selênio (Se)**

O Se é um oligoelemento considerado um antioxidante mineral, está presente em diversos alimentos potencialmente consumidos no dia-a-dia. Ele é uma parte fundamental de diversas enzimas endógenas, está presente macromoléculas como proteínas formando as selenoproteínas. Estudos têm examinado o potencial de moléculas contendo Se em sua estrutura química como, por exemplo, no tratamento para a ansiedade, depressão, doenças neurodegenerativas, prevenção de câncer, inflamação, controle de doenças cardíacas e hepatoproteção utilizando tanto nanopartículas de Se quanto o elemento junto a outras substâncias. (Amin, Hashem, Alshehri, Awad, & Hassan,

2017; da Silva Teixeira Rech et al., 2021; Luchese et al., 2012; Shafik & El Batsh, 2016; Sindhi et al., 2013; D. J. Torres et al., 2021).

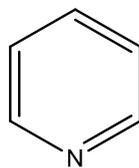
O estresse oxidativo está intimamente ligado ao surgimento e agravamento de diversas doenças, e os antioxidantes são extremamente importantes no combate a elas. No organismo, o Se é empregado na síntese do aminoácido selenocisteína (Sec), que é associado a selenoproteínas, as quais existem 25 isoformas. As selenoproteínas mais conhecidas são as das subfamílias da glutathione como a GPx que reduz  $H_2O_2$ , as tioredoxinas redutases (TrxR). O fígado consegue secretar a selenoproteína P (selenoP) que atua como transportador de Se, através da corrente sanguínea para diversos órgãos. O cérebro retém a maior quantidade de Se advindo da alimentação. Devido ao alto consumo de  $O_2$ , a selenoP interage com o receptor apolipoproteína 2 (ApoER2) com a finalidade de liberar o Se no órgão e protegê-lo contra o estresse oxidativo (Burk et al., 2014; D. J. Torres et al., 2021).

O composto sintético ebselen e o aminoácido selenometionina (SeMet) reagem rapidamente com ONOOH e outros oxidantes, para protegerem proteínas plasmáticas como, por exemplo, as envolvidas na sinalização intracelular (Casaril et al., 2017; Rusetskaya, Fedotov, Koftina, & Borodulin, 2019; Storkey et al., 2015).

## **2.10. O anel de seis membros piridina**

A piridina consiste em um anel de seis membros que possui o átomo N, e é considerado heteroátomo de estrutura simples e importante. É frequentemente encontrada como parte da estrutura de vitaminas, no sistema redox NADP/NADPH, e vários alcalóides, sendo importante em diversas atividades biológicas. Os derivados de piridina possuem diversas aplicações farmacológicas, e quando no organismo são metabolizadas pelas vias de oxidação e metilação, formam íons piridínicos. Anéis piridínicos podem se tornar mais resistentes às mudanças metabólicas no organismo, aumentando sua funcionalização principalmente contra a oxidação. Quando interagem com ácidos fortes, as piridinas formam sais estáveis, sendo então empregadas como neutralizadores de ácidos. Quando sofrem ação de radicais livres, há interação por meio de ataques eletrofílicos, nucleofílicos e formam ligações de substituição, sulfonação, nitração, oxidação e halogenação. Diversos

medicamentos disponíveis e seguros para o uso contém o anel piridínico como, por exemplo, o omeprazol, membros da classe das tiazolidinediona para tratamento de diabetes do tipo II, entre outros (Baumann & Baxendale, 2013; D. L. Comins, O'Connor, & Al-awar, 2008; Hu et al., 2014; Katritzky et al., 2010).



Piridina

Figura 16 - Estrutura química da piridina.

Fonte: Figura do autor.

### 2.11. Sais de piridínio contendo Se

Os sais de piridínio contendo Se são intermediários na síntese de indolizinas. São heterociclos que contém N, Se, e substituintes como Cl ou CH<sub>3</sub> ligados a um anel aromático. São medianamente solúveis em água, os sais podem sofrer reações de oxidação e redução principalmente envolvendo o N presente na piridina (Daniel L. Comins & Joseph, 1996; Scriven, 1984). São compostos ainda pouco estudados, a maioria dos estudos relata sua eficiência na atividade antimicrobiana, na interação com membranas celulares (Alptuzun et al., 2009; Penteado et al., 2019).

Os sais de piridínio estudados neste trabalho possuem as seguintes nomenclaturas: **3A** Brometo de 1-(2-oxo-2-feniletíl)-2-((fenilselanil)metil)piridín-1-io, **3B** Brometo de 1-(2-oxo-2-(p-tolil)etil)-2-((fenilselanil)metil)piridín-1-io, **3C** Brometo de 1-(2-(4-clorofenil)-2-oxoetil)-2-((fenilselanil)metil)piridín-1-io. As estruturas de cada um dos compostos estão indicadas na Fig. 17.

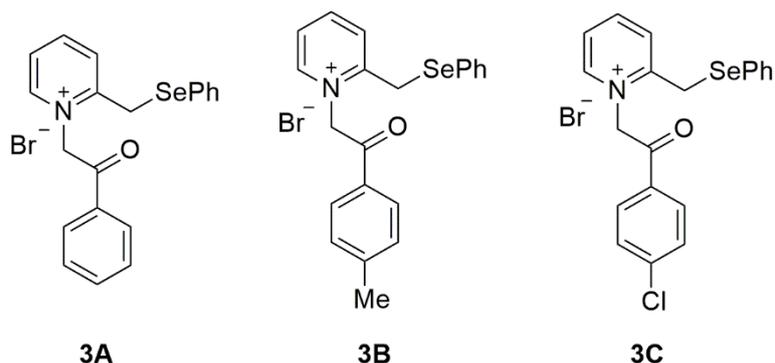


Figura 17 - Estrutura química dos três sais de piridínio.

Fonte: Figura do autor.

Tendo em vista a importância do fígado para funções fundamentais do organismo e a sua particular susceptibilidade ao estresse oxidativo devido à alta atividade metabólica, o que contribui para a injúria hepática, bem como a possível aplicabilidade dos sais de piridínio por conterem em sua estrutura o elemento Se e o anel piridínico, o nosso grupo optou por estudar seus potenciais efeitos antioxidantes *in vitro* em tecido hepático de camundongos e os mecanismos de ação antioxidante. Além disso, um promissor sal foi escolhido para investigarmos se exerceria toxicidade oral aguda em camundongos *Swiss* fêmeas.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi investigar a atividade antioxidante *in vitro* de três sais de piridínio contendo selênio em tecido hepático, possíveis mecanismos relacionados à ação antioxidante e potencial toxicidade *in vivo* de um dos compostos.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Investigar a atividade antioxidante dos três compostos frente à lipoperoxidação e à carbonilação de proteínas em fígado de camundongos *in vitro*;
- Testar a capacidade *scavenger* de radicais ABTS e DPPH;
- Testar se algum dos três compostos possuem capacidade mimética às enzimas SOD e GST;

- Investigar a segurança de um dos três compostos através de um ensaio de toxicidade oral aguda em camundongos Swiss fêmeas.

#### 4. Manuscrito

### Evaluation of the *in vitro* antioxidant activity and toxicity potential of selenium-containing pyridinium salts

Ediandra Tissot Castro<sup>a</sup>, Amália Gonçalves Alves<sup>a</sup>, Daniela de Bittencourt Maia<sup>a</sup>, Larissa Sander Magalhães<sup>a</sup>, Mariana Parron Paim<sup>a</sup>, Filipe Penteado<sup>b</sup>, Caroline Signorini Gomes<sup>b</sup>, Eder João Lenardão<sup>b</sup>, César Augusto Brüning<sup>a\*</sup>, Cristiani Folharini Bortolatto<sup>a\*</sup>

*Running title: Se-based pyridinium salts as antioxidant agents*

<sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), p.o. box 354. CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ), Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), p.o. box 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil

#### \*Address for correspondence

**Cristiani Folharini Bortolatto** - Post-Graduation Program in Biochemistry and Bioprospecting (PPGBBio), Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences (CCQFA), Federal University of Pelotas (UFPel), p.o. box 354, 96010-900, Capão do Leão Campus, Pelotas, RS, Brazil. Phone: 55-53-32757355. ORCID: 0000-0002-9509-4446. Electronic address: cbortolatto@gmail.com (main); cristiani.bortolatto@ufpel.edu.br (secondary)

**César Augusto Brüning** - Post-Graduation Program in Biochemistry and Bioprospecting (PPGBBio), Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences (CCQFA), Federal University of Pelotas (UFPel),

p.o. box 354, Capão do Leão Campus, Pelotas, RS, 96010-900, Brazil. Phone: 55-53-32757355. ORCID:  
0000-0003-0814-0203. Electronic address: cabruning@yahoo.com.br

## Abstract

Redox imbalance leads to oxidative stress that causes irreversible cellular damage. The incorporation of the antioxidant element selenium in the structure of pyridinium salts has been used as a strategy in chemical synthesis, and can be useful in drug development. We investigated the antioxidant activity of selenium-containing pyridinium salts (named compounds **3A**, **3B**, and **3C**) through *in vitro* tests. The application of efficient, fast, relatively low-cost methods, easy reproducibility and minimal use of animals were considered when choosing the methodologies. We focused our study on liver protein carbonylation, liver lipoperoxidation, DPPH, ABTS, GST-like and SOD-like assays. Besides, the compound with the best antioxidant profile, 1-(2-(4-chlorophenyl)-2-oxoethyl)-2-((phenylselanyl)methyl)pyridin-1-ium bromide (**3C**), was selected to evaluate the acute oral toxicity in mice. The three compounds were effective in reducing the levels of protein carbonylation and lipoperoxidation in the liver in a  $\mu\text{M}$  concentration range. All compounds demonstrated scavenger activity of DPPH and ABTS radicals, and GST-like action. No significant effects were detected in SOD-like assay. Experimental data also showed that the oral acute treatment of mice with the compound **3C** (50 and 300 mg/kg) did not cause mortality or change markers of liver and kidney functions. In summary, our findings reveal the antioxidant potential of selenium-containing pyridinium salts in liver tissue, which could be related to their radical scavenging ability and mimetic action to the GST enzyme. They also demonstrate a low toxicity potential of compound **3C**. Together, the promising results open space for future studies on the therapeutic application of these molecules.

**Keywords:** pyridinium salts; selenium; antioxidant activity; liver; oral toxicity.

## 1. Introduction

Oxygen is an oxidizing agent essential for aerobic life. However, it is a highly reactive element because it has unpaired electrons and therefore easily receives electrons from a potential electron-donor (Gulcin, 2020; Zhang et al., 2019). Reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS) are normally produced in the organism. In a balance with the antioxidant system, they act in the maintenance of cellular homeostasis. The imbalance between the production of oxidizing agents and the antioxidant system is called oxidative stress, *i.e.*, the ROS and RNS are in greater quantity than the antioxidant systems can handle to neutralize them (Gulcin, 2020; Munteanu and Apetrei, 2021; Sindhi et al., 2013). The high levels of ROS in the body leads to dysregulation of cellular functions, structural modification of macromolecules, tissue damage, acceleration of cell death, and also the emergence of several diseases (Gulcin, 2020; Murphy et al., 2011; Sindhi et al., 2013; Zhang et al., 2019).

Non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD) like simple steatosis and steatohepatitis are related to the action of free radicals. These radicals can be a result of sub-products of the energy metabolism of some liver cells, resulting in a disequilibrium of liver functions causing the liver to become overworked (Arab et al., 2018; Chen et al., 2019; Chen et al., 2020). To find new treatments and possible preventions, researchers are looking for alternatives that control oxidative stress without altering homeostasis in order to preserve cells and tissues (Alam et al., 2013; Zhang et al., 2019). The use of *in vitro* tests has contributed to investigating potential molecules with antioxidant effects, as a lot of them are relatively cheap, simple, fast, easily reproducible, reliable, widely present in the literature, and because they do not require a large use of animals (Alam et al., 2013; Nwachukwu et al., 2021; Pinchuk et al., 2012).

The trace element selenium (Se) is of great importance for the maintenance of human health. It is an essential micronutrient known by its functions on redox balance, being able to protect against oxidative stress and inflammation. Selenium is present in mammals as the amino acid selenocysteine, which is incorporated into selenoproteins, among which the glutathione peroxidase (GPx) and thioredoxin reductase (TR) subfamilies stand out (Solovyev, 2015; Torres et al., 2021). Natural and synthetic organic Se-containing compounds have attracted a growing interest in therapeutic areas, and studies have showed that incorporation of Se atom into small molecules significantly enhanced their bioactivities (Chuai et al., 2021; Lenardão et al., 2018).

Heterocycles containing the nitrogen atom are widely present in nature, and due to their diverse biological properties, are part of many drugs currently available (Baumann and Baxendale, 2013; Vitaku et al., 2014). The cyclic unit containing the nitrogen heteroatom pyridine is the second most common structure (about 62%) present in drugs that are approved by the USA Food and Drug Administration (FDA). This pharmacophoric group can be easily derivatized and functionalized with different substituents, thus improving several of its biological activities, such as the antioxidant one (Alptuzun et al., 2009; Hu et al., 2014; Podlekareva et al., 2016; Sajja et al., 2016; Santhosh Kumar et al., 2018; Vitaku et al., 2014). Pyridine occurs naturally in compounds such as vitamins, in the redox system such as NADP/NADPH, and is easily metabolized through oxidation or methylation pathways (Baumann and Baxendale, 2013).

Salts are often formed to achieve desirable formulation properties of active pharmaceutical ingredients, such as improved solubility (Gupta et al., 2018). Pyridinium salts are middling soluble in water, and this property can facilitate their application *in vivo*, reducing possible toxic effects in the organism, and allowing a slow dissolution, making them prolonged action agents (Allen, 1998; Comins et al., 2008; Keay, 1991).

Recently, selenium-containing pyridinium salts were used as intermediates in the synthesis of differently substituted selanylindolizines, such as phenyl, chlorophenyl and tolyl derivatives (Penteado et al., 2019). In the present study, we have investigated the antioxidant potential of three selenium-containing pyridinium salts by *in vitro* assays. In addition, the *in vivo* acute toxicity of the compound that best stands out in the *in vitro* tests was investigated using Swiss mice.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male and female Swiss mice weighing 25-35g from the university's central vivarium were used. They were placed in a room for animals under a controlled temperature of  $22 \pm 1$  °C, with a light/dark cycle of 12 hours each cycle (light on at 7:00 a.m.), and with free access to water and standard food. The experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Experiments at the Federal University of Pelotas (UFPEL) under number 027542/2021-11, Brazil, affiliated with the National Council for the Control of Animal Experiments (CONCEA) and in compliance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Liver tissue of mice was used for two *in vitro* assays and plasma for *ex vivo* toxicity assays. All mandatory laboratory health and safety procedures have been complied within the course of conducting any experimental work.

