

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS-UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS-FACET
MESTRADO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AMBIENTAL
LABORATÓRIO DE CATÁLISE ORGÂNICA E BIOCATÁLISE-LACOB**

TÁBATA BRANQUINHO DE ALBUQUERQUE

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULA DE SELÊNIO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AMBIENTAL

DOURADOS/MS

2016

TÁBATA BRANQUINHO DE ALBUQUERQUE

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULA DE SELÊNIO**

ORIENTADOR: PROF. DR. NELSON LUÍS DE CAMPOS DOMINGUES

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

DOURADOS/MS

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A345s	<p>Albuquerque, Tabata Branquinho de.</p> <p>Síntese, caracterização e estudo da atividade antioxidante e toxicidade de nanopartícula de selênio. / Tabata Branquinho de Albuquerque. – Dourados, MS : UFGD, 2017.</p> <p>37f.</p> <p>Orientador: Nelson Luis de Campos Domingues.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Nanopartículas . 2. Selênio . 3. Antioxidante. I. Título.</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.



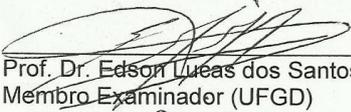
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Síntese, caracterização e estudo da atividade antioxidante e toxicidade de nanopartículas de selênio”**, de autoria de **Tábata Branquinho de Albuquerque**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. Nelson Luís de Campos Domingues
Presidente da banca examinadora



Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. Leonardo Ribeiro Martins
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 20 de maio de 2016.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

**DEDICO ESTE TRABALHO A DEUS TODO
PODEROSO DE ONDE VEM MINHAS
FORÇAS E A MINHA AMADA FAMÍLIA.**

AOS MEUS PAIS VALDEMIR, MEU FIEL ESCUDEIRO
E NUÉDJA MINHA MAE ,E AO MEU IRMÃO PÁBULO.
OBRIGADA PELO AMOR, APOIO E PACIÊNCIA,
CONFIANÇA, MOTIVAÇÃO INCONDICIONAL. QUE
SEMPRE ME IMPULSIONA EM DIREÇÃO ÀS
VITÓRIAS DOS MEUS DESAFIOS.

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora Aparecida, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar. Por ter me dado a permissão de chegar até aqui, e por toda a força concedida na concretização desse sonho. Além disso, agradeço a Ele por todas as pessoas que cruzaram meu caminho e que estão aqui citadas, todas muitíssimo especiais.

Minha história de amor pelo conhecimento, pela vontade de aprender, pela busca de força e coragem a fim de superar os desafios e as adversidades impostas pela vida começa desde quando nasci. Portanto, nada mais natural que agradecer a minha família. Agradeço ao meu pai **Valdemir**– meu exemplo, meu espelho, meu herói – por seus valores morais inestimáveis, que em sua capacidade de amor maior e altruísmo proveu a mim e a meu irmão. Sempre me dando muita força em tudo. Agradeço a minha mãe **Nuédja** pelo seu zelo incansável e pelo seu amor incondicional, sempre presente. Meus pais vocês são eternos em mim, através do seu exemplo, dos seus valores morais e espirituais. Ao meu irmão **Pabulo** minha identidade, meu amigo me deu meu bem mais precioso minha sobrinha linda que amo tanto, tia te ama Lorryne.

In memoria ao meu namorado (**Charles Junior** saudades eternas), o meu príncipe pelo amor que me mostrou a direção correta e me ensinou a ter fé na vida, meu amigo e companheiro se foi ao menos me dizer um Adeus, mas vive em meu coração para todo sempre, te perder foi a pior dor que pude ter e não imaginava, tudo muito rápido, tudo em questão de um minuto, mas Deus sempre leva em sua hora, pra tudo a uma explicação sem conseguirmos acreditar, você foi, é, e sempre será meu único amor.

Durante esses anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho. Primeiramente, agradeço a **Nelson Luis de Campos Domingues** por acreditar que eu era capaz e pela orientação. Mesmo

chegando sem me conhecer direito, você abriu as portas, como um pai que abre os braços para receber um filho. Nesse mundo, repleto de pessoas ruins, você me faz acreditar que os bons são a maioria. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e dedicação. Você é uma pessoa ímpar, onde busco inspirações para me tornar melhor em tudo faço e irei fazer daqui para frente. Tenho orgulho em dizer que um dia fui sua orientada. E que lógico ficarei mais quatro anos para sua alegria. Obrigado por tudo Professor.

A minhas queridas amigas **Aline Rufino Oliveira (Alaine)** e **Mariana Pompilio Darbem (Pompis)** só tenho que agradecer a vocês a ajuda o companheirismos a lealdade, minhas amigas do peito minhas fieis escudeiras, estiveram ao meu lado no momento em que eu mais precisei parceiras, e que agora cada uma segue seus caminhos oposto e lembre aonde tiverem estarei com vocês, que nossa amizade permaneça para sempre. Adoro de mais vocês.

E não esqueçam: Aproveite bem, o máximo que puder, o poder e a beleza da juventude. Ou, então, esquece. Você nunca vai entender mesmo o poder e a beleza da juventude até que tenham se apagado. Mas pode crer, daqui a vinte anos você vai evocar as suas fotos. E perceber de um jeito que você nem desconfia, hoje em dia, quantas, tantas alternativas se escancaravam a sua frente. E como você realmente estava com tudo encima. Você não tá gordo, ou gorda. Não se preocupe com o futuro. Ou então preocupe-se, se quiser, mas saiba que preocupação. É tão eficaz quanto mascar chiclete. Para tentar resolver uma equação de álgebra. As encrencas de verdade da sua vida tendem a vir de coisas que nunca passaram pela sua cabeça preocupada. Te pegam no ponto fraco às 4 da tarde de um terça-feira modorrente. Todo dia, enfrente pelo menos uma coisa que te meta medo de verdade. Cante. Não seja leviano com o coração dos outros. Não ature gente de coração leviano. Use fio dental. Não perca tempo com inveja. Às vezes se está por cima, Às vezes por baixo. A peleja é longa e, no fim, É só você contra você mesmo. Não esqueça os elogios que receber. Esqueça as ofensas. Se conseguir isso, me ensine. Guarde as antigas cartas de amor. Jogue fora os extratos bancários velhos. Estique-se. Não se sinta culpado por não saber o que fazer da vida. As pessoas mais interessantes que eu conheço não sabiam, Aos 22, o que queriam fazer da vida. Alguns dos quarentões mais interessantes que conheço ainda não sabem. Tome bastante cálcio. Seja cuidadoso com os joelhos. Você vai sentir falta deles. Talvez você case, talvez não. Talvez tenha

filhos, talvez não. Talvez se divorcie aos 40, talvez dance ciranda em suas bodas de diamante. Faça o que fizer, não se auto congratule demais, nem seja severo demais com você. As Suas escolhas tem sempre metade das chances de dar certo, é assim pra todo mundo.

Desfrute de seu corpo use-o de toda maneira que puder, mesmo!

Não tenha medo do seu corpo ou do que as outras pessoas possam achar dele. É o mais incrível instrumento que você jamais vai possuir. Dance! Mesmo que não tenha aonde além de seu próprio quarto. Leia as instruções, mesmo que não vá segui-las depois. Não leia revistas de beleza, elas só vão fazer você se achar feio! Entenda que amigos vão e vem, mas nunca abra mão de uns poucos e bons. Esforce-se de verdade pra diminuir as distâncias geográficas e de estilos de vida. Porque quanto mais velho você ficar, mais você vai precisar das pessoas que conheceu quando jovem. More uma vez em Nova York, mas vá embora antes de endurecer. More uma vez no Havaí, mas se mande antes de amolecer.

Viaje.

Aceite certas verdades inescapáveis: os preços vão subir, os políticos vão saracotear você, também, vai envelhecer. E quando isso acontecer. Você vai fantasiar que quando eram jovens os preços eram razoáveis. Os políticos eram decentes E as crianças respeitavam os mais velhos. Respeite os mais velhos. E não espere que ninguém segure a sua barra. Talvez você arrume uma boa aposentadoria privada, Talvez case com um bom partido, mas não esqueça que um dos dois pode de repente acabar. Não mexa demais nos cabelos, senão quando você chegar aos 40, vai aparentar 85. Cuidado com os conselhos que comprar, Mas seja paciente com aqueles que os oferecem. Conselho é uma forma de nostalgia. Compartilhar conselhos é um jeito de pescar o passado do lixo, esfregá-lo, Repintar as partes feias e reciclar tudo por mais do que vale. (Pedro Bial).

Como não esquecer as VIPS **Carenzinha, Bea, Beatriz Fuzinato, Amandinha, Crisciele** ah como vocês são especiais, nunca tive um grupo tão especial, vocês são de mais, amo vocês de todo o meu coração. Minhas Best Friends.

A meus amigos de trabalho e de anos **Renan Motta, Aline Andrade Martins, Simone de Moraes Lopes** obrigado pelo apoio de vocês, e amizades constantes, vocês também estiveram e estão sempre ao meu lado.

As melhores ne! **Jaque e Paola**, ah vocês foram essenciais, me ajudaram e como me identifiquei com vocês, as rizadas os experimentos, só tenho que agradecer.

Ao professor **Edson Lucas** muito obrigado por todo o apoio para realização dos experimentos, e pelo aprendizado.

À **Universidade Federal da Grande Dourados-(UFGD)**, pelo ensino de qualidade e pelas oportunidades oferecidas.

RESUMO

O termo "nanopartícula" é usado para descrever uma partícula com tamanho de intervalo de 1 a 100 nm. As nanopartículas podem ser provenientes de diversas fontes tais como: óxidos, polímeros, híbridos, fármacos, etc. Podem apresentar grande diversidade decorrente das inúmeras possibilidades de morfologias sendo que muitas vezes a morfologia está intrinsecamente ligada a uma ou mais determinada propriedade apresentada pelas nanopartículas. Ademais, há uma grande diferença entre a forma nanoparticulada e a não nanoestruturada ou "bulk" no que tange a propriedades físicas, químicas e biológicas fato este muito importante para diversos ramos da ciência atual. Logo, existe uma vasta área de aplicação das nanopartículas tais como células voltaicas, baterias, catalisadores e cosméticos, fármacos e etc. Dessa maneira, a busca por novos métodos de síntese bem como novas formas ou estruturas das nanopartículas tem se tornado objeto de estudo de vários pesquisadores. Neste sentido, o uso do Selênio (Se) na obtenção dessas nanopartículas vem crescendo nos dias atuais. O grande interesse pelo Selênio é de fato do mesmo ser reconhecidamente como um antioxidante e conseqüentemente ser um elemento essencial a saúde humana. Tendo em vista a grande importância do selênio para organismos vivos o presente projeto teve como objetivo sintetizar, caracterizar nanopartículas de selênio (Np Se⁰) e avaliar sua atividade antioxidante frente a utilização de precursores de radicais livres como DPPH e AAPH bem como investigar a viabilidade de nematoides expostos a diversas concentrações das Np Se⁰. Os resultados mostraram as Np Se⁰ apresentaram morfologia esférica confirmada, potencial antioxidante nas concentrações avaliadas, capaz de capturar o radical livre DPPH e inibir a peroxidação lipídica, a avaliação do teste de toxicidade com *C. elegans* mostraram que as Np Se⁰ não apresentaram toxicidade para o respectivo modelo experimental.

Palavras-chaves: Nanopartículas, selênio, antioxidante.

ABSTRACT

The term 'nanoparticle' is used to describe a particle with 1 and 100 nanometers in size. They may come from different sources, such as oxides, polymers, hybrid materials, medicaments etc. Such particles may show a great variety resulted from the innumerable morphological possibilities which is mostly intrinsically bonded to one or more specific property they may have. Moreover, there is a great difference between the nanoparticle and the non-nanostructure bulk materials especially related to their physical, chemical and biological properties, what seems to be an important fact for the several branches of current Science. Thus, there is a wide area of application for the nanoparticles, such as voltaic cells, batteries, catalysts, cosmetics, drugs etc. and in this perspective, the search for new methods for their syntheses, as well as new structures or shapes of nanoparticles has increasingly become the core point of several researches. In this regard, the use of Selenium (Se) aiming the nanoparticles' obtaining is currently increasing. The great interest by the Selenium comes from the fact that is widely known as anti-oxidant and, consequently, an essential element for human health. Thus, considering their great importance for living organisms, this study aimed the synthesis and characterization of Selenium nanoparticles (Np Se⁰), as well as, the evaluation of the anti-oxidant activity of such nanoparticles as precursors of free radicals, as DPPH and AAPH. We also investigated the viability of the nematodes exposed to different concentrations of the Np Se⁰. The results pointed that such nanoparticles present confirmed spherical morphology and anti-oxidant potential for the assessed concentrations. They were also able to capture the DPPH free radical, as well as to inhibit the lipid peroxidation. The evaluation of the toxicity test with *C. elegans* showed that the Np Se⁰ did not present toxicity for the respective experimental model.

Keywords: Nanoparticles. Selenium. Anti-oxidant

LISTA DE ABREVIATURAS

GPx	Glutathiona Peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
RLs	Radicais Livres
Se	Selênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ERN`S	Espécies Reativas de Nitrogênio
MDA	Malonildialdeido
BHT	Hidroxitolueno Butilato
O ₂ ⁻	Radical Superóxido
OH	Radica Hidroxila
Cat	Catalase
PL	Peroxido Lipidico
SOD	Superoxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
Np	Nanopartícula

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.Exemplo geral para a peroxidação lipídica.....	10
Figura 2. Número total de publicações anuais para pesquisa no website Web of Science com a entrada C elegans.....	12
Figura 3. Representação geral da preparação da Np Se ⁰	15
Figura 4. Avaliação de Toxicidade com C. Elegans.....	20
Figura 5. Coloração final da solução de Np Se ⁰	21
Figura 6. Análise da Np Se ⁰ pelo método UV-Vis – a banda em preto refere-se ao dióxido de selênio (SeO ₂), a banda em vermelho ao ácido ascórbico e a banda em verde a Np Se ⁰	22
Figura 7. Análise de tamanho e morfologia das Np Se ⁰ pelo método microscopia de transmissão eletrônica (MEV).	23
Figura 8. Percentual de captura do radical livre DPPH em diferentes concentrações (µg/mL) de ácido ascórbido, (BHT) e Np Se ⁰ . Os valores são expressos como média ± SEM.....	24
Figura 9. Hemólise de eritrócitos humanos incubados durante 120, 180 e 240 min, com 5 µg/mL de Np Se ⁰ . Os valores são expressos como média ± SEM. P < 0,05 comparados ao grupo controle NaCl 0.9 %.....	25
Figura 10. Inibição da hemólise de eritrócitos humanos induzida por AAPH, incubados durante 120, 180 e 240 min, com diferentes concentrações (µg/mL) de ácido ascórbico e Np Se ⁰ . Os valores são expressos como média ± SEM.* P < 0,05; ** P < 0,01; ***P < 0,001 comparados ao grupo Controle AAPH.	27
Figura 11. Conteúdo de MDA em eritrócitos incubados com diferentes concentrações (µg/mL) de ácido ascórbico e Np Se ⁰ por 180 min. O grupo Controle foi incubado apenas com AAPH. Os valores são expressos como média ± SEM. * P < 0,05; ** P < 0,01; ***P < 0,001 comparados ao grupo Controle.	28
Figura 12. Percentual de viabilidade de nematoides <i>C. elegans</i> tratados com diferentes concentrações (µg/mL) de Np Se ⁰ por 24h. Os valores são expressos como média ± SEM.....	29

LISTA DE EQUAÇÃO

Equação 1- Equação matemática para a determinação da porcentagem de inibição do radical livre DPPH para as amostras.....	16
Equação 2- Representação da avaliação de destruição dos glóbulos vermelhos....	17
Equação 3- Representação da avaliação de destruição dos glóbulos vermelhos....	18

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. NANOPARTÍCULAS.....	4
3.2. SELÊNIO (Se).....	5
3.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO), ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO (ERN'S) E ESTRESSE OXIDATIVO.....	7
3.4. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	10
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	14
4.1. MATERIAIS	14
4.1.1. REAGENTES E SOLVENTES	14
4.1.2. EQUIPAMENTOS	14
4.2. SÍNTESE DA NANOPARTÍCULA DE SELÊNIO (Np Se ⁰).....	15
4.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - ATIVIDADE DE CAPTURA DO RADICAL LIVRE(DPPH).....	16
4.4. ENSAIO ANTIOXIDANTE UTILIZANDO CÉLULAS ERITROCITÁRIAS HUMANAS	16
4.4.1. PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO ERITROCITÁRIA.....	16
4.4.2. AVALIAÇÃO DE DESTRUIÇÃO DE GLÓBULOS VERMELHOS.....	17
4.4.3 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA HEMÓLISE	17
4.4.4. AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	18
4.4 ESTUDO DO MODELO EXPERIMENTAL IN VIVO DE TOXICIDADE VIA CAENORHABDITIS ELEGANS.....	19
4.4.1 CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DE CAENORHABDITIS ELEGANS.....	19
4.4.2 AVALIAÇÃO DE TOXIDADE	19
4.4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1. SÍNTESE DAS NP Se ⁰	21
5.2. CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA	22
5.2.1. ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS	22
5.2.2. ANÁLISE DO TAMANHO E MORFOLOGIA	23

5.2.3.1. CAPTURA DE RADICAL LIVRE (DPPH)	24
5.2.4. HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS	25
5.2.5 INIBIÇÃO DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS INDUZIDOS COMAAPH	26
5.3. INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	28
5.3. ESTUDO IN VIVO DE TOXICIDADE VIA CAENORHABDITIS ELEGANS ..	29
6. CONCLUSÃO.....	30
7. REFERÊNCIAS.....	31
8. MEMORIAL DAS ATIVIDADES.....	37
8.1 CRÉDITOS EXIGIDOS PELO PROGRAMA	37
8.2 CRÉDITOS CUMPRIDOS	37

1. INTRODUÇÃO

Nanopartículas são termodinamicamente instáveis e têm a tendência natural de se agregar e aumentar. Desta forma, o grande desafio consiste em preparar nanomateriais estáveis (ou seja, que permaneçam nesta escala de tamanho sem sofrer decomposição ou agregação que resulte no seu crescimento) e monodispersos, tanto com relação ao tamanho quanto à forma de suas partículas, contudo, que possam ser manipulados sem perder suas características (NAGARAJA *et al.*; 2008).

Com isso, as nanopartículas podem ser eficientemente utilizados em aplicações biotecnológicas, sendo capazes de se manterem estáveis por longos períodos de tempo, sem que haja perda de suas propriedades, ou sofrer modificações estruturais (KREUTER, 2007).

Dessa maneira, a busca por novos métodos voltados a aumentar a estabilidade química das nanopartículas tem se tornado objeto de estudo de vários pesquisadores. (NAGARAJA, R., 2008).

Contudo, tem sido crescente o uso do Selênio (Se) na obtenção dessas nanopartículas. O grande interesse pelo Selênio é de fato reconhecido como um antioxidante e conseqüentemente ser um elemento essencial a saúde humana (URSINI, F. 1987).

Assim, sua confirmação como elemento essencial foi descrito na literatura, por CARAPELLA, S. C., 1984 que descreveu que animais alimentados com uma dieta reduzida de selênio apresentavam baixo crescimento ou elevado índice de mortalidade, ainda que com suprimento adequado de vitamina E. Assim, foi caracterizado o importante papel fisiológico do selênio (CARAPELLA, S. C., 1984).

Tendo em vista a grande importância do Selênio, 20 anos depois dos primeiros estudos, foi descrito que o selênio apresenta importância primordial sobre as enzimas antioxidantes endógenos fazendo parte de sítios ativos da enzima glutatona peroxidase (GPx). Dentre estas, tanto a glutatona peroxidase celular quanto a plasmática são os parâmetros funcionais utilizados na determinação das propriedades antioxidantes do selênio no organismo (WANG, P. C. 2002).

Nesse ponto vale ressaltar que o Selênio (constituente vital da glutathione peroxidase) consiste em ser um cofator na defesa contra o estresse oxidativo, inibindo assim a formação de compostos oxidativos nas células (FLOHÉ, I. *et al.*; 2000).