### 2.2. Chemical compounds

The three selenium-containing pyridinium salts tested in this study called 1-(2-oxo-2-phenylethyl)-2-((phenylselanyl)methyl)pyridin-1-ium bromide (**3A**), 1-(2-oxo-2-(*p*-tolyl)ethyl)-2-((phenylselanyl)methyl)pyridin-1-ium bromide (**3B**), and 1-(2-(4-chlorophenyl)-2-oxoethyl)-2-((phenylselanyl)methyl)pyridin-1-ium bromide (**3C**) (Figure 1) were synthesized in the Laboratory of Clean Organic Synthesis (LASOL,

UFPel), as previously described (Penteado et al., 2019). To confirm the chemical structures of the compounds, the techniques of nuclear magnetic resonance of carbon-13 and hydrogen ( $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR) were performed. These salt compounds are reasonably soluble in water and, thus, were dissolved in water for *in vitro* and *in vivo* experiments.

## **2.3. Antioxidant techniques**

### **2.3.1. Protein Carbonylation Assay**

Modified from Levine et al. (1990), it consists in causing oxidative damage to proteins present in biological tissues. The ability of the compounds to protect against protein carbonylation was analyzed using mouse liver. The homogenates were prepared according to the literature, diluted in the proportion of 1:10 (weight/volume) in Tris/HCl 10 mM pH 7.4. On appropriate test tubes, the compounds were pipetted at the concentrations of 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ , the vehicle (water) was added into the control tube, followed by the homogenate in all. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), a water-soluble analogue of vitamin E, was used as a positive control (100  $\mu\text{M}$ ). Sodium nitroprusside (NPS) was used as an inducer of protein carbonylation. This content was incubated for 2 hours at 37 °C, then 2M hydrochloric acid (HCl) was added to the white tubes, and 2,4-dinitrophenylhydrazine color reagent (DNPH) to the test tubes, keeping them in the absence of light for 1 hour. During this period, they were stirred every 15 min. Then, 500  $\mu\text{L}$  of denaturation buffer, 1.5 mL of ethanol together with 1.5 mL of hexane were added to all tubes, which were then shaken for 40 sec each. The tubes were centrifuged at 2500 rpm for 15 min, to form the pellet, which was washed twice with 1 mL of a 1:1 ethanol/ethyl acetate mixture, allowed to dry for 2 min, and resuspended the tube pellet in 1 mL of denaturation buffer. Absorbance reading was performed in a spectrophotometer at 370 nm. Each experiment was performed three or

four times (N = 3-4) in duplicate on different days. Results were expressed in nmol carbonyl/mg protein.

### **2.3.2. Lipoperoxidation assay (TBARS)**

In this technique, the lipoperoxidation was tested through the quantification of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), according the method described by Ohkawa et al. (1979). It was analyzed whether the compounds of interest would have the ability to protect against lipoperoxidation induced by NPS in liver tissue. To this assay, the compounds were pipetted at the concentrations of 5, 10, 25, 50, 100, 200, and 500  $\mu$ M. Trolox was used as a positive control (100  $\mu$ M). The liver, removed from the mice according to the protocol, was homogenized in Tris/HCl 50 mM pH 7.4, centrifuged (2500 rpm, 10 min), and added to all tubes together with the inductor NPS at a concentration of 2 mM. The reactional medium was incubated in a bath at 37 °C for 1 h. After which, 8.1% SDS, 0.8% thiobarbituric acid (TBA), and acetic acid buffer pH 3.4 were added and incubated in a bath 100 °C for another 1 h. After this time, the absorbance of the reaction product was read in a spectrophotometer at a wavelength of 532 nm, the results were expressed in nmol TBARS/g tissue. Each experiment was performed four times (N = 4) in duplicate on different days.

### **2.3.3. ABTS radical scavenger activity**

This *in vitro* assay adapted from Re et al. (1999), consists of evaluating the potential of the compound of interest to reduce the oxidized form of the synthetic 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical. In different properly identified test tubes, 10  $\mu$ L of ascorbic acid (AA) at 10  $\mu$ M (a positive control), the vehicle (water), or the compounds to be tested (**3A**, **3B** and **3C**) at different concentrations (5, 10,

25, 50 and 100  $\mu\text{M}$ ) were added. The ABTS solution (42  $\mu\text{M}$ ) was pipetted into all tubes, incubated for 30 min at room temperature, and protected from light. Each experiment was performed in duplicate and repeated four times ( $N = 4$ ) on different days. Absorbance was read at 734 nm, and the spectrophotometer was reset with distilled water. The results were calculated as a percentage of the blank (vehicle group, considered 100%).

#### **2.3.4. DPPH radical scavenger activity**

The scavenger activity of the synthetic radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil (DPPH) was modified from Sharma and Bhat (2009). This technique is usually used to verify if different compounds have the ability to reduce the oxidized form of the synthetic radical DPPH. Assays were performed in duplicates and repeated four times ( $N = 4$ ) being conducted in different days. In test tubes, 10  $\mu\text{L}$  of positive control AA (10  $\mu\text{M}$ ), vehicle (water) or compounds of interest (**3A**, **3B** and **3C**) at the concentrations of 5, 10, 25, 50 and 100  $\mu\text{M}$  were pipetted. Afterward, the solution containing the DPPH radical (50  $\mu\text{M}$ ) was pipetted into all test tubes, incubated for 30 min at 30  $^{\circ}\text{C}$  in the dark. Absorbance was read at 517 nm, resetting the spectrophotometer with distilled water. The results were calculated as the percentage of the eliminated radical using the blank reading value as 100% (vehicle group).

#### **2.3.5. Glutathione S-transferase (GST) mimetic activity**

According to Habig et al. (1974), the reaction between reduced glutathione (GSH) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) is usually used to measure the catalysis transmitted by glutathione S-transferase (GST). In this sense, the compounds of interest were tested in order to verify whether they are GST-mimics. The different compounds were prepared at the concentrations of 5, 10, 25, 50, and 100  $\mu\text{M}$ . In this experiment,

diphenyl diselenide [(PhSe)<sub>2</sub>] served as a positive control at the concentrations of 50 μM (Luchese and Nogueira, 2010). Initially, the compounds were pipetted at different concentrations, and soon after, the sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.9), water, and then GSH (2 mM, diluted in water). The tubes were incubated in a water bath at 25 °C for 3 min. After this time, the reaction was started by adding CDNB and it was followed in a spectrophotometer at 340 nm for 3 min, recording the values at times of 0 and 180 sec. The spectrophotometer was reset with sodium phosphate buffer. Each experiment was performed four times (N = 4) in different days, and in duplicate. Results were expressed in Δabs/min.

### **2.3.6. Superoxide dismutase (SOD) mimetic activity**

Based on Marklund and Marklund (1974), this technique aims to measure the antioxidant activity of compounds through its ability to inhibit the self-oxidation of pyrogallol, a reaction that is catalyzed by superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Compounds **3A**, **3B**, and **3C** were pipetted in test tubes at the concentrations of 5, 10, 25, 50, 100 μM, and for the positive control (AA) was pipetted at 200 μM. Tris-HCl (pH 8.5) and pyrogallol were added to all tubes. The reading of the absorbance of the samples was performed in a spectrophotometer at 420 nm for 2 min, observing the absorbance values every 15 min at room temperature. The experiment was carried out in duplicate three times (N=3) in different days.

### **2.4. Assessment of acute oral toxicity**

Based on the *in vitro* results, we selected the compound **3C** to explore its potential to cause acute oral toxicity aiming to study pharmacological actions in future studies. For this purpose, the guideline of Acute Toxicity Class Method was performed according to

protocol 423 of the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, 2002), employing female Swiss mice which are normally used because although there is little difference in sensitivity between the sexes, in those cases where differences are observed, females are generally slightly more sensitive.

This protocol was performed in two steps of experiments for each dosage of the compound (50 or 300 mg/kg). For each step, the animals were randomly separated into two groups containing 3 animals each (totaling 6 animals/group at the end of the 2 steps). They had an adaptation time of 5 days to cages and experimental room with water and food available *ad libitum*. After this period, mice underwent 4 hours of fasting, and then they were weighted and initially treated with the compound **3C** at the dose of 50 mg/kg (start dose) or vehicle (water) by oral route (gavage). Based on apparent security of the start dose, a second experiment was conducted using a higher dose (300 mg/kg), the dose was fractionated into 3 oral administrations of 100 mg/kg at a volume of 10 mL/kg with an interval of 30 min each.

The animals were observed with a bulletin for 4 hours to check for mortality and other typical signs of toxicity, and for 14 days they were daily monitored for dietary control, body weight, and the appearance or not of behavioral changes, lethargy, diarrhea, and piloerection. On the 15<sup>th</sup> day, the animals went through the open field test (OFT), which, according to Walsh and Cummins (1976), serves to assess possible locomotor alterations (number of crossings and rearings). After OFT, mice were anesthetized with isoflurane, and the heparinized blood was collected through a cardiac puncture. Plasma was obtained by centrifugation (2500 rpm, 10 min) and used for biochemical analysis of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities (liver function tests) and urea levels (kidney function test). All tests were performed in duplicate using Labtest<sup>®</sup> commercial kits.

## 2.5. Statistical analysis

The experimental results were performed by the GraphPad Prism software (version 8.0.2.) and expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.). D'Agostino Pearson normality test was applied to test if the data are normally distributed. One-way analysis of variance (ANOVA) was applied to test for significant differences among groups, followed by the application of Tukey's or Dunnett's *post hoc* tests. When appropriate, the unpaired *t*-test was used. Probability values less than 0.05 ( $p < 0.05$ ) were considered statistically significant.

Calculation of the half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) values, a measure of the effectiveness of a compound in inhibiting biological/biochemical function, was performed by a percentage of inhibition *versus* concentration, followed by non-linear regression using GraphPad prism software.

## 3. Results

### 3.1. *In vitro* experiments: antioxidant activity

#### 3.1.1 Protein Carbonylation

The results of protein carbonylation assay for the compounds **3A**, **3B** and **3C** are demonstrated in Figure 2A, B and C, respectively. NPS induced oxidation of proteins in the liver homogenate when compared with the control group (C). The compound **3A** at the concentration of 50  $\mu$ M [ $F_{(7,16)} = 8.833$ ,  $p = 0.0002$ ], and the compounds **3B** [ $F_{(7,24)} = 7.645$ ,  $p < 0.0001$ ] and **3C** [ $F_{(7,24)} = 6.909$ ,  $p = 0.0001$ ] at a concentration of 25  $\mu$ M, were able to reduce the amount of carbonylated protein when compared with the NPS induced group (I). The positive control trolox at a concentration of 100  $\mu$ M was effective in reducing the protein carbonylation.

### 3.1.2. TBARS

TBARS measure was employed to test the ability of compounds to prevent NPS-induced lipid peroxidation in liver tissue. As expressed in Figure 3, the three compounds were effective in totally protecting against the increased lipoperoxidation at the concentrations of 200 and 500  $\mu\text{M}$  [**3A**  $F_{(9,29)} = 54.07$ ,  $p < 0.0001$ ; **3B**  $F_{(9,29)} = 32.94$ ,  $p < 0.0001$ ; **3C**  $F_{(9,29)} = 55.44$ ,  $p < 0.0001$ ]. In addition, there was a partial protection by the compounds **3A** and **3C** at 100  $\mu\text{M}$ .

### 3.1.3. DPPH radical scavenger activity

Compounds **3A** and **3B** (Figures 4A and B, respectively) were able to scavenge DPPH radicals at concentrations from 10  $\mu\text{M}$  [**3A**  $F_{(6,21)} = 177.7$   $p < 0.0001$ ; **3B**  $F_{(6,21)} = 118.43$ ,  $p < 0.0001$ ]. Compound **3C** (Figure 4C) showed a statistically significant difference from the concentration of 5  $\mu\text{M}$  [ $F_{(6,21)} = 211.6$ ,  $p < 0.0001$ ]. The positive control (AA, 10  $\mu\text{M}$ ), as expected, also had a significant scavenging effect. The  $\text{IC}_{50}$  values in the DPPH test indicated that compound **3C** was the one with the lowest  $\text{IC}_{50}$  value among the three compounds: 27.94 (25.60 - 30.45)  $\mu\text{M}$ . For compound, **3A** it was 38.89 (35.35 - 42.76)  $\mu\text{M}$ , and for **3B** was 28.86 (25.53 - 32.71)  $\mu\text{M}$ .

### 3.1.4. ABTS radical scavenger activity

In Figures 5A, B, and C, it is observed that all tested compounds showed the ability to scavenge ABTS radicals. The compound **3A** presented significant radical scavenging ability from the concentration of 25  $\mu\text{M}$  [ $F_{(6,20)} = 79.96$ ,  $p = 0.0001$ ], while the compounds **3B** [ $F_{(6,20)} = 19.76$ ,  $p = 0.0001$ ] and **3C** [ $F_{(6,20)} = 140.2$ ,  $p < 0.0001$ ] demonstrated this ability from the concentration of 10  $\mu\text{M}$ . The positive control (AA), as expected, also demonstrated scavenging activity at 10  $\mu\text{M}$ .  $\text{IC}_{50}$  values for the ABTS test indicated that

compound **3C** was the one with the lowest values among the three compounds, of 17.40 (15.64 - 19.34)  $\mu\text{M}$ . For compound **3A** the value was 26.24 (22.38 - 30.47)  $\mu\text{M}$ , and for **3B**, 21.55 (15.10 - 30.34)  $\mu\text{M}$ .

### 3.1.5. GST-like activity

This assay aimed to test whether the compounds could have a mimetic activity to GST, an antioxidant enzyme which promotes the conjugation of GSH to potentially dangerous metabolites, forming less reactive and easily excreted species. All compounds were effective in acting mimetically to GST at the concentrations of 25, 50, and 100  $\mu\text{M}$  when compared with the blank (B) [**3A**  $F_{(7,23)}= 33.34$ ,  $p<0.0001$ ; **3B**  $F_{(7,23)}= 23.80$ ,  $p<0.0001$ ; **3C**  $F_{(7,23)}= 42.64$ ,  $p<0.0001$ ]. The organoselenium compound (PhSe)<sub>2</sub> (50  $\mu\text{M}$ , a positive control) demonstrated GST-like action as previously reported, validating our findings (Figure 6).

### 3.1.6. SOD-like activity

This test evaluated the possibility of the compounds to act mimetically to SOD enzyme, through the inhibition of pyrogallol autoxidation by superoxide anion neutralization. The positive control AA at the concentration of 200  $\mu\text{M}$  had a significant effect. However, none of the tested salt compounds was able to inhibit pyrogallol autoxidation (Figure 7) [**3A**  $F_{(7,16)}= 5.010$ ,  $p=0.0037$ ; **3B**  $F_{(7,16)}= 2.966$ ,  $p=0.0340$ ; and **3C**  $F_{(7,16)}= 2.441$ ,  $p=0.0661$ ].