Em virtude disso, a primeira linha de combate aos radicais livres nos organismos vivos são as enzimas com propriedades antioxidantes, uma vez que a deficiência de selênio leva a uma diminuição da atividade da glutathione peroxidase nas células e conseqüentemente à uma elevação do stress oxidativo e morte celular (NAGARAJAN, 2008).

Cabe neste ponto ressaltar que os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações, são capazes de reduzir ou inibir as taxas de oxidação (SCHNEIDER, C. 2004).

Os antioxidantes atuam principalmente pelas vias enzimáticas e não enzimáticas, o enzimático - composto pelas enzimas produzidas no organismo, como a coenzima Q-10; e o não enzimático - formado pelas vitaminas C (ácido ascórbico) compostos fenólicos como os flavonoides, carotenoides como o betacaroteno e o mineral selênio (BARBOSA, K. B. F. *et al.*;2008).

Os antioxidantes agem nas três linhas de defesa orgânica contra as espécies reativas de oxigênio. A primeira linha é a de prevenção, que se caracteriza pela proteção contra a formação das substâncias agressoras. Na segunda linha é neste estágio que os antioxidantes precisam capturar os radicais livres, os quais, uma vez formados, iniciam suas atividades destrutivas. E a terceira linha é o reparo, no qual atuam quando a prevenção e a captura não foram completamente efetivas e os produtos da destruição pelos radicais livres estão sendo continuamente formados em baixas quantidades e desta forma podem se acumular no organismo (BARREIROS, A. L. B.S. 2006).

Tendo em vista a importância e a ampla aplicação do Selênio, o presente trabalho tem por objetivo avaliar e caracterizar as atividades antioxidante das nanopartículas de Selênio (Np Se⁰).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Sintetizar, caracterizar físico-química e morfologicamente as nanopartículas de selênio (Np Se⁰) bem como avaliar suas atividades antioxidantes *in vitro* e efeito toxico *in vivo* no modelo experimental *C. elegans*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. NANOPARTÍCULAS

O termo nanopartícula é usado para descrever uma partícula com tamanho de intervalo entre 1 a 100 nm (NAGARAJAN, R, 2008).

Este conceito de nanopartícula foi preconizado por Richard Feynman em 1959 em uma palestra na Reunião da Sociedade Americana de Física que teve por título “Há uma abundância de salas na parte inferior”. Nesta, Prof. Feynman especulou que propriedades incomuns surgiriam quando se estudasse materiais na escala nanométricas (LIA, H. Z. 2014). Todavia, naquele momento a nanotecnologia era apenas e tão semente uma especulação porém tal palestra serviu como a fonte de inspiração para diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo que passaram a ter a nanociência como uma de suas linhas principais (LIA, H. Z. 2014).

Somente no século XX, o estudo de materiais ganhou importância significativa no que tange ao desenvolvimento das nanopartículas levando ao surgimento e consolidação desta área do conhecimento (FRE STONE, I. 2007; LIZ-MARZÁN, L.M. 2004).

Todavia, a utilização de nanopartículas remonta de milhares de anos atrás como pode ser comprovado pela arqueologia que as determinou em pigmentos decorativos de antigos artefatos, como o famoso cálice de Lycurgus, e em esculturas romanas que contém pigmentos azuis provenientes de 15 nanopartículas de óxidos e metais, como ouro e prata (FRE STONE, I. 2007; LIZ-MARZÁN, L.M. 2004).

O estudo de nanopartículas teve seu início em meados do século XIX quando foram obtidos grandes progressos na síntese das mesmas bem como sua identificação decorrente do avanço tecnológico para tais finalidades. Como preconizado por Feynman, quando da obtenção e identificação das nanopartículas, muitas propriedades que dantes não podiam ser atribuídas a compostos na escala “bulk”, puderam ser observados na escala nanométricas (como por exemplo, o ouro) (LIA, H. Z.; TRUHLAR, D.G, 2014). A síntese das nanopartículas é um assunto de extrema importância pois pode afetar a morfologia das mesmas e, como consequência, as suas propriedades (SCHMID, G. 1992).

Como descrito, características morfológicas e tamanho das nanopartículas determinarão em sua grande maioria as propriedades físicas, químicas e biológicas. Portanto, desde a consolidação da nanotecnologia através do conhecimento para o desenvolvimento e estabilização das nanopartículas, diversos materiais como óxidos metálicos, cerâmicas, polímeros, materiais orgânicos e biomoléculas foram empregados em escala nano (NAGARAJAN, R. 2008; LIA, H. Z. 2014).

Logo, existe um vasto número de aplicações das nanopartículas em células, baterias, catalisadores e cosméticos (PASCHOALINO, M.P.; JARDIM, M. W.F.; 2010). Todavia, os primeiros avanços desta ciência na área farmacêutica foram obtidas na década de 1960 quando surgiram as formulações de liberação controlada de fármacos na escala nano (KREUTER, J. 2007).

Cumprir informar que as nanopartículas podem ser sintetizadas utilizando diversas metodologias contudo um grande desafio ainda que paira sobre novas formulações nanopartículas é concernente a estabilização das mesmas pois, há uma tendência termodinâmica intrínseca das nanopartículas à se agregarem (NAGARAJAN, R. 2008).

3.2. SELÊNIO (Se)

O semi-metal selênio (do grego *Selene*, lua) foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jons Jacob Berzelius, quando este observou um depósito vermelho sobre as paredes de uma câmara de chumbo usada para produzir ácido sulfúrico (BROWN, K. M.; 2001). O selênio está localizado na tabela periódica entre o enxofre e o telúrio, possuindo propriedades químicas e físicas semelhantes aos mesmos (BROWN, K. M.; 2001).

O selênio apresenta três formas alotrópicas incluindo selênio cinza, vermelho e preto e ocorre em quatro estados de oxidação: seleneto (Se^{-2}), selênio elementar (Se^0), selenito (Se^{+4}) e selenato (Se^{+6}) (URSINI, F.; 1987).

Dependendo da sua forma química o selênio pode apresentar toxicidade. Como exemplo, o selenato (SeO_4^{2-}) e o selenito (SeO_3^{2-}) são espécies altamente solúveis em água e são conhecidas por serem tóxicas a sistemas biológicos em concentrações relativamente baixas (HYMER, C. B., CARUSO, 2006). Enquanto, o selênio elementar

(Se⁰) é uma espécie insolúvel em água e não apresenta nenhuma toxicidade para os sistemas biológicos (FLOHÉ L.; et al.;2000). Já os selenetos (Se⁻²) são espécies altamente tóxicas e reativas que são rapidamente oxidadas a Se⁰ (WACHOWICZ, B. *et al.*; 2001).

Selênio encontra-se naturalmente no ambiente fragmentado irregularmente pelo solo e nas rochas sedimentares das regiões mais áridas e só em 1930, o selênio foi reconhecido como uma substância tóxica quando animais que se alimentaram de plantas que cresciam nestes solos apresentaram sintomas de envenenamento (HYMER, C. B., CARUSO, 2006).

O selênio possui um efeito sinérgico como antioxidante com a vitamina E, decorrente do fato de ambos atuarem no combate a peróxidos no organismo animal. É também parte integrante da enzima glutatona peroxidase que atua no citosol celular degradando os peróxidos, catalisando a destruição do peróxido de hidrogênio e/ou a decomposição dos hidroperóxidos lipídicos. Este último é de suma importância, pois interrompe a reação peroxidativa em cadeia dos radicais livres peróxido de hidrogênio em compostos atóxicos (ROTRUCK, J. T. *et al.*; 1973) (CARAPPELLA, S. C.; Jr. 1984)

Referente a Glutaciona Peroxidase (GPx), esta é das classes mais abundante enzimáticas encontrada em tecidos de mamíferos e atua, como dito, na prevenção da formação de espécies reativas de oxigênio e, portanto, contribuindo para a proteção das macromoléculas e biomembranas do organismo contra a oxidação (TAPIERO, H. et al.;2003. GONZAGA, I. B. et al.; 2001). A glutaciona peroxidase clássica, (GPx1), é a mais abundante seleno-protease em mamíferos e foi a primeira a ser identificada no citosol das células, onde atua como antioxidante, reduzindo peróxidos de hidrogênio (H₂O₂) e hidroperóxidos orgânicos livres a compostos atóxicos como água e álcool. (TAPIERO, H.; 2003)

Tendo em vista a GPX, outros compostos orgânicos contendo selênio foram sintetizados e estudos dos mesmos revelaram considerável toxicidade porém estes índices foram menores do que os compostos inorgânicos, embora muitos deles ainda não tenham sido testados biologicamente (MUGESH, G. 2001), (SAVARINO, L. *et al.*; 2001).

Neste sentido, nas últimas décadas estudos o desenvolvimento de compostos orgânicos de selênio vem sendo desenvolvidos por diversos grupos de pesquisa com

a finalidade de aplicação como antioxidantes, agentes anti-tumorais e antimibribianos, bem como imunomoduladores (MUGESH, G. 2001).

Além das suas propriedades antioxidantes, os compostos orgânicos de selênio também apresentaram propriedades anti-inflamatórias no que tange a redução de hidroperóxidos intermediários formados na via da cicloxigenase e lipoxigenase, diminuindo assim, a produção de prostaglandinas e leucotrienos (RAYMAN, M. P. 2000).

O selênio também exerce uma grande influência em patologias associadas aos transtornos de humor (HAWKES, W. C. 1996). Contudo, o aumento no consumo deste elemento estabiliza o humor e diminui o estado depressivo e outros sintomas negativos como ansiedade, confusão e hostilidade (HAWKES, W. C. 1996). No que diz respeito às doenças associadas ao envelhecimento, observou-se que níveis baixos de selênio foram associados à aceleração do declínio cognitivo no decorrer da idade (SAVARINO, L. *et al.*; 2001).

Nesse sentido, a quantidade dietética recomendada de selênio para homens e mulheres em idade adulta é $55 \mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$. Já para mulheres grávidas e em lactação esse valor aumenta para 60 e $70 \mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$, respectivamente (BENTON, D. 1991). Já a deficiência de selênio pode causar doenças como a de Keshan que provoca o aumento do coração e seu mau funcionamento (VIARO, R. S. *et al.*; 2001). Relatos desta doença foram descritos na China onde o consumo de selênio é inferior a $19 \mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$ para os homens e de $13 \mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$ para mulheres. A deficiência de selênio também pode afetar a função da tireoide, pois sabe-se que o selênio é essencial para síntese do hormônio ativo (VIARO, R. S. *et al.*; 2001).