## 3.2. Assessment of acute oral toxicity parameters

Based on *in vitro* results, the compound **3C** was selected for *in vivo* analyses, and toxicity parameters of female mice orally treated with the compound **3C** (50 or 300

mg/kg) were evaluated. The exposure of animals to both doses did not cause mortality nor lethargy, diarrhea, and piloerection. Furthermore, no significant differences were found in body weight gain of animals treated with 50 mg/kg (Figure 8A) or 300 mg/kg (Figure 8B). The water consumption remained unaltered after both treatments (Figures 8C and D); however, the highest dose (Figure 8E) caused a reduction of food intake ( $t=17,13$ ;  $p=0.0034$ ) which seems to result in a slight tendency towards less weight gain.

Fourteen days after exposure to compound **3C**, animals were tested in the OFT (Figure 9). Data analyses did not detected significant differences between the experimental groups, although is observed that animals treated with compound **3C** at 300 mg/kg had a slight tendency to increased locomotor (Figure 9A and B) and exploratory (Figure 9C and D) activities.

No differences between the experimental groups were detected when plasma urea levels (kidney function indicator) were evaluated (Figure 10A and B). Moreover, the treatment of animals with both doses of compound **3C** did not modify the plasma AST (Figure 10C and D) and ALT (Figure 10E and F) activities (liver function markers) when compared with the control group, indicating that the chosen compound has low potential to cause systemic toxicity.

#### **4. Discussion**

The present study demonstrated, for the first time, the *in vitro* antioxidant effects of three selenium-containing pyridinium salts (compounds **3A**, **3B** and **3C**) in liver tissue, evidenced by a reduction of lipoperoxidation and protein carbonylation induced by NPS. Moreover, through additional techniques, our findings revealed that the antioxidant action of these compounds could be related to a radical scavenger ability and to a GST-mimetic action. This study also demonstrated that the salt with the best antioxidant profile (compound **3C**) has a low potential to cause acute toxicity in mice.

Given that the liver is a dynamic organ that performs important metabolic functions, it is especially attacked by ROS. The oxidative stress triggers hepatic damage by inducing irretrievable alteration of lipids, proteins, and DNA contents, and this is one of the pathological mechanisms that results in the initiation and progression of various liver diseases. Consequently, antioxidants have been studied in the prevention and treatment of liver diseases (Li et al., 2015). Here, the protective effects of the compounds **3A**, **3B**, and **3C** were initially tested against different types of oxidative damage (protein carbonylation and lipoperoxidation) in mouse hepatic tissue.

Protein carbonylation occurs due to the oxidation of the free amino acid portion (side chains) and amino acid residues present in proteins, with a cascade of reactions involving carbon (COOH), water (H<sub>2</sub>O), transition metals (Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>), and hydroperoxyl radical (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>). Enzymes present in the Krebs Cycle and the electron transport chain can also undergo carbonylation, mainly because they are located near to ROS-generating sites (Dalle-Donne et al., 2006; Luo and Wehr, 2009; Stadtman and Levine, 2003). Protein carbonylation process forms reactive ketones or aldehydes, which can react with DNPH to form hydrazones that can be detected spectrophotometrically. In this study, liver protein carbonylation was induced by SNP, a nitric oxide donor, which in turn is involved in the generation of other reactive species. As detected for trolox, our results demonstrated that the selenium-containing pyridinium salts were effective in reducing the oxidation of liver proteins from concentrations of 25 (compounds **3B** and **3C**) or 50 μM (compound **3A**). These findings suggest the protective potential of these compounds in hepatic conditions involving oxidative damage.

The liver is the main tissue involved in the metabolism of xenobiotics, and the biotransformation of chemicals generates reactive intermediate species, such as electrophilic compounds or free radicals (Singh et al., 2016). The cell membrane is

composed of lipids containing polyunsaturated fatty acids. When oxidizing agents attack the membrane, there is the formation of peroxy lipidic radicals and hydroperoxides causing alteration in membrane permeability, tissue damage, and possibly cell death (Alam et al., 2013; Gulcin, 2020; Mayne, 2003; Wu et al., 2019). In addition, many hepatic conditions such as liver steatosis involve oxidative stress. The  $O_2^{\cdot-}$  radical and  $H_2O_2$ , by-products of the energy metabolism of some liver cells, induce lipotoxicity resulting in the alteration of several liver functions due to their overload. With poor organ functionality, a series of other alterations can be caused, such as the non-synthesis or reduction of the synthesis of selenoproteins (Chen et al., 2019; Chen et al., 2020).

TBARS assay is used to track and monitor the lipid peroxidation process. As a result of the test, there is the production of malondialdehyde (MDA) among other substances which react with TBA. These substances are produced due to the attack of ROS to the double bonds between carbons in lipids with consequent loss of hydrogen and the addition of oxygen in the chain (Aguilar Diaz De Leon and Borges, 2020). In the present study, the compounds **3A** and **3C** showed antioxidant capacity at concentrations ranging from 100-500  $\mu$ M, whereas compound **3B** showed significant effects at the concentrations of 200 and 500  $\mu$ M. These results were validated by the detection of significant effects of the positive control (trolox), and indicate the potential of these salts in protecting against the increased formation of TBARS in mouse liver tissue.

Once the antioxidant action of the salts was detected, the next steps of our study comprised antioxidant techniques that do not use biological tissue, but that could help to explain some possible mechanisms related to their antioxidant action. To defend the organism against the ROS-mediated damage, it is important that good antioxidants are electron donors (SET) or are able to transfer atoms of hydrogen (HAT) (Bursal and Gülçin, 2011; Huang et al., 2018; Huyut et al., 2017; Zhang et al., 2019). Different *in*

*vitro* methods were developed to determine the antioxidant capacity of synthetic, natural compounds, plant extracts, and other types of samples (Huyut et al., 2017; Passari et al., 2020). Assays such as DPPH and ABTS are based on HAT and SET mechanisms, and are simple, economical, fast, efficient, and based on spectrophotometric determinations (Apak et al., 2016; Munteanu and Apetrei, 2021; Shahidi and Ambigaipalan, 2015).

The synthetic DPPH radical is highly stable, and the test is based on the reduction of DPPH in an alcoholic solution. In the presence of a hydrogen donor antioxidant, there is the formation of the non-radical form DPPH-H, and the antioxidant ability is evaluated by measuring the decrease in absorbance as a result of radical scavenging using a spectrophotometer (Gulcin, 2020; Luchese et al., 2012). Our data suggest that the compounds are capable of donating hydrogen to a free radical, given that the compounds showed good DPPH scavenging activity at low concentrations (10  $\mu$ M for compounds **3A** and **3B** and 5  $\mu$ M for **3C**). In this test, the effectiveness of the compounds was accompanied by significant effects of AA, used as a positive control. AA is a potent antioxidant agent easily soluble in water and is present in several foods consumed daily (Gulcin, 2020; Mayne, 2003).

The ABTS method is more reactive, and this methodology involves both HAT and SET reaction mechanisms. The ABTS<sup>•+</sup> radical cation is generated through the reaction with K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, involving the SET mechanism, which then reacts with the antioxidant compounds through the HAT mechanism (Gulcin, 2020). Proving that the three compounds act by these mechanisms, the results revealed significant effects from a concentration of 10  $\mu$ M. The evidence for radical sequestering activity of the salts **3A-C** is reinforced by the positive control AA. Although not evaluated here, other assays that may help in the characterization of the antioxidant action of these compounds in the future

include techniques capable of detecting  $\text{OH}^\bullet$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  sequestering activities, for example (Gülçin, 2012).

Some researchers have bet on compounds that work as antioxidant enzyme mimetics, as reported in the studies of Wu et al. (2019), and Carraro Junior et al. (2021), and some of these molecules are organoselenium derivatives (Bortolatto et al., 2013; Luchese and Nogueira, 2010). In our investigation, we have screened if the selenium-containing pyridinium salts could act similarly to the antioxidant enzymes GST and SOD. GSTs are a family of isoenzymes that act by conjugating substances, having the tripeptide glutathione peroxidase (GSH) as a substrate, and as a result, conjugated products that are water-soluble, less toxic, and easily excreted. Some isoforms of GST are associated with membranes, when oxidative damage by ROS occurs, the enzyme acts in an attempt to minimize the damage caused to proteins and lipids (Cataneo et al., 2003; Kanai et al., 2006; Skopelitou et al., 2012). Subjected to the GST-like test, the pyridinium salts **3A-C** showed good performance from a concentration of 25  $\mu\text{M}$ , since they were able to mediating the conjugation of GSH to CDNB. These data suggest that these compounds have mimetic antioxidant and detoxifying properties to GST isoenzymes. In this context, we highlight the use of  $(\text{PhSe})_2$  in this research as a positive control, chosen after well-established results of Luchese and Nogueira (2010).

In the body, the SOD enzyme has the function of converting superoxide radicals ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) into molecular oxygen ( $\text{O}_2$ ) and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), preventing the generation of reactive  $\text{OH}^\bullet$ . As a possible mechanism of defense against ROS, the ability of the pyridinium salts to inhibit the  $\text{O}_2^{\bullet-}$  catalyzed pyrogallol auto-oxidation was also tested. Called SOD-like assay, it consists of performing a reaction similar to that which occurs in cells (De Lazzari et al., 2018; Székács et al., 2019; Zhang et al., 2019). However,

pyridinium salts did not show SOD mimetic activity, which was observed only for AA (positive control).

Selenium is known by its antioxidant activity, it is part of the structure of antioxidant selenoenzymes, so it can act by restoring enzyme levels when they are diminished due to a large amount of ROS (Burk et al., 2014; Sindhi et al., 2013). In the last years, many bioactive organoselenium compounds have been explored as reagents, catalysts and potential therapeutic substances, the vast majority of which are lipophilic compounds (Lenardão et al., 2018). It is interesting to mention that water-soluble compounds (*e.g.* pyridinium salts) can remain in the body longer and can be protonated and deprotonated to form acids and bases that can be conjugated. Concerning pyridinium salt compounds, Comins et al. (2008) mention that the reactions that can occur with the nitrogen atom are *N*-oxidation, halogenation, acylation, and addition, whereas the possible reactions involving the carbon atoms of the ring occur through electrophilic attacks, nucleophiles, and free radicals. Keay (1991) mentions that the other kinds of pyridinium salts can act by SET or HAT reactions, depending on the reaction conditions such as temperature and solvents used. This information helps to understand how some of the pyridinium salts could act as antioxidants, although more studies are still needed. In our case, the hybrid salt containing both pyridinium and selenium groups, besides the keto-aryl is not a such simple structure to attribute the major contributor to the observed antioxidant activity. If compared the relative activity of compounds **3A-C**, we speculate that the better performance of **3C** in the *in vitro* assays is due to the presence of the electronegative chloro-group at the pendant keto-phenyl substituent. The chlorine atom could contribute, at least in part, to the delocalization of a radical formed in some of the electron-transfer redox reactions.

The evaluation of toxicity of new molecules is of great importance, because even if the compounds present good results *in vitro*, when administered to animals unwanted effects may arise. Indeed, toxicity results help researchers to quickly screen potentially toxic drugs and focus on candidates that are most likely to be clinically tested. Here we conducted an acute toxicity assay indicated by OECD with female rodent in which two doses (50 and 300 mg/kg) were tested. The compound **3C** was selected because it showed the most promising *in vitro* results. Data indicated that the compound **3C** has no potential to cause mortality and behavior changes at both tested doses. Furthermore, compound **3C** did not impair renal and hepatic functions. Urea is widely used as a marker of kidney damage. AST and ALT aminotransferases are biomarkers of hepatocellular injury, so when they levels are altered it is an indication that liver functions may be impaired (Lala et al., 2022). Except for the food intake of animals treated with a high dose of compound **3C** (300 mg/kg), there were no significant differences in water intake, body weight gain and motor function, indicating a low toxicity potential.

## 5. Conclusion

The present study demonstrated the antioxidant activity of pyridinium salts containing selenium through TBARS and protein carbonylation tests in liver tissue. Among three new salts tested, the best in class was 1-(2-(4-chlorophenyl)-2-oxoethyl)-2-((phenylselanyl)methyl)pyridin-1-ium bromide (**3C**). The antioxidant action of the selenium-containing pyridinium salts seems to be mediated, at least in part, by mechanisms involving radical scavenging ability and GST-like action. We also demonstrated a low toxicity potential of compound **3C** in mice. Since hepatotoxicity has been much linked to the oxidative status and deficiencies in antioxidant system, our findings encourage future studies about the hepatoprotective actions of the pyridinium salt **3C** *in vivo*.

## Acknowledgements and Funding details

We gratefully acknowledge Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant numbers 438384/2018-0 and 420386/2018-1), FAPERGS (21/2551-0000614-5 and 21/2551-0000728-1), and FINEP for the financial support. E.T.C. was the recipient of a CAPES fellowship.

### **Disclosure statement**

The authors report there are no competing interests to declare.

### **Contributions and data availability statement**

CFB and CAB conceptualized, and validated the study. CFB and CAB were also responsible for funding acquisition, project administration, supervision, and ethical approval. ETL, FP and CSG contributed to the work by synthesizing the compounds. ETC and her colleagues (AGA, DBM, LSM, MPP) conducted *in vitro* and *in vivo* experiments. CFB and ETC performed statistical analyses, interpreted the results, and wrote the manuscript; CAB and ETL revised it. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

### **References**

- Aguilar Diaz De Leon, J., Borges, C.R., 2020. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *J Vis Exp*.
- Alam, M.N., Bristi, N.J., Rafiquzzaman, M., 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 21, 143-152.
- Allen, L.V., 1998. The art, science, and technology of pharmaceutical compounding. Vol. 2, American Pharmaceutical Association Washington, DC.
- Alptuzun, V., Parlar, S., Tasli, H., Erciyas, E., 2009. Synthesis and antimicrobial activity of some pyridinium salts. *Molecules*. 14, 5203-15.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E., 2016. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64, 997-1027.
- Arab, J.P., Arrese, M., Trauner, M.J.A.R.o.P.M.o.D., 2018. Recent insights into the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. 13, 321-350.
- Baumann, M., Baxendale, I.R., 2013. An overview of the synthetic routes to the best selling drugs containing 6-membered heterocycles. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 9, 2265-2319.