3.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO), ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO (ERN'S) E ESTRESSE OXIDATIVO

Os agentes oxidantes mais conhecidos são os radicais livres (RLs) os quais apresentam características semelhantes a espécies atômicas ou moleculares que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa (VALKO, M. 2005). Essa configuração confere aos radicais livres altas instabilidades e reatividade bem como tempo de meia-vida (BARREIROS, A. L. B. S. 2006). Porém, a presença

dos radicais em quantidades ideais são essenciais para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais. (GILLHAN, B. 1997)

Produzidos naturalmente no organismos através de processos metabólicos oxidativo, os radicais livres são de extrema utilidade, como por exemplo, quando existe a necessidade de ativação do sistema imunológico. (SCHINEIDER, C. 2004) Os radicais livres, quando em um sistema vivo, decorrente de sua instabilidade e alta reatividade são comumente denominados como Espécies Reativas de Oxigênio (ERO ou do inglês ROS: "Reactive Oxygen Species") ou Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN ou RNS "Reactive Nitrogen Species"). As ERO são compostos que contém átomo(s) de oxigênio que são convertidos a espécies radicalares através do processo de respiração mitocondrial (BARREIROS, A.L.B. S.; 2006; VALKO, M. 2005).

Já as ERN são compostos contendo nitrogênio(s) em sua estrutura, altamente instáveis como NO[•], cátion nitrosonio (NO⁺), nitroxila (HNO), S-nitrosotiois (RSNOs), ONOO⁻, complexos de ferro dinitrosila (DAVID, J. M. *et al.*; 2006).

Com a finalidade de neutralizar ERO e/ou ERN, o organismo dispõe de uma série de substâncias (enzimas, compostos, etc.) quando essas espécies são produzidas em excesso (HALLIWELL, B. 1989). As ERO e/ou ERN apresentam origem endógena e exógena sendo esta causada por exposição aos raios UV, radiação ionizantes, quimioterápicos e aerobióticos (FERREIRA, A. L. A.; 1997).

Diversos estudos reportam que as ERO e/ou ERN são a causa ou um efeito primário de inúmeras doenças em humanos, além do próprio envelhecimento precoce. (VALKO, M. 2005 e referências nele descrito).

Dentre os exemplos mais relevantes de ERO e/ou ERN podemos citar:

- ✓ Radical superóxido ($HO^{\bullet -}$): é o mais comum e abundante na célula. Ele é considerado ERO primário, sendo formado no organismo através de processos provenientes da cadeia de transporte de elétrons, por ação das células fagocitárias, por reações de autoxidação ou pela ativação de O_{2(g)}. Apesar de o nome sugerir que esse radical tem alto poder oxidante, o superóxido atua na maioria das reações como um agente redutor (VALKO, M. 2005; VASCONCLOS, S. M. L. *et al.*; 2007).

✓ *Radical hidroxila (HO^{\bullet}):* é extremamente reativo, ou seja, uma vez formado tem uma meia-vida extremamente curta. Sua neutralização não se dá por mecanismos provenientes do organismo humano, ou seja, quando produzido reagem com diversas espécies tais como DNA, proteínas, carboidratos e lipídios, levando sua mutação ou inativação (VALKO, M. *et al.*; 2005; VACONCELOS, S. M. L. 2007).

✓ *Peróxido de hidrogênio (H_2O_2):* apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H_2O_2 participa da reação que dá origem a radicais livres tais como reação com tióis, sais de ferro e cobre, com proteínas heme e preoxidases (VALKO, M.; 2005).

✓ *Oxido nítrico (NO^{\bullet}):* é um importante radical do grupo das ERN's, sendo este sintetizado pelos tecidos biológicos através da enzima óxido nítrico. O respectivo óxido está também presente em abundância no organismo, pois participa de uma série de funções sinalizadoras como regulação da pressão sanguínea (vasodilatador), regulação do sistema imune, neurotransmissor e relaxamento muscular (VASCONCELOS, S. M. L. *et al.*; 2007). Quando exposto ao ar reage com o oxigênio formando o dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}) que é um potente iniciador da peroxidação lipídica (VALKO, M.; 2005; VASCONCELOS, S. M. L. *et al.*; 2007).

✓ *Oxigênio singlete (1O_2):* apresenta tempo de meia vida curto quando em sistemas teciduais (ca. 0,5 μ s) e é capaz de modificar o DNA diretamente através de reações com o mesmo. Apresenta alto potencial oxidante sendo este capaz de reagir com inúmeras moléculas biológicas, incluindo lipídios da membrana (VASCONCELOS, S. M. L. *et al.*; 2007). Em sistemas biológicos, a geração do oxigênio singlete pode dar início ao processo de peroxidação lipídica, fagocitose e reações que envolvem peroxidases, produzindo radicais alcóxilas (RO^{\bullet}) e peróxila (ROO^{\bullet}) (VASCONCELOS, S. M. L. *et al.*; 2007; RONSEIN, G. E, *et al.*; 2006).

3.4. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

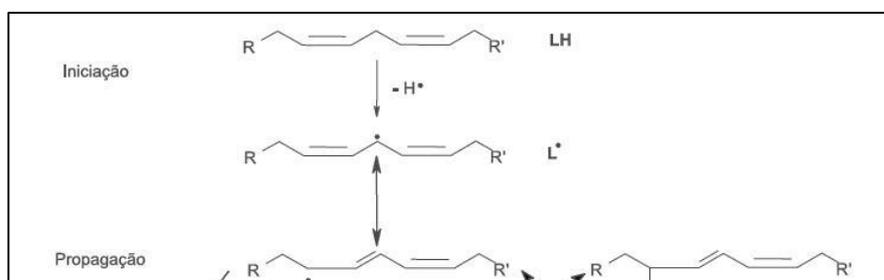
Os lipídios fazem parte de uma grande variedade de diversos compostos hidrofóbicos que incluem ácidos graxos, fosfolipídios, esteroides e outras substâncias. (HALLIWELL, B. 1993).

Os ácidos graxos são particularmente vulneráveis a peroxidação pelo ataque do radical OH^\bullet (LITTLE, R. E. 1999). Este processo leva a peroxidação lipídica, a qual pode ser mais bem definida como a deterioração oxidativa dos lipídios chamado peroxidação lipídica (*PL*). A peroxidação lipídica inicia-se com o sequestro do hidrogênio da membrana celular com conseqüente formação do radical lipídico. Este processo resulta em modificações nos lipídios da membrana que além de perder suas características estruturais tornam-se mais rígidos e menos flexíveis, levando a um evento citotóxico primário que desencadeia diversos danos às células como por exemplo a destruição da membrana e defasagem no metabolismo de troca de metabolitos intracelular podendo levar apoptose celular (ENGERS, V. K. *et al.*; 2011).

Tanto as membranas celulares como as organelas (mitocôndrias, peroxissomas) apresentam grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados que podem ser oxidados (GOMES, M. M. *et al.*; 2005). Estas reações ocorrem em três etapas: a iniciação, a propagação e a terminação (quando os radicais gerados reagem entre si) conforme Figura 1.

Figura 1-Exemplo geral para a peroxidação lipídica.

Disponível em: <http://biobioradicaislivres.blogspot.com.br/2010/12/peroxidacao-lipidica.html>

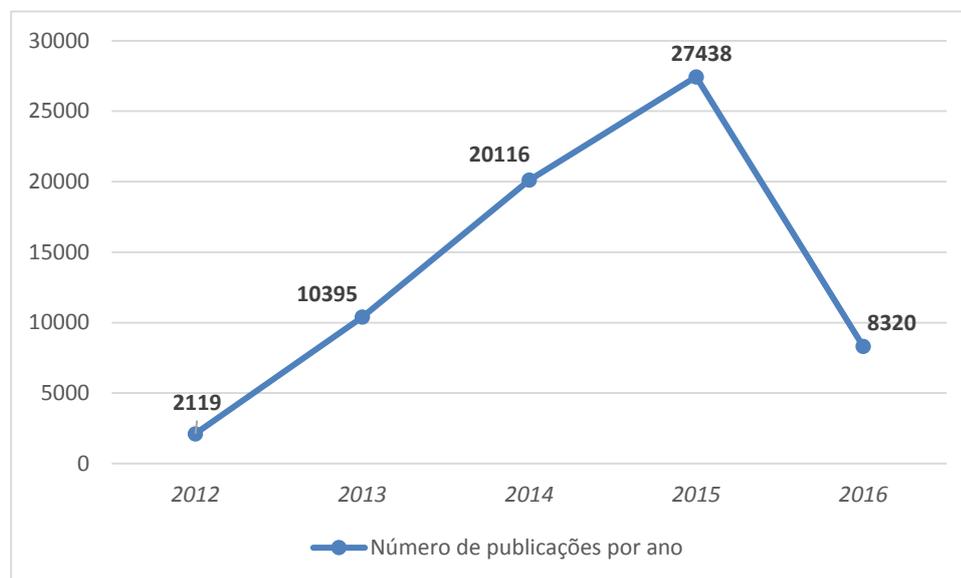


Dentre os produtos gerados pela peroxidação lipídica pode-se citar o malonaldeído (MDA), composto que após ser sintetizado no meio celular reage com resíduos de aminoácidos (induzindo perda de função por parte de proteínas) ou bases nitrogenadas (tendo assim propriedades mutagênicas) (FERREIRA, A. L. A. 1997).

3.5 MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO* PARA ESTUDOS DE TOXICIDADE (CAENORHABDITIS ELEGANS)

O *Caenorhabditis elegans* é um nematóide de vida livre, habitante do solo e comum em todo o mundo. São amplamente utilizados como um organismo modelo para os mais diversos tipos de estudos (Figura 2) (DONALD, D. L. C, 1997).

Figura 2- Número total de publicações anuais para pesquisa no website Web of Science com a entrada *C. elegans* (Fonte: http://apps.webofknowledge.com/CitationReport.do?product=UA&search_mode=CitationReport&SID=4CRpZQq4zRVUqWEKIWV&page=1&cr_pqid=9&viewType=summary realizada em 10 de março de 2016)



Como pode-se observar através da análise do Figura 2, há uma crescente tendência na utilização desta metodologia utilizando-se *C. elegans* para a descrição de diversos estudos. Cabe salientar que na mesma pesquisa de dados foram encontrados um número expressivo de citações no mesmo período de 72.570.