- Bortolatto, C.F., Chagas, P.M., Wilhelm, E.A., Zeni, G., Nogueira, C.W., 2013. 2,2'-Dithienyl diselenide, an organoselenium compound, elicits antioxidant action and inhibits monoamine oxidase activity in vitro. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 28, 677-84.
- Burk, R.F., Hill, K.E., Motley, A.K., Winfrey, V.P., Kurokawa, S., Mitchell, S.L., Zhang, W., 2014. Selenoprotein P and apolipoprotein E receptor-2 interact at the blood-brain barrier and also within the brain to maintain an essential selenium pool that protects against neurodegeneration. *FASEB J.* 28, 3579-88.
- Bursal, E., Gülçin, İ., 2011. Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International.* 44, 1482-1489.
- Carraro Junior, L.R., Alves, A.G., Rech, T., Campos Junior, J.C., Siqueira, G.M., Cunico, W., Bruning, C.A., Bortolatto, C.F., 2021. Three -(pyridin-2-yl)-2-(pyridin-2-ylimino)thiazolidin-4-one as a novel inhibitor of cerebral MAO-B activity with antioxidant properties and low toxicity potential. *J Biochem Mol Toxicol.* 35, e22833.
- Cataneo, A., Déstro, G., Ferreira, L., Chamma, K., Sousa, D.J.P.D., 2003. Glutathione S-transferase activity on the degradation of the herbicide glyphosate in maize (*Zea mays*) plants. 21, 307-312.
- Chen, Z., Yu, Y., Cai, J., Li, H., 2019. Emerging Molecular Targets for Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 30, 903-914.
- Chen, Z., Tian, R., She, Z., Cai, J., Li, H., 2020. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine.* 152, 116-141.
- Chuai, H., Zhang, S.Q., Bai, H., Li, J., Wang, Y., Sun, J., Wen, E., Zhang, J., Xin, M., 2021. Small molecule selenium-containing compounds: Recent development and therapeutic applications. *Eur J Med Chem.* 223, 113621.
- Comins, D.L., O'Connor, S., Al-awar, R.S., 2008. 7.02 - Pyridines and their Benzo Derivatives: Reactivity at the Ring. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III. Vol.*, A.R. Katritzky, C.A. Ramsden, E.F.V. Scriven, R.J.K. Taylor, ed.^eds. Elsevier, Oxford, pp. 41-99.
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A.J.J.o.c., medicine, m., 2006. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. 10, 389-406.
- De Lazzari, F., Bubacco, L., Whitworth, A.J., Bisaglia, M., 2018. Superoxide Radical Dismutation as New Therapeutic Strategy in Parkinson's Disease. *Aging Dis.* 9, 716-728.
- Gulcin, İ., 2020. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology.* 94, 651-715.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology.* 86, 345-391.
- Gupta, D., Bhatia, D., Dave, V., Sutariya, V., Varghese Gupta, S., 2018. Salts of Therapeutic Agents: Chemical, Physicochemical, and Biological Considerations. *Molecules.* 23.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249, 7130-9.
- Hu, Y., Zhang, J., Yu, C., Li, Q., Dong, F., Wang, G., Guo, Z., 2014. Synthesis, characterization, and antioxidant properties of novel inulin derivatives with amino-pyridine group. *International Journal of Biological Macromolecules.* 70, 44-49.
- Huang, Z.Q., Chen, P., Su, W.W., Wang, Y.G., Wu, H., Peng, W., Li, P.B., 2018. Antioxidant Activity and Hepatoprotective Potential of Quercetin 7-Rhamnoside In Vitro and In Vivo. *Molecules.* 23.

- Huyut, Z., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., 2017. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochemistry Research International*. 2017, 7616791.
- Kanai, T., Takahashi, K., Inoue, H., 2006. Three distinct-type glutathione S-transferases from *Escherichia coli* important for defense against oxidative stress. *J Biochem*. 140, 703-11.
- Keay, J.G., 1991. 3.6 - Partial and Complete Reduction of Pyridines and their Benzo Analogs. In *Comprehensive Organic Synthesis*. Vol., B.M. Trost, I. Fleming, ed.^eds. Pergamon, Oxford, pp. 579-602.
- Lala, V., Goyal, A., Bansal, P., Minter, D.A., 2022. Liver Function Tests. In *StatPearls*. Vol., ed.^eds., Treasure Island (FL).
- Lenardão, E.J., Claudio Santi, C., Sancineto, L., 2018. *New Frontiers in Organoselenium Compounds*. Vol., ed.^eds. Cham : Springer International Publishing, Switzerland.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 186, 464-78.
- Li, S., Tan, H.Y., Wang, N., Zhang, Z.J., Lao, L., Wong, C.W., Feng, Y., 2015. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int J Mol Sci*. 16, 26087-124.
- Luchese, C., Nogueira, C.W., 2010. Diphenyl diselenide in its selenol form has dehydroascorbate reductase and glutathione S-transferase-like activity dependent on the glutathione content. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 62, 1146-1151.
- Luchese, C., Brandão, R., Acker, C.I., Nogueira, C.W., 2012. 2,2'-Dipyridyl diselenide is a better antioxidant than other disubstituted diaryl diselenides. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 367, 153-163.
- Luo, S., Wehr, N.B.J.R.R., 2009. Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2, 4-dinitrophenylhydrazine assay. 14, 159-166.
- Marklund, S., Marklund, G.J.E.j.o.b., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. 47, 469-474.
- Mayne, S.T., 2003. Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative Stress Status in Epidemiologic Research. *The Journal of Nutrition*. 133, 933S-940S.
- Munteanu, I.G., Apetrei, C., 2021. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci*. 22.
- Murphy, M.P., Holmgren, A., Larsson, N.G., Halliwell, B., Chang, C.J., Kalyanaraman, B., Rhee, S.G., Thornalley, P.J., Partridge, L., Gems, D., Nystrom, T., Belousov, V., Schumacker, P.T., Winterbourn, C.C., 2011. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab*. 13, 361-366.
- Nwachukwu, I.D., Sarteshnizi, R.A., Udenigwe, C.C., Aluko, R.E., 2021. A Concise Review of Current In Vitro Chemical and Cell-Based Antioxidant Assay Methods. *Molecules*. 26.
- OECD, 2002. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. Vol.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 95, 351-8.
- Passari, A.K., Leo, V.V., Singh, G., Samanta, L., Ram, H., Siddaiah, C.N., Hashem, A., Al-Arjani, A.F., Alqarawi, A.A., Fathi Abd Allah, E., Singh, B.P., 2020. In Vivo Studies of Inoculated Plants and In Vitro Studies Utilizing Methanolic Extracts of Endophytic *Streptomyces* sp. Strain DBT34 Obtained from *Mirabilis jalapa* L. Exhibit ROS-Scavenging and Other Bioactive Properties. *Int J Mol Sci*. 21.

- Penteado, F., Gomes, C.S., Perin, G., Garcia, C.S., Bortolatto, C.F., Bruning, C.A., Lenardao, E.J., 2019. Regioselective Synthesis of 1-Sulfanyl- and 1-Selanylindolizines. *J Org Chem.* 84, 7189-7198.
- Pinchuk, I., Shoval, H., Dotan, Y., Lichtenberg, D., 2012. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids.* 165, 638-647.
- Podlekareva, D.N., Efsen, A.M.W., Schultze, A., Post, F.A., Skrahina, A.M., Panteleev, A., Furrer, H., Miller, R.F., Losso, M.H., Toibaro, J., Miro, J.M., Vassilenko, A., Girardi, E., Bruyand, M., Obel, N., Lundgren, J.D., Mocroft, A., Kirk, O., 2016. Tuberculosis-related mortality in people living with HIV in Europe and Latin America: an international cohort study. *The Lancet HIV.* 3, e120-e131.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.J.F.r.b., medicine, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. 26, 1231-1237.
- Sajja, Y., Vulupala, H.R., Bantu, R., Nagarapu, L., Vasamsetti, S.B., Kotamraju, S., Nanubolu, J.B., 2016. Three-component, one-pot synthesis of benzo[6,7]cyclohepta[1,2-b]pyridine derivatives under catalyst free conditions and evaluation of their anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 26, 858-863.
- Santhosh Kumar, G., Poornachandra, Y., Kumar Gunda, S., Ratnakar Reddy, K., Mohmed, J., Shaik, K., Ganesh Kumar, C., Narsaiah, B., 2018. Synthesis of novel hetero ring fused pyridine derivatives; Their anticancer activity, CoMFA and CoMSIA studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 28, 2328-2337.
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods.* 18, 820-897.
- Sharma, O.P., Bhat, T.K.J.F.c., 2009. DPPH antioxidant assay revisited. 113, 1202-1205.
- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., Dhaka, N., 2013. Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of Pharmacy Research.* 7, 828-835.
- Singh, D., Cho, W.C., Upadhyay, G., 2016. Drug-Induced Liver Toxicity and Prevention by Herbal Antioxidants: An Overview. 6.
- Skopelitou, K., Muleta, A.W., Pavli, O., Skaracis, G.N., Fletmetakis, E., Papageorgiou, A.C., Labrou, N.E., 2012. Overlapping protective roles for glutathione transferase gene family members in chemical and oxidative stress response in *Agrobacterium tumefaciens*. *Functional & Integrative Genomics.* 12, 157-172.
- Solovyev, N.D., 2015. Importance of selenium and selenoprotein for brain function: From antioxidant protection to neuronal signalling. *J Inorg Biochem.* 153, 1-12.
- Stadtman, E., Levine, R.J.A.a., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. 25, 207-218.
- Székács, I., Tokarz, P., Horvath, R., Kovács, K., Kubas, A., Shimura, M., Brasun, J., Murzin, V., Caliebe, W., Szewczuk, Z., Paluch, A., Wojnárovits, L., Tóth, T., Pap, J.S., Szyrwił, Ł., 2019. In vitro SOD-like activity of mono- and di-copper complexes with a phosphonate substituted SALAN-type ligand. *Chemico-Biological Interactions.* 306, 78-88.
- Torres, D.J., Alfulaj, N., Berry, M.J., 2021. Stress and the Brain: An Emerging Role for Selenium. *Front Neurosci.* 15, 666601.
- Vitaku, E., Smith, D.T., Njardarson, J.T., 2014. Analysis of the Structural Diversity, Substitution Patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles among U.S. FDA Approved Pharmaceuticals. *Journal of Medicinal Chemistry.* 57, 10257-10274.
- Walsh, R.N., Cummins, R.A.J.P.b., 1976. The open-field test: a critical review. 83, 482.

- Wu, Z., Tan, B., Liu, Y., Dunn, J., Martorell Guerola, P., Tortajada, M., Cao, Z., Ji, P., 2019. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Essential Oils from Peppermint, Native Spearmint and Scotch Spearmint. *Molecules*. 24.
- Zhang, L., Wang, X., Cueto, R., Effi, C., Zhang, Y., Tan, H., Qin, X., Ji, Y., Yang, X., Wang, H., 2019. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biol.* 26, 101284.

## Figure captions

**Figure 1.** Chemical structure of compounds derived from pyridinium salts, called 1-(2-oxo-2-phenylethyl)-2-((phenylselanyl)methyl)pyridin-1-ium bromide (**3A**), 1-(2-oxo-2-(*p*-tolyl)ethyl)-2-((phenylselanyl)methyl)pyridin-1-ium bromide (**3B**), and 1-(2-(4-chlorophenyl)-2-oxoethyl)-2-((phenylselanyl)methyl)pyridin-1-ium bromide (**3C**).

**Figure 2.** Effects of the compounds **3A** (panel A), **3B** (panel B), and **3C** (panel C) on the carbonyl protein levels induced by NPS in mouse liver tissue. The *in vitro* assay was performed in duplicate using N = 3-4 per group, and the results expressed as mean  $\pm$  S.E.M (nm carbonyl/mg of protein). Trolox was used as a positive control (PC). (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.001$ , (\*\*\*)  $p < 0.0001$ , when compared with the induced group, and (#)  $p < 0.05$ , (##)  $p < 0.001$  when compared with the control. One-way ANOVA and Tukey's *post hoc* multiple comparison test.

**Figure 3.** Effects of the compounds **3A** (panel A), **3B** (panel B), and **3C** (panel C) on the TBARS levels induced by NPS in mouse liver tissue. The data represent the mean  $\pm$  S.E.M. from experiments performed in duplicate. Trolox was used as a positive control (PC). (\*\*)  $p < 0.001$  (\*\*\*)  $p < 0.0001$  when compared with the induced (I) group, and (#)  $p < 0.05$  (###)  $p < 0.0001$  when compared with control (C) group. One-way ANOVA and Tukey's *post hoc* multiple comparison test.

**Figure 4.** DPPH radical scavenging activity of the compounds **3A**, **3B**, and **3C**. The data represent the mean  $\pm$  S.E.M. from experiments in duplicate. Results are expressed as a percentage of blank (test control). Ascorbic acid (AA) was used as a positive control (PC).

(\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.001$ , (\*\*\*)  $p < 0.0001$  when compared with the vehicle (V) group. One-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test.

**Figure 5.** ABTS radical scavenging activity of the compounds **3A**, **3B**, and **3C**. The data represent the mean  $\pm$  S.E.M. from experiments in duplicate. Results are expressed as a percentage of the blank (test control). Ascorbic acid (AA) was used as a positive control (PC). (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.001$ , (\*\*\*)  $p < 0.0001$  when compared with the vehicle (V) group. One-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test were realized.

**Figure 6.** GST-like activity of the compounds **3A**, **3B**, and **3C**. Results were performed in duplicate and expressed as mean  $\pm$  S.E.M., graphically demonstrated in  $\Delta$ Abs/min.  $(\text{PhSe})_2$  was used as a positive control. (\*\*)  $p < 0.001$  (\*\*\*)  $p < 0.0001$  when compared with the blank (B). One-way ANOVA and Tukey's post hoc multiple comparison tests were applied.

**Figure 7.** Effects of the compounds **3A**, **3B**, **3C** on the SOD-like assay. The data represent the mean  $\pm$  S.E.M. from experiments in duplicate. Ascorbic acid (AA) was used as a positive control (PC). (\*)  $p < 0.05$  (\*\*)  $p < 0.001$  when compared with the control (C) group. One-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test.

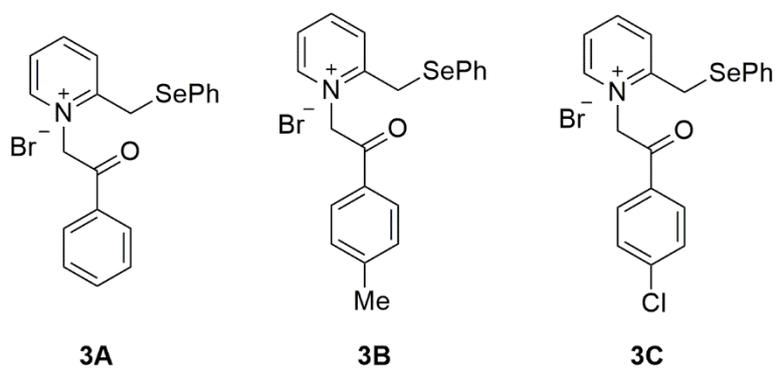
**Figure 8.** Effects of the oral administration of compound **3C** (left panel 50 mg/kg; right panel 300 mg/kg) on the body weight gain (A and B), water (C and D) and food (E and F) consumption. The data represent the mean  $\pm$  S.E.M. (\*\*)  $p < 0.001$  when compared with the control group. Unpaired  $t$  test was used to compare the columns of each experiment individually.

**Figure 9.** Locomotor (A and B) and exploratory (C and D) activities of animals treated with compound **3C** in the OFT. The data represent the mean  $\pm$  S.E.M. Unpaired *t* test was used to compare the columns of each experiment individually.