Tais fatos se justificam tendo em vista os atributos experimentais que tornam o *C. elegans* um modelo animal bem sucedido e com um número cada vez maior de publicações (Mota, M., 2001) em decorrência do mesmo ser um nematoide pequeno em comprimento (aproximadamente 1mm) que possibilita a fácil manutenção de grandes quantidades de espécimes (10000 vermes/placa) em placas de petri, alimentadas com *E. coli*, (WEN, H. *et al.*, 2001), de fácil manipulação e procriação, pois é um organismo hermafrodita gera entre 200 e 300 descendentes, (WEN, H. *et al.*, 2001), que possui uma período curto de vida de aproximadamente 21 dias o que possibilita a execução de estudos relacionados à longevidade em um espaço temporal praticamente impraticável em modelos mamíferos clássicos. (WEN, H. *et al.*, 2001)

Ademais, quanto à sua genética, o mesmo apresenta cerca de 60% dos genes homólogos aos de mamíferos (KALETTA, 2006). Do ponto de vista toxicológico o *C. elegans* é sensível a um amplo número de substâncias, incluindo metais pesados, fosfatos orgânicos e pesticidas (SCHOUDEST *et al.*, 2009; WOLLENHAUPT *et al.*,

2014). Neste sentido, vários estudos já demonstraram que o *C. elegans* são amplamente empregados em estudos de monitoramento ambiental (SCHOUEST *et al.*, 2009). Os parâmetros mais relevantes para a triagem toxicológica são a mortalidade (DENGG, M. 2004).

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAIS

4.1.1. REAGENTES E SOLVENTES

Os reagentes utilizados no presente trabalho foram: dióxido de selênio (SeO_2) (Vetec), ácido ascórbico (Vetec), água deionizada (Sartorius). 2,2'-Azobis-2-amidinopropano (AAPH) (Sigma Aldrich.), BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol) (Sigma Aldrich.).

4.1.2. EQUIPAMENTOS

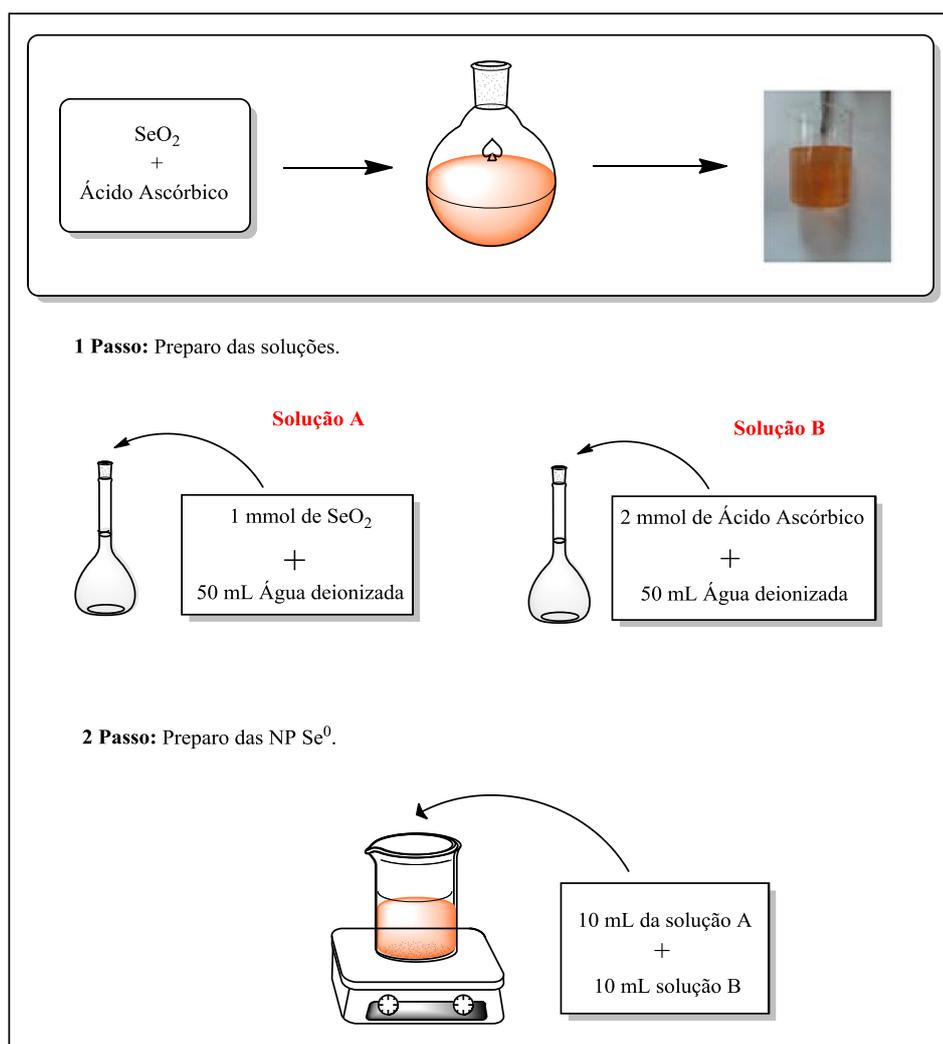
- ✓ Balança Analítica Digital (Marte).
- ✓ Agitador Magnético (Marconi).
- ✓ Micropipeta 100-1000 μL (Metrohm).
- ✓ Espectrofotômetro de UV-Vis, Cary Varian 500 (UV-Vis)
- ✓ Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) – modelo Pro-X Phenom da marca Anacom Científica.
- ✓ Microscópio modelo Motic SMZ-120 & W15X/40
- ✓ Banho-Maria.

4.2. SÍNTESE DA NANOPARTÍCULA DE SELÊNIO (Np Se⁰)

O método empregado para a síntese das NP Se⁰ foi descrito por LUO, *et al.*; 2012 o qual descreve a adição simultânea de 1:2 equivalentes mol de dióxido de selênio: ácido ascórbico para o preparo de uma solução de 1mM de Np Se⁰.

Para tanto, primeiramente em um balão volumétrico pesou-se 0,0111g de SeO₂ juntamente com 50 mL de água deionizada (Solução A). Já em outro balão volumétrico pesou-se 0,035 g de Ácido Ascórbico e dissolveu-se em 50 mL de água deionizada (Solução B). Posteriormente em um terceiro béquer adicionou-se 10 mL da de SeO₂ com 10 mL da solução de ácido ascórbico sendo esta solução final agitada por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Isto porque o ácido ascórbico degrada facilmente com a luz, para formação da nanopartícula de selênio.

Figura 3- Representação geral da preparação da Np Se⁰.



4.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - ATIVIDADE DE CAPTURA DO RADICAL LIVRE (DPPH)

A capacidade antioxidante foi determinada através da redução do radical do DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazina) conforme descrito por CAMPOS *et al.*; 2015, no qual o procedimento envolve a adição em um béquer de concentrações (0,1-20 µg.mL) de Np Se⁰, juntamente com a adição da solução de DPPH (0, 11 mM) em etanol 80%. Posteriormente, a mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente e deixada em repouso na ausência de luz durante 30 minutos.

Após o término, as amostras foram monitoradas através de um espectrômetro de UV-Vis no comprimento de onda de 517 nm. Para um melhor controle do teste da atividade oxidante da Np Se⁰, utilizou-se o ácido ascórbico e o BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

Após os testes a leitura da absorbância das amostras e do BHT, os dados foram correlacionadas para se estabelecer a porcentagem de radical do DPPH (equação 2). A equação matemática para a determinação da porcentagem de inibição do radical livre DPPH, conforme descrita por Barreiros *et al.* 2006.

Equação 1- Equação matemática para a determinação da porcentagem de inibição do radical livre DPPH para as amostras.

$$\text{Inibição do radical livre DPPH} = \left[1 - \left(\frac{Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \right) \right] \times 100$$

4.4. ENSAIO ANTIOXIDANTE UTILIZANDO CÉLULAS ERITROCITÁRIAS HUMANAS

4.4.1. PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO ERITROCITÁRIA

Para os respectivos ensaios antioxidante foram retiradas células eritrocitárias de doadores saudáveis que não fazem uso de medicamentos ou quaisquer suplementos vitamínicos que pudessem vir interferir no estresse oxidativo.

Uma amostra de 15 mL de sangue periférico foi coletado para o procedimento. O sangue foi centrifugado a 2000 rpm e o plasma juntamente com as células brancas foram cuidadosamente removidos em cada lavagem, para retirada de quaisquer

interferências. Em seguida as células vermelhas foram lavadas três vezes com uma solução de NaCl 0,9% e posteriormente utilizadas para o preparo de suspensões contendo concentrações entre 10% e 20 % de eritrócitos na presença do NaCl 0,9%.

4.4.2. AVALIAÇÃO DE DESTRUIÇÃO DE GLÓBULOS VERMELHOS

Tal metodologia foi realizada segundo descrita por CAMPOS *et al.*; 2015. Os eritrócitos na concentração de 10% foram pré-incubados a 37 °C em banho-maria durante 4 horas, com agitação constante na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico (controle) ou Np Se⁰ (50- 1000 ug.mL⁻¹) solubilizados em etanol. As medidas de absorvância referentes à porcentagem (%) de hemólise foram realizadas em um espectrômetro no comprimento de onda de 540 nm, em intervalos de 1 hora por um período total de 4 horas (**Equação 3**). Os testes foram realizados em duplicatas.

Equação 2- Representação da avaliação de destruição dos glóbulos vermelhos.

$$\% \text{ Hemólise} = \left[\left(\frac{Abs_{sobrenadante}}{Hemólise \text{ Total}} \right) \right] \times 100$$

4.3.4.3 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA HEMÓLISE

Foi avaliada a capacidade da Np Se⁰ em prevenir a hemólise eritrocitária induzida por radicais de peróxido gerados pela decomposição térmica di-hidroclorato de 2,2'-Azobis-2-amidinopropano (AAPH).

Tal procedimento envolveu a adição da suspensão de eritrócitos a 10%, pré-incubadas a 37°C por 30 min, em meio contendo ácido ascórbico ou Np Se⁰, ambos variando a concentração de 50 a 1000 µg.mL⁻¹. As amostras foram solubilizadas em etanol e posteriormente realizou-se a adição de 500 µL de uma solução de APPH (50 mM). Em seguida, realizou-se a incubação das amostras a 37°C durante 4 horas, com agitação constante.

É importante ressaltar que as medidas de porcentagem (%) de hemólise foram determinadas em intervalos de 60 min através da mensuração da absorbância conforme descrito no Esquema 3. Todos os testes foram realizados em duplicatas.

4.3.4.4. AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Para avaliar a peroxidação lipídica, utilizou-se a determinação da concentração de malondialdeído (MDA) por espectrofotometria de UV-Vis. À uma suspensão eritrocitária a 20% pré incubadas a 37 °C por 30 min foi adicionada diferentes concentrações de ácido ascórbico (controle) ou Np Se⁰ (50-1000 µg.mL⁻¹). Subsequentemente, adicionou-se 500 µL de uma solução de AAPH à 50 mM e a solução resultante foi incubada a 37 °C durante 4 horas, sob agitação constante.

Transcorrido o tempo, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm e retiradas alíquotas de 500 µL do sobrenadante as quais foram transferidas para tubos de 1 mL contendo 250 µL ácido tiobarbitúrico (TBA).

Utilizando-se como medida padrão (controle) a determinação da absorbância para uma solução contendo a mistura de 500µL de malondialdeído à 20 mM em meio de 1 mL de TBA. Tanto controle quanto as amostras foram incubadas a 96 °C por 45 min e em seguida, adicionou-se 4 mL de álcool *n*-butilico com posterior centrifugação a 2000 rpm. Logo, os sobrenadantes das amostras foram retirados e a absorbância foi mensurada a 532 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e as concentrações de MDA nas amostras foram expressa em nmol.mL⁻¹, sendo correlacionadas com o Equação 4.

Equação 3- Representação da avaliação de destruição dos glóbulos vermelhos.

$$MDA = Absorbância Amostra \times \left[\left(\frac{20 \times 220,32}{Hemólise\ total} \right) \right] \times 100$$

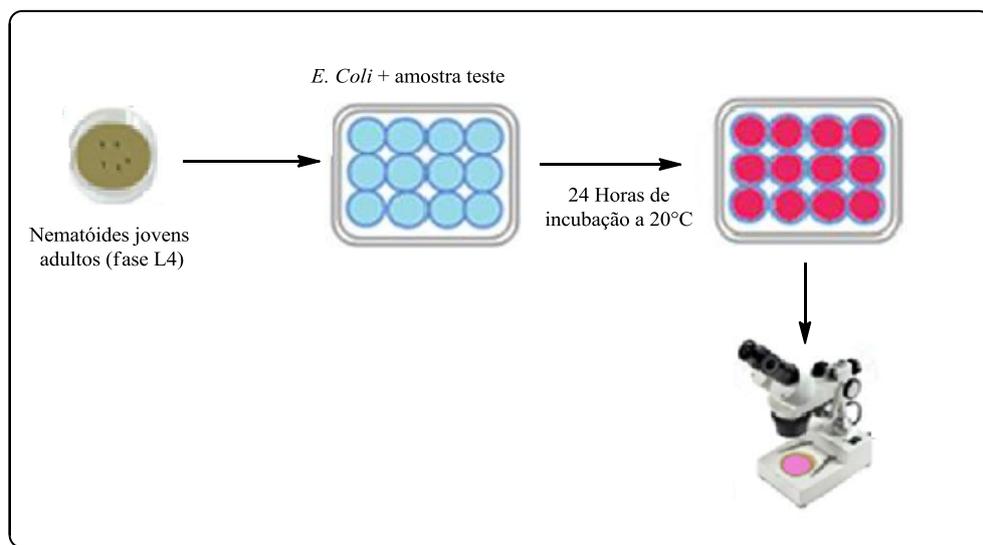
4.4 ESTUDO DE TOXICIDADE EM MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO* CAENORHABDITIS ELEGANS

4.4.1 CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DE CAENORHABDITIS ELEGANS

Para realização do ensaio de toxicidade *in vivo*, seguiu-se a metodologia descrita por DENG, M. 2004, no qual foi utilizado o nematoide *C. elegans*, linhagem selvagem N2. Os respectivos nematoides foram incubados a 20 °C em placas de petri contendo ágar *Nematode Growth Medium* (NGM), alimentados com bactérias *Escherichia coli* OP50-1. Para a sincronização dos nematoides foi realizada o tratamento dos indivíduos hermafroditas grávidos com hipoclorito de sódio (2 %mol) e hidróxido de sódio (5 %mol).

4.4.2 AVALIAÇÃO DE TOXIDADE

O ensaio de toxicidade das Np Se⁰ foi realizado no modelo *in vivo* *C. elegans* (Figura 4) em placas de 96 poços, de acordo com método realizado por DENG, M., (2004). Foram utilizados nematoides jovens adultos (fase L4), os quais foram incubados por 24 horas a 20 °C na presença da Np Se⁰ em diferentes concentrações (0,5–100 µg mL⁻¹) em meio M9. Após este período, a viabilidade dos nematoides foi avaliada através de toques repetidos com uma microespátula aos nematoides. Para manipulação e análise dos nematoides, foi utilizado um microscópio modelo Motic SMZ-140 & W10X/23. Os dados obtidos foram calculados a partir de três experimentos independentes contendo aproximadamente 10 nematoides por poço e em duplicata. Para calcular a dose letal para 50 % dos nematoides (DL₅₀) foram realizadas a equação da reta em função da porcentagem de mortalidade dos animais e das concentrações avaliadas.

Figura 4- Avaliação de Toxicidade com *C. Elegans*

4.4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Foi utilizado o programa estatístico *Graph Pad Prism 5.0*. Para análise e comparação dos resultados obtidos foi empregado o teste de variância de uma via, ANOVA, com pós-teste *Dunnett*. Vale ressaltar que os dados foram considerados significantes quando $P < 0,05$.

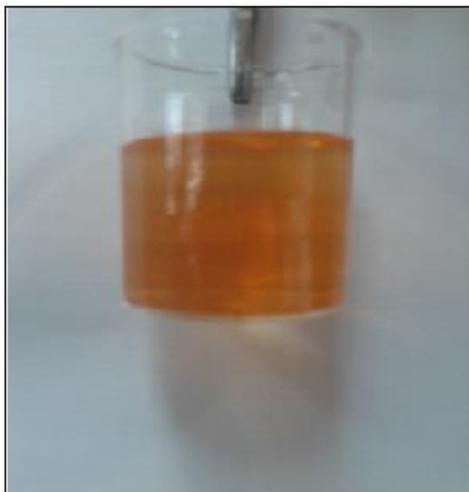
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SÍNTESE DAS NP Se⁰

Conforme descrito na literatura a efetividade da síntese de NP Se⁰ pode facilmente ser observada pelo monitoramento das mudanças de cores ao longo do tempo. Segundo LUO *et al.*; 2012 a síntese das NP Se⁰ é evidenciada através da mudança gradual da cor da solução inicial (incolor) que passa, ao longo do tempo, a ser amarela pálido e, em seguida, vermelha. Os autores afirmam que tal cor é característica da ocorrência da formação das NP Se⁰.

De posse dessas informações, e dos resultados obtidos (Figura 5), pode-se inferir a obtenção das respectivas NP Se⁰.

Figura 5. Coloração final da solução de NP Se⁰.

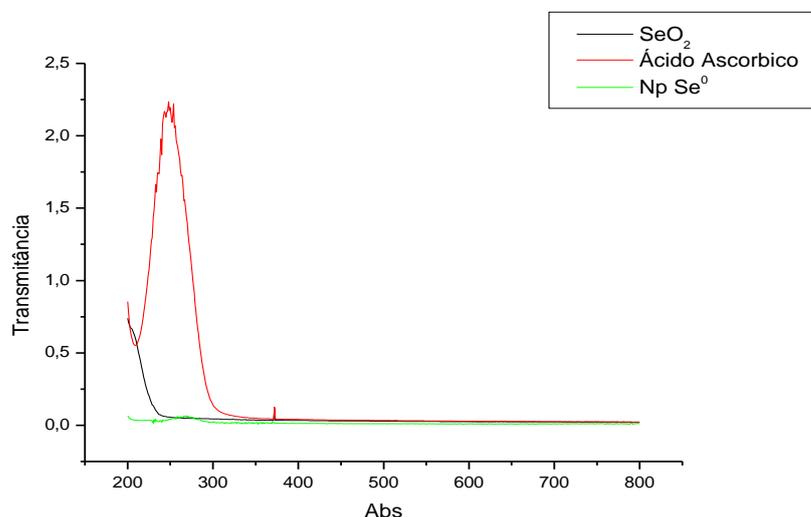


5.2. CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA

5.2.1. ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS

As Np Se⁰ foram analisadas espectroscopicamente via UV-Vis. Para tanto usa-se uma solução de SeO₂ e de ácido ascórbico nas mesmas concentrações da solução utilizada para a síntese das nanopartículas. Os resultados encontram-se na Figura 6.

Figura 6- Análise da Np Se⁰ pelo método UV-Vis – a banda em preto refere-se ao dióxido de selênio (SeO₂), a banda em vermelho ao ácido ascórbico e a banda em verde a Np Se⁰.