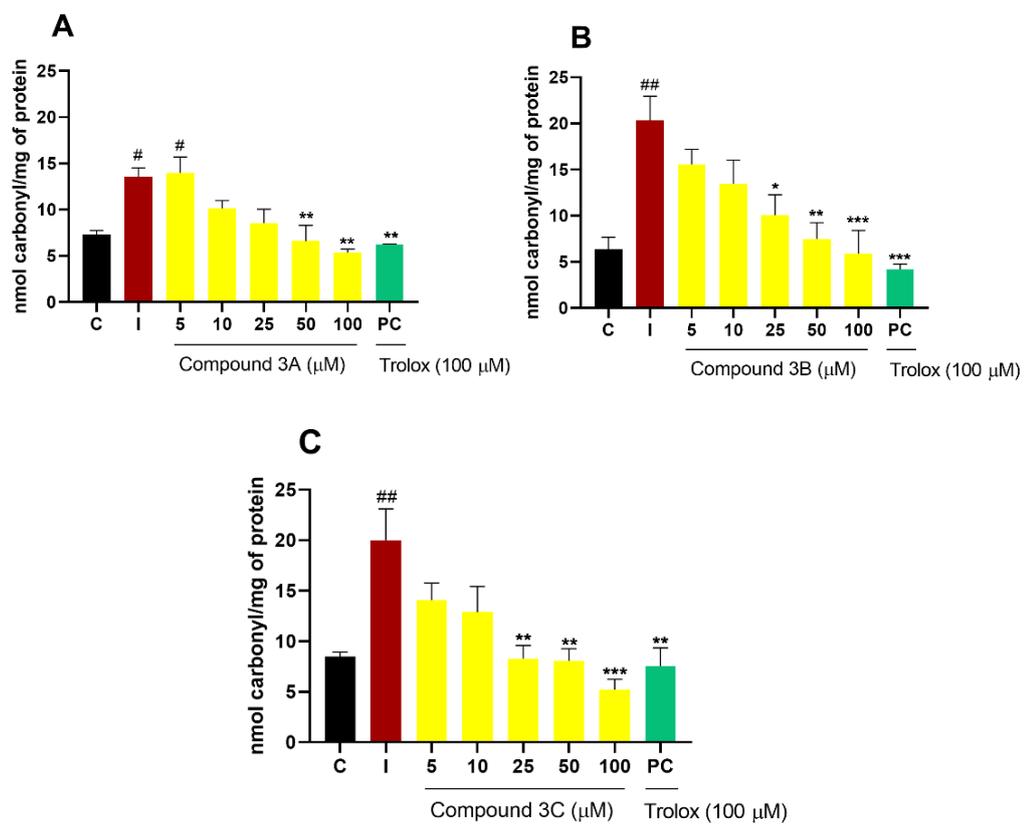
**Figure 10.** Urea levels (A and B), plasma AST (C and D) and ALT (E and F) activities of female mice orally treated with the compound **3C** (50 and 300 mg/kg). The data represent the mean  $\pm$  S.E.M. Unpaired *t* test was used to compare the columns of each experiment individually.

## Figures

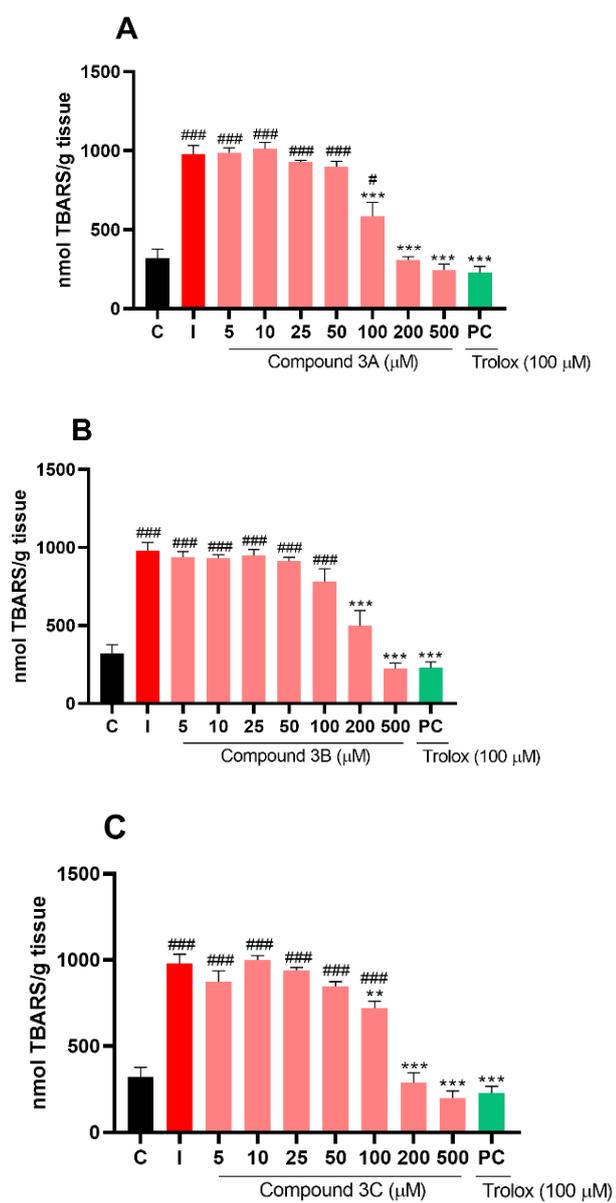
### Figure 1



**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**

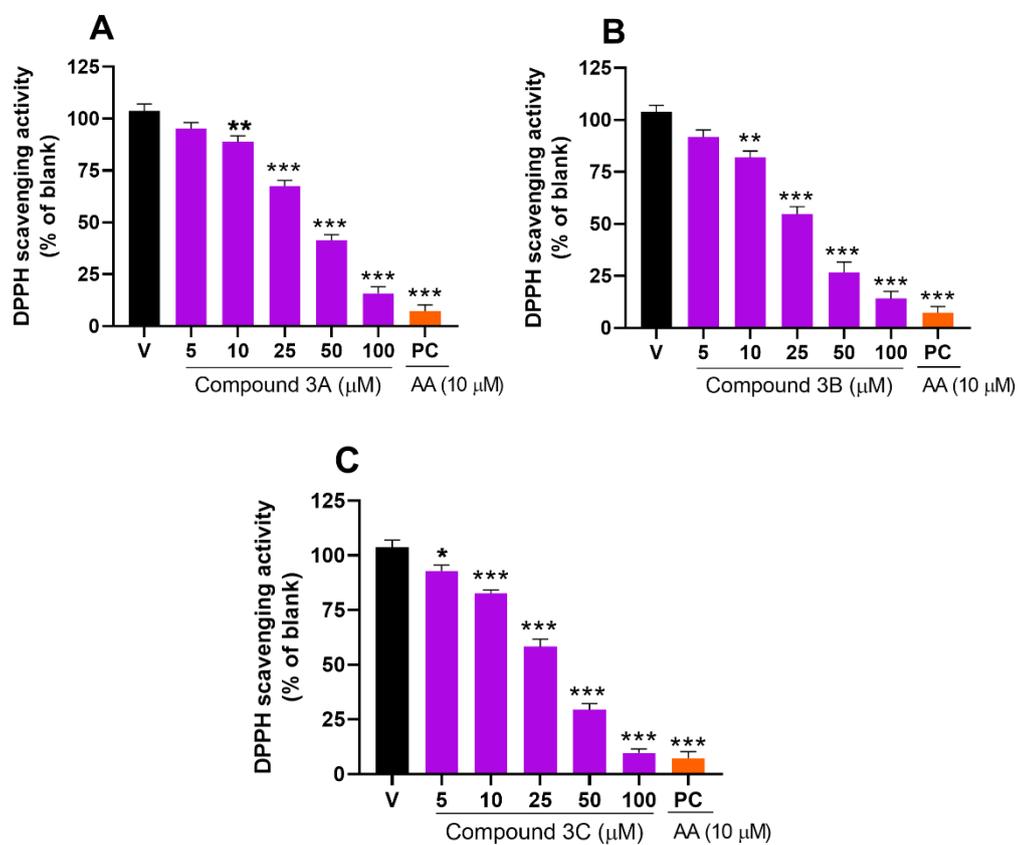
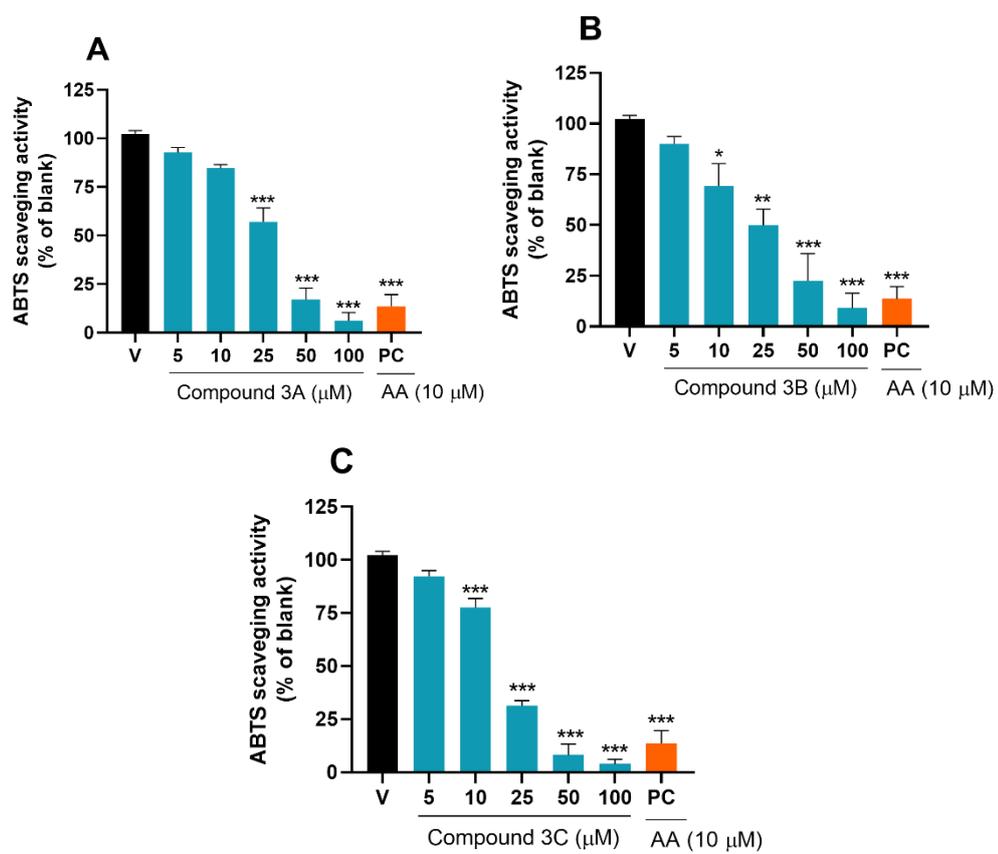
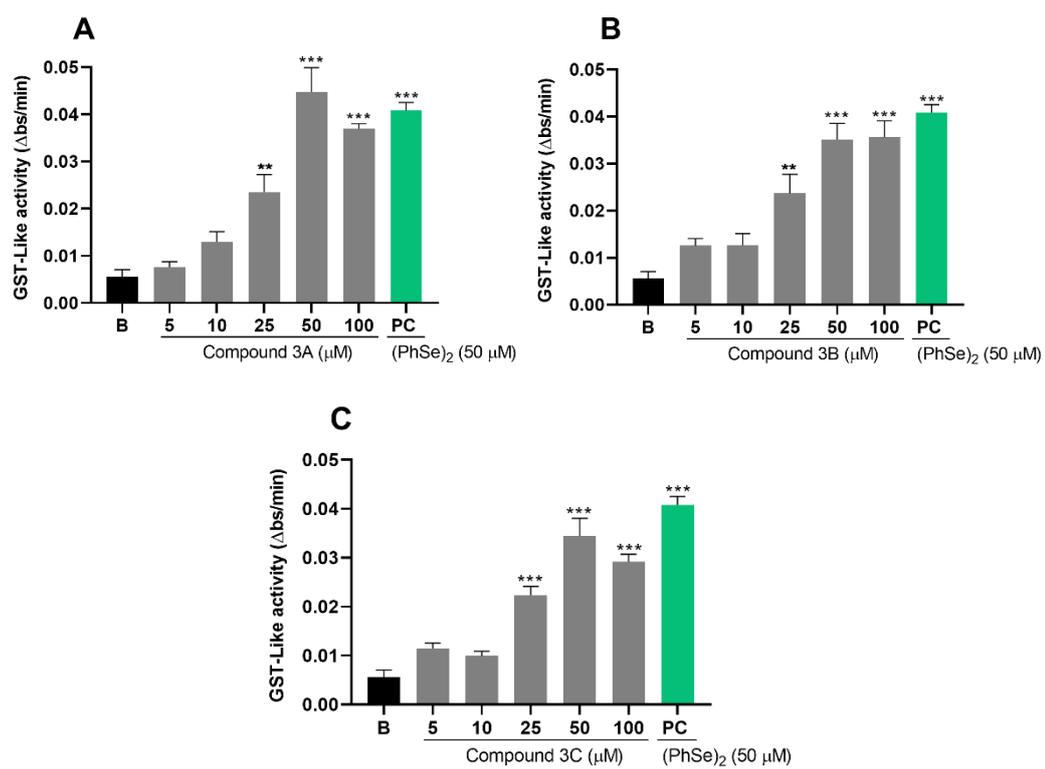


Figure 5



**Figure 6**



**Figure 7**

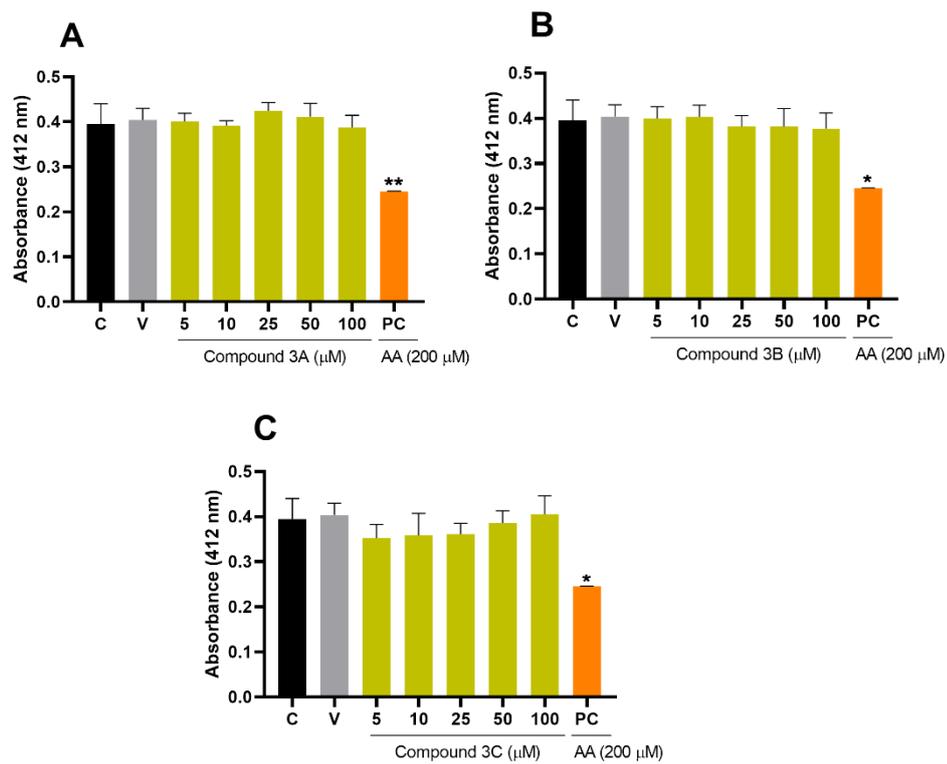
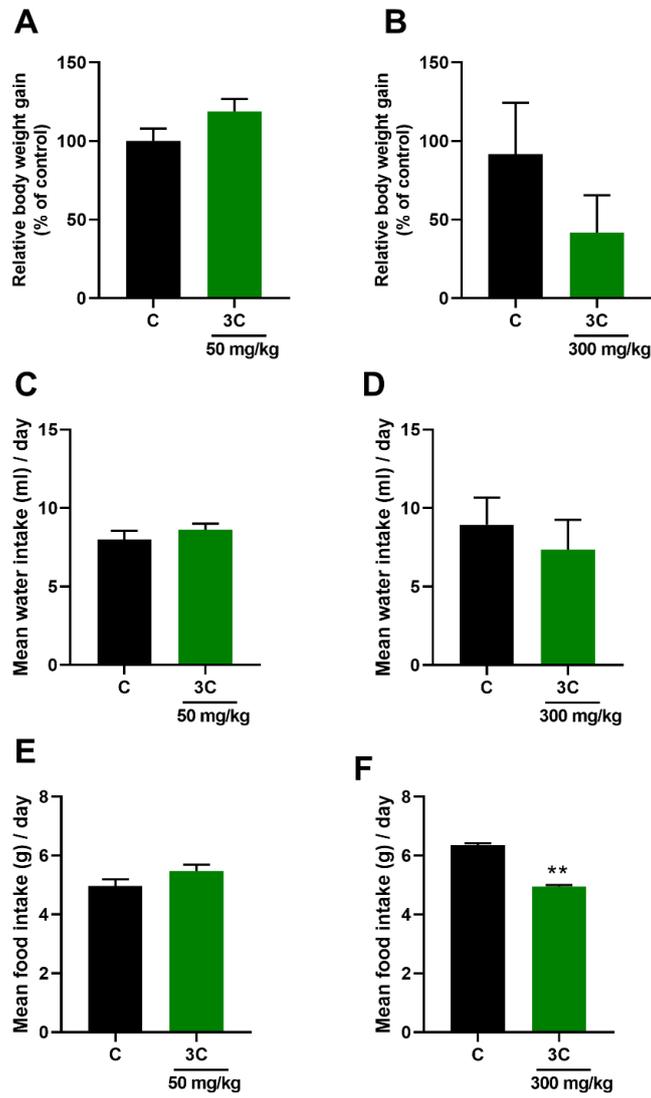
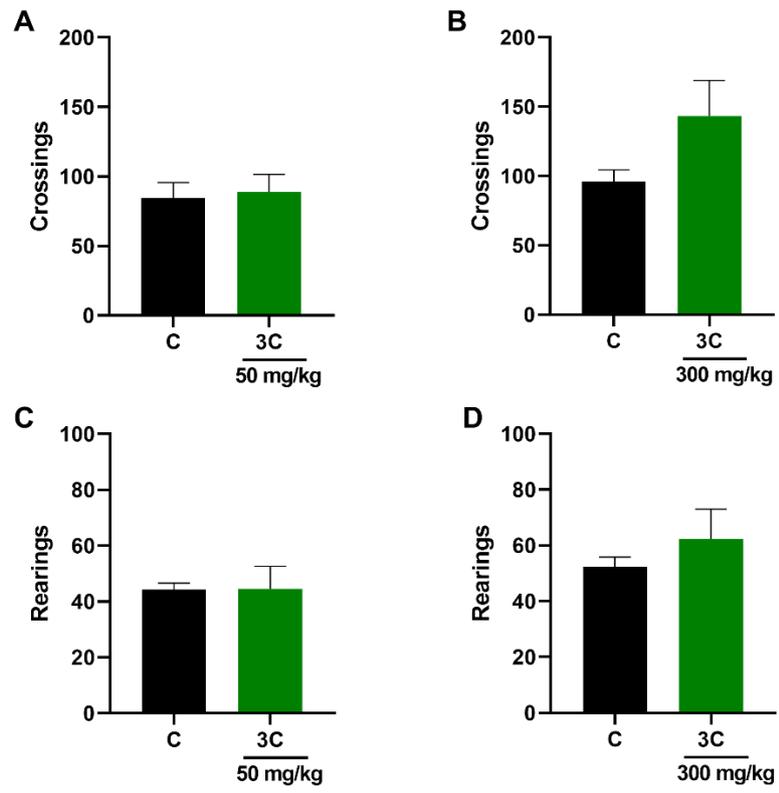


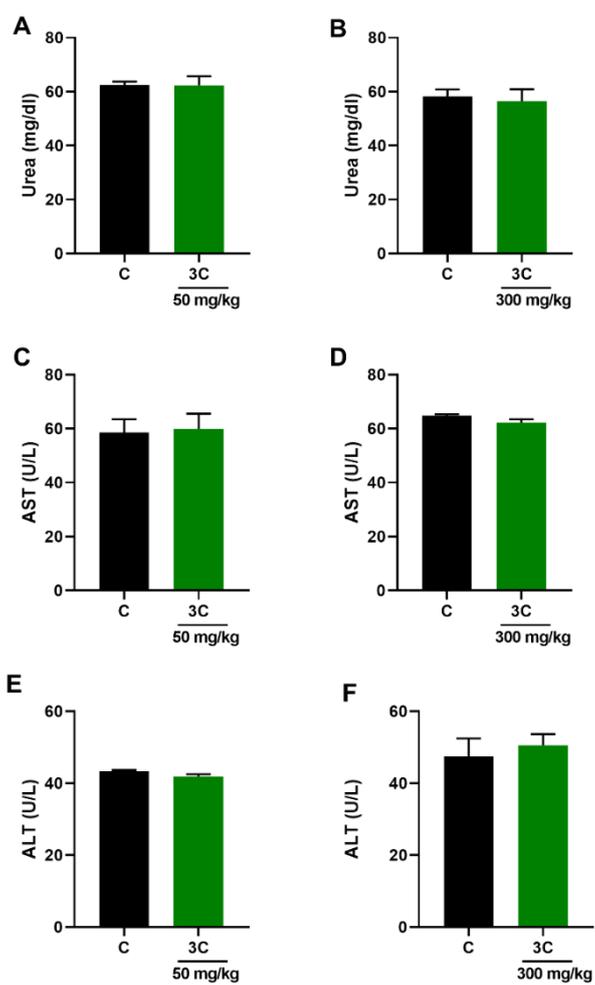
Figure 8



**Figure 9**



**Figure 10**



## 5. Discussão

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, os efeitos antioxidantes *in vitro* de três sais de piridínio contendo Se (compostos **3A**, **3B** e **3C**). Quando testados em tecido hepático, os compostos exibiram capacidade de reduzir a lipoperoxidação e a carbonilação de proteínas induzidas por NPS, também se observou que possuem ação antioxidante relacionada à atividade mimética à enzima GST. Constatou-se que o composto **3C**, selecionado pelo melhor perfil antioxidante, tem baixo potencial de causar toxicidade oral aguda em camundongos.

O fígado é um órgão dinâmico que desempenha importantes funções metabólicas, então torna-se um alvo em potencial de ERO. A ocorrência de estresse oxidativo provoca danos hepáticos por meio da alteração de lipídios e proteínas, sendo os mecanismos patológicos mais envolvidos no início e progressão de doenças hepáticas. Conseqüentemente, muito se tem estudado sobre a utilização de antioxidantes na prevenção de doenças hepáticas (S. Li et al., 2015; W. Li & Lu, 2018).

A carbonilação de proteínas ocorre devido à oxidação das cadeias laterais de aminoácidos livres, e resíduos de aminoácidos presentes em proteínas principalmente a porção COOH. Estão envolvidas reações entre COOH, H<sub>2</sub>O, metais de transição como Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> e a hidroperoxila HO<sub>2</sub><sup>·</sup>. Por estarem próximas aos sítios geradores de ERO, as enzimas envolvidas no Ciclo de Krebs e na cadeia de transporte de elétrons também podem sofrer carbonilação (Dalle-Donne et al., 2006; Luo & Wehr, 2009; Stadtman & Levine, 2003). Grupos carbonil gerados a partir do processo de carbonilação das proteínas reagem com o DNPH para formar hidrazonas, as quais podem ser detectadas em espectrofotômetro. Nesse ensaio, o NPS (gerador de óxido nítrico) foi utilizado como um indutor de carbonilação das proteínas hepáticas. Para a confiança nos achados experimentais, trolox foi empregado como um controle positivo (antioxidante de referência amplamente conhecido na literatura). Os resultados da aplicação dos sais demonstraram que os três compostos (**3A**, **B** e **C**), foram capazes de reduzir a oxidação de proteínas a partir da concentração de 25 µM (**3B** e **C**) ou 50 µM (composto **3A**).

A membrana celular é composta por lipídios contendo ácidos graxos poli-insaturados. Então quando agentes oxidantes a atacam, radicais peroxilipídicos e hidroperóxidos são formados. Devido a este ataque há alteração da permeabilidade da membrana, dano tecidual e possivelmente morte celular (Alam et al., 2013; Gulcin, 2020; Mayne, 2003; Wu et al., 2019). Condições hepáticas como a esteatose hepática estão intimamente ligadas ao estresse oxidativo. O  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  são subprodutos do metabolismo energético de algumas das células hepáticas, essas ERO induzem lipotoxicidade resultando na alteração das funções hepáticas, ocasionando a sobrecarga do fígado. Devido a essa má funcionalidade, uma série de outras alterações podem acontecer em diferentes outros órgãos (Chen et al., 2020; Chen et al., 2019).

O ensaio TBARS geralmente é empregado com a finalidade de rastreamento e monitoramento do processo de peroxidação lipídica. O MDA e outras substâncias são produzidas como resultado do ataque de ERO, nas ligações duplas entre carbonos presentes em lipídios, com a consequente perda de hidrogênio e adição de oxigênio na cadeia. Essas substâncias reagem com o TBA e podem ser detectadas por ensaio colorimétrico (Aguilar Diaz De Leon & Borges, 2020). Como resultado da investigação, os compostos **3A** e **3C** apresentaram efeito antioxidante em concentrações de 100, 200 e 500  $\mu$ M, enquanto o composto **3B** apresentou efeito apenas nas concentrações de 200 e 500  $\mu$ M. Quando comparados os resultados dos compostos com o controle positivo (trolox), fica evidenciado que os sais possuem potencial contra o aumento da formação de TBARS no tecido hepático de camundongos.

Técnicas que não empregam tecidos biológicos também foram usadas, com a finalidade de auxiliar a explicar alguns dos possíveis mecanismos da ação antioxidante dos sais. Diversas das defesas contra ERO presentes no organismo, possuem diferentes mecanismos de ação como capacidade de doar elétrons (*SET*), ou transferir átomos de hidrogênios (*HAT*) (Bursal & Gülçin, 2011; Huyut, Beydemir, & Gülçin, 2017; Zhang et al., 2019). Os ensaios DPPH e ABTS empregam mecanismos *HAT* e *SET*, são simples, econômicos, rápidos e baseados em determinações espectrofotométricas (Apak et al., 2016; Munteanu & Apetrei, 2021; Shahidi & Zhong, 2015).

O teste de redução do radical DPPH acontece em uma solução alcoólica, e na presença de um antioxidante com capacidade de doar hidrogênios, o DPPH-H é formado. DPPH é um radical altamente estável de cor púrpura, que quando recebe um H muda sua coloração, e pode ser detectado por meio de leitura da absorbância em espectrofotômetro (Gulcin, 2020; Gülçin, 2012). Nossos dados sugerem que os compostos são capazes exercer efeitos antioxidantes por meio *HAT*, visto que apresentaram boa atividade sequestrante do radical DPPH em concentrações de 5 µM como ocorreu para o composto **3C**, e a partir de 10 µM para os compostos **3A** e **B**. O AA ou vitamina C serviu como um controle positivo, é facilmente solúvel em água e possui atividade antioxidante amplamente conhecida.

O ABTS é um radical mais reativo que o DPPH, e sua metodologia envolve reações do tipo mista, ou seja, tanto *HAT* quando *SET*. Para a geração do cátion radicalar ABTS<sup>•+</sup>, o ABTS reage com o K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> envolvendo o mecanismo *SET*, que quando produzido o cátion reage com os compostos antioxidantes através do mecanismo *HAT* (Gulcin, 2020). Como resultado desta técnica, os três compostos testados demonstraram atuar por meio deste mecanismo, revelando efeitos significativos a partir da concentração de 10 µM. A atividade *scavenger* dos sais foi validada pelo efeito significativo detectado para o controle positivo empregado, o AA.

Muitos pesquisadores tem apostado em compostos que possam agir como miméticos de enzimas antioxidantes, como relatado em estudos de Wu et al. (2019) e Carraro Junior et al. (2021), alguns deles são compostos organoselênio (Bortolatto, Chagas, Wilhelm, Zeni, & Nogueira, 2013; Luchese & Nogueira, 2010). As GSTs são famílias de enzimas que atuam conjugando substâncias, tendo como substrato o tripeptídeo GSH. Como resultado são obtidos produtos conjugados solúveis em água, menos tóxicos e facilmente excretáveis. Algumas isoformas das GSTs se encontram associadas a membranas, então quando danos oxidativos por meio de ERO, a enzima atua minimizando os danos causados a proteínas e lipídios (Cataneo, Déstro, Ferreira, Chamma, & Sousa, 2003; Kanai et al., 2006; Skopelitou et al., 2012). Submetidos ao ensaio de atividade mimética à GST, os sais de piridínio apresentaram efeitos significativos a partir da concentração de 25 µM, sugerindo

que foram capazes de mediar a conjugação de GSH ao CDNB. Destacamos também o uso do (PhSe)<sub>2</sub> nesta pesquisa como um controle positivo da técnica, escolhido através da análise de resultados bem estabelecidos na pesquisa de Luchese and Nogueira (2010).

No corpo humano a enzima SOD possui função de converter os radicais O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> molecular, ou seja, em sua forma menos reativa e evitando também a formação de HO<sup>•</sup> reativo. Como um possível mecanismo de defesa contra ERO, foi testado se os sais teriam a capacidade de inibir a autooxidação do pirogalol catalisada por O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, denominado ensaio *SOD-like* (De Lazzari, Bubacco, Whitworth, & Bisaglia, 2018; Székács et al., 2019; Zhang et al., 2019). No entanto, como resultado, os sais não apresentaram atividade mimética à enzima SOD, a qual foi observada apenas para o controle positivo AA.