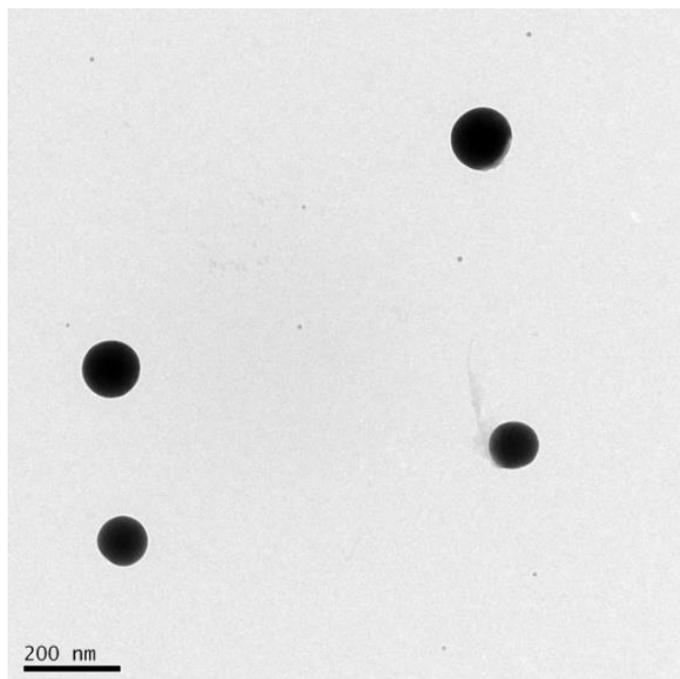


Conforme os resultados apresentados na Figura 6 pôde-se observar que para o SeO₂ que a absorbância máxima encontra-se antes de 200 nm e só pôde ser observado parte desta banda de transição. Já para o ácido ascórbico, sua absorbância máxima encontra-se em 248 nm pertencente à transição permitida n/π^* . Quando se analisou o espectro das Np Se⁰ pôde-se observar um efeito hipercrômico na banda de transição (queda da intensidade) e uma variação do comprimento de onda maior (batocrômico) com relação à banda de transição do SeO₂, indicando, assim, que as Np Se⁰ foram obtidas. Cumpre informar que este resultado está de acordo com o da literatura.

5.2.2. ANÁLISE DO TAMANHO E MORFOLOGIA

A análise morfológica das Np Se⁰ foi realizada através da técnica MEV e o resultado está apresentado na Figura 7.

Figura 7. Análise de tamanho e morfologia das Np Se⁰ pelo método microscopia de transmissão eletrônica (MEV).



Através da análise do resultado apresentado na Figura 7, pôde-se verificar que a estrutura das Np Se⁰ apresenta dimensões nanométricas. Conforme descrito por LUO *et al.*; 2012 as Np Se⁰ apresentam uma média de diâmetro de 133 nm. Já LIA *et al.*; 2004 as nanopartículas podem apresentar tamanhos de 1 a 200 nm, das em diversas formas como por exemplo esféricas e cilíndricas.

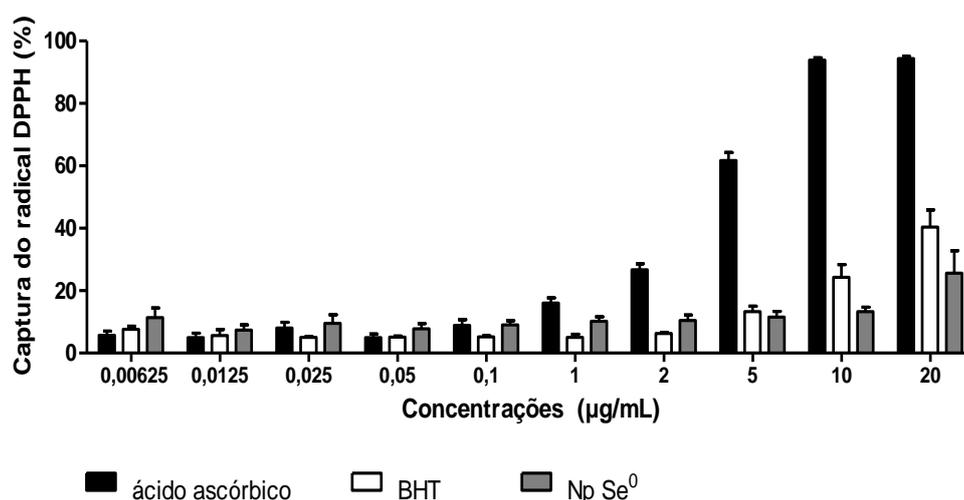
Contudo, o respectivo resultado obtido mostra ser coerente com os resultados apresentados na literatura, confirmando assim a formação das respectivas Np Se⁰.

5.2.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.2.3.1. CAPTURA DE RADICAL LIVRE (DPPH)

Foram realizados testes *in vitro* das Np Se⁰ com a finalidade de avaliar a atividade de captura do radical livre DPPH. Nesta metodologia, fez-se uso do ácido ascórbico e do diterc-butil-metilfenol ou hidroxitolueno butilado (BHT) como controles positivos. Os resultados encontram-se apresentados na Figura 8.

Figura 8- Percentual de captura do radical livre DPPH em diferentes concentrações (µg/mL) de ácido ascórbico, (BHT) e Np Se⁰. Os valores são expressos como média ± SEM.



Através da análise dos resultados apresentados na Figura 8 nota-se que as Np Se⁰ foram capazes de capturar aproximadamente $9,2 \pm 0,6$ % do radical livre DPPH nas concentrações inferiores a 1 µg/mL. Nesta faixa de concentração as Np Se⁰ se assemelharam ao efeito descrito pelo ácido ascórbico e ao BHT nas mesmas concentrações. Em concentrações superiores, as Np Se⁰ foram capazes de capturar aproximadamente 14 ± 1 % do radical livre DPPH nas concentrações entre 0,1 e 1 µg/ml. Já o ácido ascórbico eliminou cerca de 10 ± 4 e 17 ± 3 %, nas concentrações de 0,1 e 1 µg/mL, respectivamente, sendo semelhante as Np Se⁰, nestas concentrações. A concentração que inibiu 50 % do radical livre DPPH pelo ácido

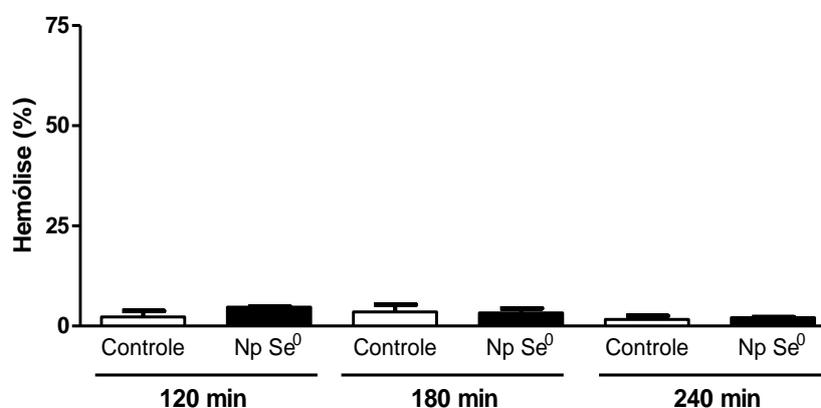
ascórbico foi de $6 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ e as Np Se^0 , nas concentrações estudadas, não atingiu tal patamar de captura.

De fato isso ocorre devido ao ácido ascórbico ser um poderoso antioxidante e, conseqüentemente, pela facilidade de oxidação do mesmo devido à presença do grupos fortemente redutores em sua estrutura. Segundo BOBBIO (1992) o ácido ascórbico apresenta a capacidade de capturar radicais livres na respectiva reação com maior facilidade por ser uma molécula instável e doadora de elétrons.

5.2.4. HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS

Foram realizados testes para se verificar se as Np Se^0 apresentariam alguma capacidade hemolítica em modelo experimental de eritrócitos. Os dados estão apresentados na Figura 9 e através da análise dos mesmos pôde-se verificar que as Np Se^0 não induziram hemólise ao longo do período experimental de 240 min. O controle foi realizado através da análise dos eritrócitos em meio de NaCl 0.9%. Logo, os dados indicam que as Np Se^0 não apresentaram hemólise para este modelo celular em concentrações até $5 \mu\text{g/mL}$.

Figura 9.- Hemólise de eritrócitos humanos incubados durante 120, 180 e 240 min, com $5 \mu\text{g/mL}$ de Np Se^0 . Os valores são expressos como média \pm SEM. $P < 0,05$ comparados ao grupo controle NaCl 0.9 %.

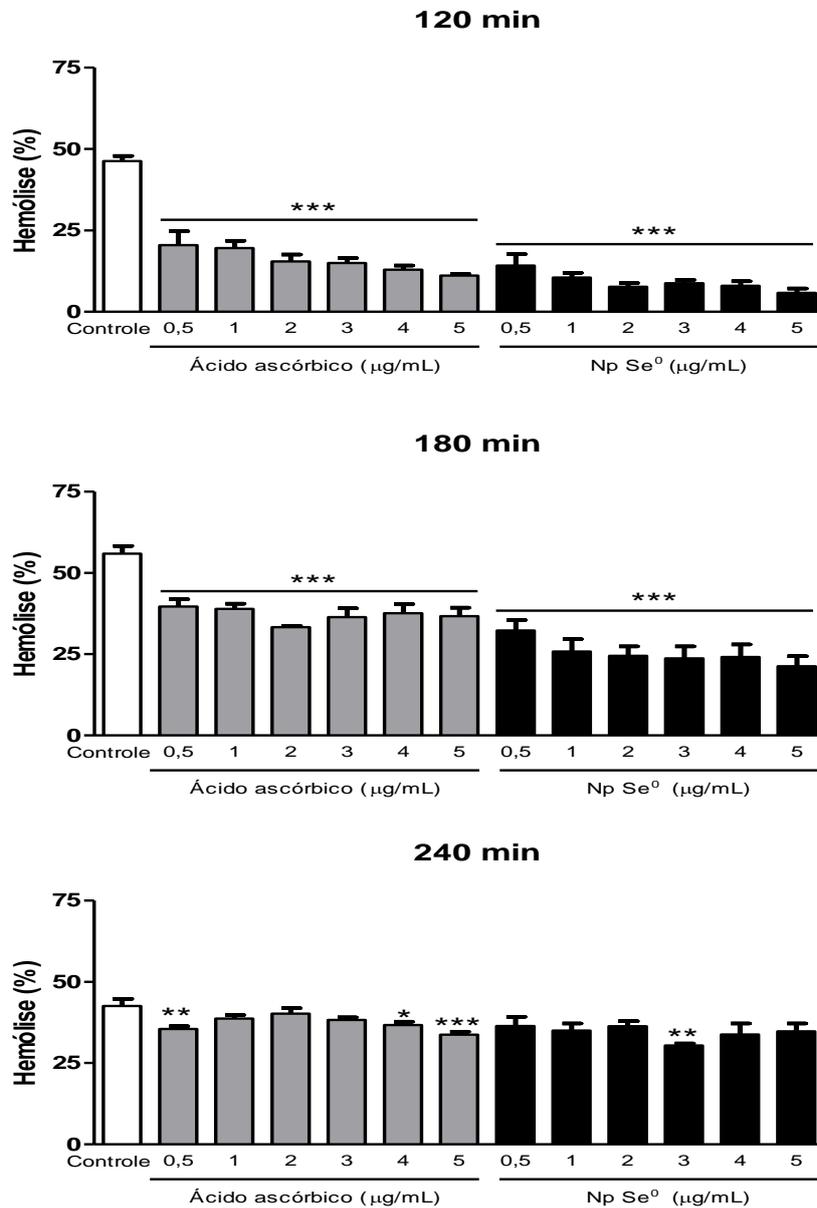


É importante ressaltar que os eritrócitos são células sanguíneas que contêm altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados, oxigênio molecular e íons ferrosos. Como consequência, são altamente vulneráveis à ação de agentes citotóxicos, oxidantes e de radicais livres e, portanto, muito suscetíveis a alterações na integridade estrutural como mudanças na fluidez da membrana e hemólise (SANTOS, 2009). Estas células são consideradas bons modelos para estudo de toxicidade devido a sua estabilidade e facilidade de trabalho, uma vez ocorrendo à hemólise há a liberação de hemoglobina a qual é facilmente quantificada por leitura espectrofotométrica de absorbância na região do visível, unidade esta proporcional à lise dos eritrócitos.