Keay (1991) menciona que moléculas que contenham piridinas em suas estruturas químicas podem sofrer mecanismos do tipo *HAT* e *SET*, porém dependem das condições da reação como, por exemplo, a temperatura e os solventes utilizados. D. L. Comins et al. (2008) relata que as reações possíveis de ocorrer com o grupo N das piridinas (que estão presentes na estrutura dos sais piridínicos) podem ser N-oxidações, halogenação, acilação, adição enquanto que as reações que podem ocorrer com o C são por meio de ataques eletrofílicos, nucleofílicos e radicais livres. Essas informações nos ajudam a entender como os sais podem atuar como antioxidantes, embora muitos estudos ainda sejam necessários visto que são moléculas ainda muito pouco empregadas em estudos. Os sais de piridínio podem permanecer no corpo por mais tempo, e podem ser protonados e desprotonados formando ácidos e bases conjugadas. Destaca-se também que o Se (presente nos sais de piridínio estudados) é conhecido por sua atividade antioxidante. Ele faz parte de selenoenzimas antioxidantes, portanto, atua restaurando níveis enzimáticos quando sofrem redução devido à grande quantidade de ERO. Aminoácidos e proteínas também contém o microelemento Se que atuam como transportadores, sinalizadores, protetores contra danos em proteínas plasmáticas. Além disso, pode se ligar a ERO e formar compostos facilmente detoxificados e excretados (Burk et al., 2014; Sindhi et al., 2013).

A avaliação da toxicidade de novas moléculas é de grande importância, pois mesmo que compostos apresentem atividade biológica de interesse *in vitro*, quando testados *in vivo*, efeitos indesejáveis podem surgir. Resultados de estudo de toxicidade contribuem para que pesquisadores possam rastrear potenciais fármacos tóxicos, e passem a concentrar-se em candidatos com probabilidade de serem testados clinicamente. Realizou-se um rastreio de toxicidade aguda indicado pela OECD utilizando camundongos Swiss fêmeas, empregando as doses de 50 e 300 mg/kg composto **3C**. Este composto foi selecionado em razão de ter apresentado resultados *in vitro* mais promissores.

Os resultados estatísticos indicaram que o composto **3C** não levou a mortalidade de nenhuma das fêmeas, nem ocasionou alterações de comportamento em ambas as doses testadas. As funções hepáticas e renais não foram prejudicadas, visto que os níveis plasmáticos de ureia (biomarcador de função renal) e a atividade das aminotransferases AST e ALT (biomarcadores de função hepática) não foram alterados em animais expostos ao composto. Quando os níveis desses biomarcadores estão em grandes quantidades na corrente sanguínea é um indício de que as funções dos órgãos podem estar prejudicadas (Lala et al., 2022). A ingestão alimentar média dos animais que receberam a dose mais alta do composto (300 mg/kg) foi reduzida em comparação aos animais controle, porém não houve diferenças significativas na ingestão hídrica, no ganho de peso corporal e na função locomotora, indicando um baixo potencial do composto em causar toxicidade aguda. Entretanto, mais estudos são necessários para uma avaliação mais robusta acerca de sua segurança como, por exemplo, um esquema de exposição repetida.

## 6. Conclusão

Através dos ensaios de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas em tecido hepático de camundongos, o presente estudo revelou a atividade antioxidante *in vitro* de três sais de piridínio contendo Se (**3A**, **3B** e **3C**). Os mecanismos de ação mediados por sequestro de radicais e por atividade mimética à enzima GST parecem contribuir para a ação antioxidante dos compostos. Os achados também sugerem uma relativa segurança do sal **3C** selecionado devido ao seu baixo potencial em causar toxicidade. Visto que diversos mecanismos de hepatotoxicidade têm sido relacionados ao estresse oxidativo, os resultados abordados aqui sugerem a potencialidade do composto **3C** em ser estudado como um candidato hepatoprotetor *in vivo*.

## 7. Referências

- Abdel-Shafy, E. A. (2021). Chapter 5 - Antioxidant status in pesticides-exposed agricultural workers. In V. B. Patel & V. R. Preedy (Eds.), *Toxicology* (pp. 43-51): Academic Press.
- Aguilar Diaz De Leon, J., & Borges, C. R. (2020). Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *J Vis Exp*(159). doi:10.3791/61122.
- Al-Omary, F. A. M. (2013). Chapter Five - Melatonin: Comprehensive Profile. In H. G. Brittain (Ed.), *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (Vol. 38, pp. 159-226): Academic Press.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152. doi:https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002.
- Alptuzun, V., Parlar, S., Tasli, H., & Erciyas, E. (2009). Synthesis and antimicrobial activity of some pyridinium salts. *Molecules*, 14(12), 5203-5215. doi:10.3390/molecules14125203.
- Amin, K. A., Hashem, K. S., Alshehri, F. S., Awad, S. T., & Hassan, M. S. (2017). Antioxidant and Hepatoprotective Efficiency of Selenium Nanoparticles Against Acetaminophen-Induced Hepatic Damage. *Biol Trace Elem Res*, 175(1), 136-145. doi:10.1007/s12011-016-0748-6.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., & Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5), 997-1027. doi:10.1021/acs.jafc.5b04739.
- Arab, J. P., Arrese, M., & Trauner, M. J. A. R. o. P. M. o. D. (2018). Recent insights into the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *13*, 321-350.
- Ashor, A. W., Siervo, M., & Mathers, J. C. (2016). Chapter 43 - Vitamin C, Antioxidant Status, and Cardiovascular Aging. In M. Malavolta & E. Mocchegiani (Eds.), *Molecular Basis of Nutrition and Aging* (pp. 609-619). San Diego: Academic Press.

- Atkinson, J., Manor, D., & Parker, R. (2013). Vitamin E. In W. J. Lennarz & M. D. Lane (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)* (pp. 545-550). Waltham: Academic Press.
- Bai, L., & Li, H. J. J. o. M. M. (2019). Innate immune regulatory networks in hepatic lipid metabolism. *97(5)*, 593-604.
- Baumann, M., & Baxendale, I. R. (2013). An overview of the synthetic routes to the best selling drugs containing 6-membered heterocycles. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, *9*, 2265-2319. doi:10.3762/bjoc.9.265.
- Bortolatto, C. F., Chagas, P. M., Wilhelm, E. A., Zeni, G., & Nogueira, C. W. (2013). 2,2'-Dithienyl diselenide, an organoselenium compound, elicits antioxidant action and inhibits monoamine oxidase activity in vitro. *J Enzyme Inhib Med Chem*, *28(4)*, 677-684. doi:10.3109/14756366.2012.670805.
- Bradshaw, M. P., Barril, C., Clark, A. C., Prenzler, P. D., & Scollary, G. R. (2011). Ascorbic acid: a review of its chemistry and reactivity in relation to a wine environment. *Crit Rev Food Sci Nutr*, *51(6)*, 479-498. doi:10.1080/10408391003690559.
- Brigelius-Flohé, R., & Flohé, L. (2019). Regulatory Phenomena in the Glutathione Peroxidase Superfamily. *Antioxidants & Redox Signaling*, *33(7)*, 498-516. doi:10.1089/ars.2019.7905.
- Burk, R. F., Hill, K. E., Motley, A. K., Winfrey, V. P., Kurokawa, S., Mitchell, S. L., & Zhang, W. (2014). Selenoprotein P and apolipoprotein E receptor-2 interact at the blood-brain barrier and also within the brain to maintain an essential selenium pool that protects against neurodegeneration. *FASEB J*, *28(8)*, 3579-3588. doi:10.1096/fj.14-252874.
- Bursal, E., & Gülçin, İ. (2011). Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International*, *44(5)*, 1482-1489. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.031.
- Carraro Junior, L. R., Alves, A. G., Rech, T., Campos Junior, J. C., Siqueira, G. M., Cunico, W., . . . Bortolatto, C. F. (2021). Three -(pyridin-2-yl)-2-(pyridin-2-ylimino)thiazolidin-4-one as a novel inhibitor of cerebral MAO-B activity with antioxidant properties and low toxicity potential. *J Biochem Mol Toxicol*, *35(8)*, e22833. doi:10.1002/jbt.22833.

- Casari, A. M., Ignasiak, M. T., Chuang, C. Y., Vieira, B., Padilha, N. B., Carroll, L., . . . Davies, M. J. (2017). Selenium-containing indolyl compounds: Kinetics of reaction with inflammation-associated oxidants and protective effect against oxidation of extracellular matrix proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, *113*, 395-405. doi:<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.344>.
- Cataneo, A., Déstro, G., Ferreira, L., Chamma, K., & Sousa, D. J. P. D. (2003). Glutathione S-transferase activity on the degradation of the herbicide glyphosate in maize (*Zea mays*) plants. *21*(2), 307-312.
- Çelik, E. E., Rubio, J. M. A., & Gökmen, V. J. F. c. (2018). Behaviour of Trolox with macromolecule-bound antioxidants in aqueous medium: Inhibition of auto-regeneration mechanism. *243*, 428-434.
- Chen, Z., Tian, R., She, Z., Cai, J., & Li, H. (2020). Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *152*, 116-141. doi:<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025>.
- Chen, Z., Yu, Y., Cai, J., & Li, H. (2019). Emerging Molecular Targets for Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *30*(12), 903-914. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.08.006>.
- Chitimus, D. M., Popescu, M. R., Voiculescu, S. E., Panaitescu, A. M., Pavel, B., Zagrean, L., & Zagrean, A. M. (2020). Melatonin's Impact on Antioxidative and Anti-Inflammatory Reprogramming in Homeostasis and Disease. *Biomolecules*, *10*(9). doi:10.3390/biom10091211.
- Chuai, H., Zhang, S. Q., Bai, H., Li, J., Wang, Y., Sun, J., . . . Xin, M. (2021). Small molecule selenium-containing compounds: Recent development and therapeutic applications. *Eur J Med Chem*, *223*, 113621. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113621.
- Cichoż-Lach, H., & Michalak, A. (2014). Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol*, *20*(25), 8082-8091. doi:10.3748/wjg.v20.i25.8082.
- Collin, F. (2019). Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*, *20*(10). doi:10.3390/ijms20102407.

- Comins, D. L., & Joseph, S. P. (1996). 5.02 - Pyridines and their Benzo Derivatives: Reactivity at the Ring. In A. R. Katritzky, C. W. Rees, & E. F. V. Scriven (Eds.), *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II* (pp. 37-89). Oxford: Pergamon.
- Comins, D. L., O'Connor, S., & Al-awar, R. S. (2008). 7.02 - Pyridines and their Benzo Derivatives: Reactivity at the Ring. In A. R. Katritzky, C. A. Ramsden, E. F. V. Scriven, & R. J. K. Taylor (Eds.), *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III* (pp. 41-99). Oxford: Elsevier.
- da Silva Teixeira Rech, T., Gonçalves Alves, A., Nornberg Strelow, D., Devantier Krüger, L., Carraro Júnior, L. R., Dos Santos Neto, J. S., . . . Folharini Bortolatto, C. (2021). 2-Phenyl-3-(phenylselanyl)benzofuran elicits acute antidepressant-like action in male Swiss mice mediated by modulation of the dopaminergic system and reveals therapeutic efficacy in both sexes. *Psychopharmacology (Berl)*, *238*(10), 3013-3024. doi:10.1007/s00213-021-05921-9.
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A. J. J. o. c., & medicine, m. (2006). Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *10*(2), 389-406.
- Dao, D. Q., Ngo, T. C., Thong, N. M., & Nam, P. C. (2017). Is Vitamin A an Antioxidant or a Pro-oxidant? *J Phys Chem B*, *121*(40), 9348-9357. doi:10.1021/acs.jpcc.7b07065.
- De Lazzari, F., Bubacco, L., Whitworth, A. J., & Bisaglia, M. (2018). Superoxide Radical Dismutation as New Therapeutic Strategy in Parkinson's Disease. *Aging Dis*, *9*(4), 716-728. doi:10.14336/AD.2017.1018.
- Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxid Med Cell Longev*, *2020*, 9829176. doi:10.1155/2020/9829176.
- Durmaz, G. J. F. C. (2012). Freeze-dried ABTS+ method: A ready-to-use radical powder to assess antioxidant capacity of vegetable oils. *133*(4), 1658-1663.
- Emeigh Hart, S. G. (2010). 7.11 - In Vivo Methodologies Used to Assess Renal Function and Injury. In C. A. McQueen (Ed.), *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* (pp. 263-303). Oxford: Elsevier.

- Farzaei, M. H., Zobeiri, M., Parvizi, F., El-Senduny, F. F., Marmouzi, I., Coy-Barrera, E., . . . Abdollahi, M. (2018). Curcumin in Liver Diseases: A Systematic Review of the Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Clinical Perspective. *Nutrients*, *10*(7). doi:10.3390/nu10070855.
- Feldman, M., Friedman, L. S., & Brandt, L. J. (2020). *Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease E-book: pathophysiology, diagnosis, management*. Elsevier health sciences.
- Foti, M. C. (2015). Use and Abuse of the DPPH(\*) Radical. *J Agric Food Chem*, *63*(40), 8765-8776. doi:10.1021/acs.jafc.5b03839.
- Friedman, S. L., Neuschwander-Tetri, B. A., Rinella, M., & Sanyal, A. J. J. N. m. (2018). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *24*(7), 908-922.
- Fuchs, C. D., Claudel, T., Trauner, M. J. T. i. E., & Metabolism. (2014). Role of metabolic lipases and lipolytic metabolites in the pathogenesis of NAFLD. *25*(11), 576-585.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, *94*(3), 651-715. doi:10.1007/s00204-020-02689-3.
- Gülçin, İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, *86*(3), 345-391. doi:10.1007/s00204-011-0774-2.
- Gupta, D., Bhatia, D., Dave, V., Sutariya, V., & Varghese Gupta, S. (2018). Salts of Therapeutic Agents: Chemical, Physicochemical, and Biological Considerations. *Molecules*, *23*(7). doi:10.3390/molecules23071719.
- Gupta, P. K. (2016). Chapter 8 - Biotransformation. In P. K. Gupta (Ed.), *Fundamentals of Toxicology* (pp. 73-85): Academic Press.
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*, *70*(5), 257-265. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x  
%J Nutrition Reviews
- Henson, K. L., Stauffer, G., & Gallagher, E. P. (2001). Induction of Glutathione S-transferase Activity and Protein Expression in Brown Bullhead (*Ameiurus nebulosus*) Liver by Ethoxyquin. *Toxicological Sciences*, *62*(1), 54-60. doi:10.1093/toxsci/62.1.54 %J Toxicological Sciences.
- Hu, Y., Zhang, J., Yu, C., Li, Q., Dong, F., Wang, G., & Guo, Z. (2014). Synthesis, characterization, and antioxidant properties of novel inulin derivatives with

- amino-pyridine group. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 44-49. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.024>.
- Huyut, Z., Beydemir, Ş., & Gülçin, İ. (2017). Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochemistry Research International*, 2017, 7616791. doi:10.1155/2017/7616791.
- Kanai, T., Takahashi, K., & Inoue, H. (2006). Three distinct-type glutathione S-transferases from *Escherichia coli* important for defense against oxidative stress. *J Biochem*, 140(5), 703-711. doi:10.1093/jb/mvj199.
- Katritzky, A. R., Ramsden, C. A., Joule, J. A., & Zhdankin, V. V. (2010). 3.2 - Reactivity of Six-membered Rings. In A. R. Katritzky, C. A. Ramsden, J. A. Joule, & V. V. Zhdankin (Eds.), *Handbook of Heterocyclic Chemistry (Third Edition)* (pp. 242-382). Amsterdam: Elsevier.
- Keay, J. G. (1991). 3.6 - Partial and Complete Reduction of Pyridines and their Benzo Analogs. In B. M. Trost & I. Fleming (Eds.), *Comprehensive Organic Synthesis* (pp. 579-602). Oxford: Pergamon.
- Lala, V., Goyal, A., Bansal, P., & Minter, D. A. (2022). Liver Function Tests. In *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Leghi, G. E., Domenici, F. A., & Vannucchi, H. J. A. d. g. (2015). Influence of oxidative stress and obesity in patients with nonalcoholic steatohepatitis. 52, 228-233.
- Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W., & Feng, Y. (2015). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int J Mol Sci*, 16(11), 26087-26124. doi:10.3390/ijms161125942.
- Li, W., & Lu, Y. J. J. o. f. s. (2018). Hepatoprotective effects of sophoricoside against fructose-induced liver injury via regulating lipid metabolism, oxidation, and inflammation in mice. 83(2), 552-558.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., . . . Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*, 13, 757-772. doi:10.2147/CIA.S158513.
- Lim, S.-I., Cho, C.-W., Choi, U.-K., & Kim, Y.-C. J. J. o. G. R. (2010). Antioxidant activity and ginsenoside pattern of fermented white ginseng. 34(3), 168-174.
- Luchese, C., Brandão, R., Acker, C. I., & Nogueira, C. W. (2012). 2,2'-Dipyridyl diselenide is a better antioxidant than other disubstituted diaryl

- diselenides. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 367(1), 153-163. doi:10.1007/s11010-012-1328-5.
- Luchese, C., & Nogueira, C. W. (2010). Diphenyl diselenide in its selenol form has dehydroascorbate reductase and glutathione S-transferase-like activity dependent on the glutathione content. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62(9), 1146-1151. doi:10.1111/j.2042-7158.2010.01147.x %J Journal of Pharmacy and Pharmacology.
- Luo, S., & Wehr, N. B. J. R. R. (2009). Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2, 4-dinitrophenylhydrazine assay. 14(4), 159-166.
- Madaan, P., & Tyagi, V. K. (2008). Quaternary Pyridinium Salts: A Review. *Journal of Oleo Science*, 57(4), 197-215. doi:10.5650/jos.57.197.
- Marín-García, J. (2014). Chapter 14 - Oxidative Stress and Cell Death in Cardiovascular Disease: A Post-Genomic Appraisal. In J. Marín-García (Ed.), *Post-Genomic Cardiology (Second Edition)* (pp. 471-498). Boston: Academic Press.
- Marklund, S., & Marklund, G. J. E. j. o. b. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. 47(3), 469-474.
- Martin-Morales, A., Arakawa, T., Sato, M., Matsumura, Y., Mano-Usui, F., Ikeda, K., . . . Sato, K. (2021). Development of a Method for Quantitation of Glyceraldehyde in Various Body Compartments of Rodents and Humans. *J Agric Food Chem*, 69(44), 13246-13254. doi:10.1021/acs.jafc.1c03177.
- Mayne, S. T. (2003). Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative Stress Status in Epidemiologic Research. *The Journal of Nutrition*, 133(3), 933S-940S. doi:10.1093/jn/133.3.933S %J The Journal of Nutrition.
- McGill, M. R. (2016). The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI J*, 15, 817-828. doi:10.17179/excli2016-800.
- Monego, D. L., da Rosa, M. B., & do Nascimento, P. C. (2017). Applications of computational chemistry to the study of the antiradical activity of carotenoids: A review. *Food Chemistry*, 217, 37-44. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.073.

- Morales, M., & Munné-Bosch, S. (2019). Malondialdehyde: Facts and Artifacts. *Plant Physiology*, 180(3), 1246-1250. doi:10.1104/pp.19.00405 %J Plant Physiology.
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci*, 22(7). doi:10.3390/ijms22073380.
- Murphy, M. P., Holmgren, A., Larsson, N. G., Halliwell, B., Chang, C. J., Kalyanaraman, B., . . . Winterbourn, C. C. (2011). Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab*, 13(4), 361-366. doi:10.1016/j.cmet.2011.03.010.
- Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., & Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 687-704. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010.
- Nwachukwu, I. D., Sarteshnizi, R. A., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2021). A Concise Review of Current In Vitro Chemical and Cell-Based Antioxidant Assay Methods. *Molecules*, 26(16). doi:10.3390/molecules26164865.
- OECD. (2002). *Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method*.
- Penteado, F., Gomes, C. S., Perin, G., Garcia, C. S., Bortolatto, C. F., Bruning, C. A., & Lenardao, E. J. (2019). Regioselective Synthesis of 1-Sulfanyl- and 1-Selanylindolizines. *J Org Chem*, 84(11), 7189-7198. doi:10.1021/acs.joc.9b00871.
- Pinchuk, I., Shoval, H., Dotan, Y., & Lichtenberg, D. (2012). Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165(6), 638-647. doi:https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2012.05.003.
- Podlekareva, D. N., Efsen, A. M. W., Schultze, A., Post, F. A., Skrahina, A. M., Panteleev, A., . . . Kirk, O. (2016). Tuberculosis-related mortality in people living with HIV in Europe and Latin America: an international cohort study. *The Lancet HIV*, 3(3), e120-e131. doi:https://doi.org/10.1016/S2352-3018(15)00252-0.
- Rabek, J. P., Boylston Iii, W. H., & Papaconstantinou, J. (2003). Carbonylation of ER chaperone proteins in aged mouse liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(3), 566-572. doi:https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00826-X.

- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*, 2(2), 219-236.
- Ramasarma, T., Rao, A. V. S., Devi, M. M., Omkumar, R. V., Bhagyashree, K. S., & Bhat, S. V. (2015). New insights of superoxide dismutase inhibition of pyrogallol autoxidation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 400(1), 277-285. doi:10.1007/s11010-014-2284-z
- Reiter, R. J., Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Alatorre-Jimenez, M., & Qin, L. (2016). Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res*, 61(3), 253-278. doi:10.1111/jpi.12360.
- Ribeiro, A. J. S., Yang, X., Patel, V., Madabushi, R., & Strauss, D. G. (2019). Liver Microphysiological Systems for Predicting and Evaluating Drug Effects. *Clin Pharmacol Ther*, 106(1), 139-147. doi:10.1002/cpt.1458.
- Romulo, A. (2020). *The principle of some in vitro antioxidant activity methods*. Paper presented at the IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.
- Ruiz-Ojeda, F. J., Olza, J., Gil, Á., & Aguilera, C. M. (2018). Chapter 1 - Oxidative Stress and Inflammation in Obesity and Metabolic Syndrome. In A. M. del Moral & C. M. Aguilera García (Eds.), *Obesity* (pp. 1-15): Academic Press.
- Rusetskaya, N. Y., Fedotov, I. V., Koftina, V. A., & Borodulin, V. B. (2019). Selenium Compounds in Redox Regulation of Inflammation and Apoptosis. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 13(4), 277-292. doi:10.1134/S1990750819040085.
- Samuel, V. T., & Shulman, G. I. J. C. m. (2018). Nonalcoholic fatty liver disease as a nexus of metabolic and hepatic diseases. 27(1), 22-41.
- Scriven, E. F. V. (1984). 2.05 - Pyridines and their Benzo Derivatives: (ii) Reactivity at Ring Atoms. In A. R. Katritzky & C. W. Rees (Eds.), *Comprehensive Heterocyclic Chemistry* (pp. 165-314). Oxford: Pergamon.
- Shafik, N. M., & El Batsh, M. M. (2016). Protective Effects of Combined Selenium and Punica granatum Treatment on Some Inflammatory and Oxidative Stress Markers in Arsenic-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Biol Trace Elem Res*, 169(1), 121-128. doi:10.1007/s12011-015-0397-1.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review.

- Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>.
- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., & Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of Pharmacy Research*, 7(9), 828-835. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>.
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., & Kukreti, S. (2019). Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 24(8). doi:10.3390/molecules24081583.
- Skopelitou, K., Muleta, A. W., Pavli, O., Skaracis, G. N., Fliemetakis, E., Papageorgiou, A. C., & Labrou, N. E. (2012). Overlapping protective roles for glutathione transferase gene family members in chemical and oxidative stress response in *Agrobacterium tumefaciens*. *Functional & Integrative Genomics*, 12(1), 157-172. doi:10.1007/s10142-011-0248-x.
- Socrier, L., Rosselin, M., Gomez Giraldo, A. M., Chantemargue, B., Di Meo, F., Trouillas, P., . . . Morandat, S. (2019). Nitron-Trolox conjugate as an inhibitor of lipid oxidation: Towards synergistic antioxidant effects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1861(8), 1489-1501. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.06.008>.
- Solovyev, N. D. (2015). Importance of selenium and selenoprotein for brain function: From antioxidant protection to neuronal signalling. *J Inorg Biochem*, 153, 1-12. doi:10.1016/j.jinorgbio.2015.09.003.
- Stadtman, E., & Levine, R. J. A. a. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. 25(3-4), 207-218.
- Stiuso, P., Scognamiglio, I., Murolo, M., Ferranti, P., De Simone, C., Rizzo, M. R., . . . longevity, c. (2014). Serum oxidative stress markers and lipidomic profile to detect NASH patients responsive to an antioxidant treatment: a pilot study. 2014.
- Storkey, C., Pattison, D. I., Ignasiak, M. T., Schiesser, C. H., Davies, M. J. J. F. R. B., & Medicine. (2015). Kinetics of reaction of peroxynitrite with selenium-and sulfur-containing compounds: Absolute rate constants and assessment of biological significance. 89, 1049-1056.

- Sumida, Y., Nakashima, T., Yoh, T., Furutani, M., Hirohama, A., Kakisaka, Y., . . . Okanoue, T. J. J. o. h. (2003). Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *38*(1), 32-38.
- Székács, I., Tokarz, P., Horvath, R., Kovács, K., Kubas, A., Shimura, M., . . . Szyrwiel, Ł. (2019). In vitro SOD-like activity of mono- and di-copper complexes with a phosphonate substituted SALAN-type ligand. *Chemico-Biological Interactions*, *306*, 78-88. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.04.003>.
- Taslimi, P., & Gulçin, İ. J. J. o. f. b. (2018). Antioxidant and anticholinergic properties of olivetol. *42*(3), e12516.
- Torres, D. J., Alfulajj, N., & Berry, M. J. (2021). Stress and the Brain: An Emerging Role for Selenium. *Front Neurosci*, *15*, 666601. doi:10.3389/fnins.2021.666601
- Torres, M. C. L., Soares, N. d. F. F., & Pereira, J. A. M. J. C. e. A. (2006). Extraction of glutathione s-transferase from bovine liver. *30*, 302-307.
- Tran, P. T., & Tran, T. T. N. (2021). Evaluation of Acute and Subchronic Toxicity Induced by the Crude Ethanol Extract of *Plukenetia volubilis* Linneo Leaves in Swiss Albino Mice. *Biomed Res Int*, *2021*, 6524658. doi:10.1155/2021/6524658
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Curr Biol*, *27*(21), R1147-R1151. doi:10.1016/j.cub.2017.09.019.
- van Lith, R., & Ameer, G. A. (2016). Chapter Ten - Antioxidant Polymers as Biomaterial. In T. Dziubla & D. A. Butterfield (Eds.), *Oxidative Stress and Biomaterials* (pp. 251-296): Academic Press.
- Videla, L. A., Rodrigo, R., Orellana, M., Fernandez, V., Tapia, G., Quiñones, L., . . . Csendes, A. J. C. s. (2004). Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *106*(3), 261-268.
- Vitaku, E., Smith, D. T., & Njardarson, J. T. (2014). Analysis of the Structural Diversity, Substitution Patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles among U.S. FDA Approved Pharmaceuticals. *Journal of Medicinal Chemistry*, *57*(24), 10257-10274. doi:10.1021/jm501100b.

- Wirth, T. (2015). Small Organoselenium Compounds: More than just Glutathione Peroxidase Mimics. *54*(35), 10074-10076. doi:<https://doi.org/10.1002/anie.201505056>.
- Wu, Z., Tan, B., Liu, Y., Dunn, J., Martorell Guerola, P., Tortajada, M., . . . Ji, P. (2019). Chemical Composition and Antioxidant Properties of Essential Oils from Peppermint, Native Spearmint and Scotch Spearmint. *Molecules*, *24*(15). doi:10.3390/molecules24152825
- Yu, Y., Cai, J., She, Z., & Li, H. J. A. S. (2019). Insights into the epidemiology, pathogenesis, and therapeutics of nonalcoholic fatty liver diseases. *6*(4), 1801585.
- Zhang, L., Wang, X., Cueto, R., Effi, C., Zhang, Y., Tan, H., . . . Wang, H. (2019). Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biol*, *26*, 101284. doi:10.1016/j.redox.2019.101284.
- Zhao, H., Zhang, R., Yan, X., & Fan, K. (2021). Superoxide dismutase nanozymes: an emerging star for anti-oxidation. *Journal of Materials Chemistry B*, *9*(35), 6939-6957. doi:10.1039/D1TB00720C.

## ANEXOS

## ANEXO A – Carta de aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA)

11/12/21, 11:13 AM

SEI/UFPEL - 1497741 - Parecer



PARECER Nº  
PROCESSO Nº

145/2021/CEUA/REITORIA  
23110.027542/2021-11

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação do potencial antioxidante de derivados de sais de piridínio contendo selênio *in vitro***”, registrada com o nº 23110.027542/2021-11, sob a responsabilidade de **Cristiani Folharini Bortolatto** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais, em reunião de 11 de novembro de 2021.

Finalidade	( x ) Pesquisa      ( ) Ensino
Vigência da autorização	Início = <b>11/11/2021</b> Término = <b>10/01/2024</b>
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> / Swiss
Nº de animais	<b>45</b>
Idade	45 dias
Sexo	Machos ou fêmeas
Origem	Biotério Central - UFPel

Código para cadastro nº CEUA **027542/2021-11**

---

**Priscila Marques Moura de Leon**

[https://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador.php?acao=documento\\_imprimir\\_web&acao\\_origem=arvore\\_visualizar&id\\_documento=1693994&infra\\_sist...](https://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=1693994&infra_sist...) 1/2



Documento assinado eletronicamente por **PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON, Professor do Magistério Superior/Adjunto**, em 12/11/2021, às 00:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º, § 3º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1497741** e o código CRC **8AA931FE**.