5.2.5 INIBIÇÃO DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS INDUZIDOS COM AAPH

A atividade das $Np Se^0$ quanto a inibição de hemólise de eritrócitos humanos induzidos por AAPH estão representados na Figura 9. Os resultados obtidos para as $Np Se^0$ foram comparados com os provenientes da utilização do ácido ascórbico em concentrações estipuladas (0,5-5 $\mu\text{g/mL}$) por até 240 min. Pôde-se verificar que até 180 min ocorreu a inibição da hemólise tanto para o ácido ascórbico quanto para as $Np Se^0$. Todavia, as $Np Se^0$ apresentaram no referido tempo um maior índice de proteção quando comparadas com o ácido ascórbico tanto no tempo de 120 quanto em 180 min. Já os dados tanto para as $Np Se^0$ quanto para o ácido ascórbico em 240 min não apresentaram diferença significativa quando comparados com o controle.

Figura 10- Inibição da hemólise de eritrócitos humanos induzida por AAPH, incubados durante 120, 180 e 240 min, com diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de ácido ascórbico e Np Se^0 . Os valores são expressos como média \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparados ao grupo Controle AAPH.

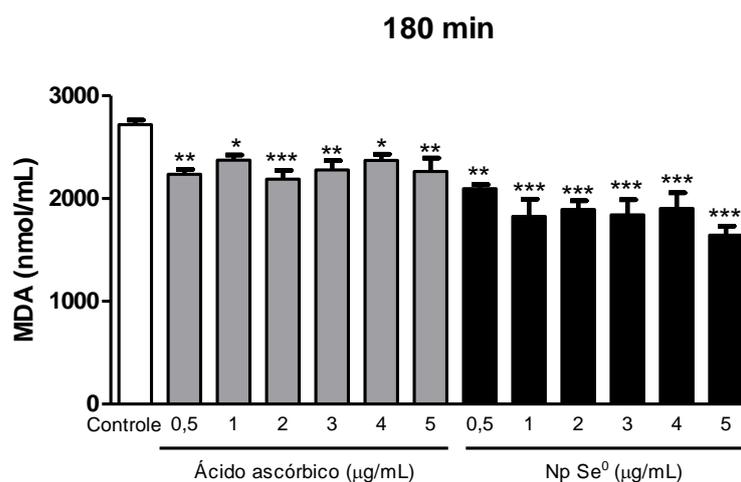


Com os dados inseridos na Figura 10 pôde-se então demonstraram que as Np Se^0 protegem significamente a membrana eritrocitária da hemólise induzida pelo (AAPH), de um modo independente da concentração da Np Se^0 e dependente do tempo de incubação.

5.3. INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A capacidade das Np Se⁰ em inibir a peroxidação lipídica de eritrócitos humanos induzidos por AAPH foi estudada através da dosagem de malondialdeído (MDA) via espectroscopia no tempo de 180 min (Figura 11). Através dos dados observados na Figura 8 pôde-se verificar que ambas, ácido ascórbico e as Np Se⁰ inibiram a peroxidação lipídica induzida por AAPH. Já a comparação entre ambos os agentes inibidores revelou que as Np Se⁰ apresentaram um maior grau de inibição sendo os valores de inibição iguais a 23 ± 2; 33 ± 6; 30 ± 3; 32 ± 5; 30 ± 6 e 40 ± 3 % nas concentrações de 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 µg/mL, respectivamente. Já o ácido ascórbico apresentou os graus de inibição como sendo 18 ± 2; 13 ± 2; 20 ± 3; 16 ± 3; 13 ± 2 e 17 ± 5 % nas mesmas concentrações. Cumpre salientar que na concentração de 5 µg/mL o percentual de inibição foi de 40 ± 3% enquanto em comparação com o mesmo dado para o ácido ascórbico, um reconhecido inibidor de peroxidação lipídica, apresentou 17 ± 5 % (Figura 10).

Figura 11. Conteúdo de MDA em eritrócitos incubados com diferentes concentrações (µg/mL) de ácido ascórbico e Np Se⁰ por 180 min. O grupo Controle foi incubado apenas com AAPH. Os valores são expressos como média ± SEM. * P < 0,05; ** P < 0,01; ***P < 0,001 comparados ao grupo Controle.

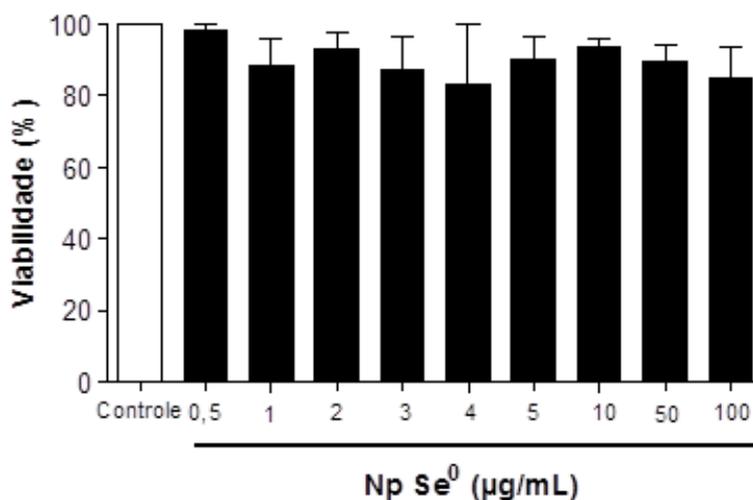


Os dados obtidos no presente estudo com Np Se⁰ se mostraram promissores.

5.3. ESTUDO *IN VIVO* DE TOXICIDADE VIA *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Observando que as Np Se⁰ apresentaram um potencial antioxidante fez necessário verificar a toxicidade das mesmas. Para tanto foi utilizado um modelo biológico denominado *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), modelo amplamente utilizado como pode-se verificar através de diversos trabalhos publicados na literatura atual[‡]. Neste estudo, diferentes concentrações (µg/mL) de Np Se⁰ foram introduzidas em ambientes contendo nematoides por um tempo de 24 horas e os resultados estão apresentados na Figura 12. Através da análise dos dados apresentados na Figura 10, em comparação com o controle negativo de toxicidade, as soluções das Np Se⁰ nas concentrações entre 0,5 µg/mL a 100 µg/mL, não apresentaram alteração percentual estática relevante da viabilidade dos nematoides evidenciando, assim, não foi evidente a toxicidade neste modelo de experimento biológico nas concentrações avaliadas.

Figura 32- Percentual de viabilidade de nematoides *C. elegans* tratados com diferentes concentrações (µg/mL) de Np Se⁰ por 24h. Os valores são expressos como média ± SEM.



[‡] Gráfico 1 descrito na página 26.

6. CONCLUSÃO

Do todo exposto e discutido no presente estudo pôde-se verificar que as Np Se⁰ foram sintetizadas e caracterizadas conforme descrito na literatura. Além disso, concernente à sua atividade antioxidante, as Np Se⁰ não apresentaram ação antioxidante considerável em concentrações maiores que 1 µg/mL quando comparadas com ácido ascórbico. Todavia, em concentrações menores que 1 µg/mL, as Np Se⁰ apresentaram atividades antioxidantes semelhantes aos obtidos com ácido ascórbico. Quanto a indução de hemólise, as Np Se⁰ atuaram na proteção das hemácias ou eritrócitos. Além disso, as Np Se⁰ apresentaram propriedades completamente dependente da concentração no que tange a proteção da lise das hemácias ou eritrócitos humanos, contra a ação peroxidativa de AAPH em um tempo de até 180 min com possível redução de até 40± 3% com 5 µg/mL bem como a identificação de sua não toxicidade através do estudo de viabilidade em nematoides *C. elegans*.

7. REFERÊNCIAS

ALISSA. E. M.; BAHJRI, S. M.; FERNS. G.A. The controversy surrounding selenium and cardiovascular disease: a review of the evidence. **Med Sci Monit.** p. 9-18. 2003.

BADR, Y. M . A.; MAHMOUND, J. Phys. **Chem. Solids**, p.68- 71, 2007.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. Nutrire: **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v.33, n.2, p.111-128, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismos. **Rev Quim Nova.** v.29, p. 113-123. 2006.

BENTON D, Cook R. The impact of selenium supplementation on mood. **Biol Psychiatry.** v.29. p.1092-1098. 1991

BOBBIO, P. A. BOBBIO, F.O. Química do processamento de alimentos. **Rev Quim Nova**, v. 34. n.151p. 1992.

BROWN. K. M.; ARTHUR. JR. Selenoproteins and human health: a review. **Public Health Nutr** ,p.593-599, 2001.

CAMPOS. J. F.; SANTOS. U. P.; ROCHA. P. S.; DAMIAO. M. J.; BALESTIERI. J. B. P.; CARDOSO. C. A. L.; PAREDES-GAMERO. E. J.; ESTEVINHO. L. M.; SOUZA. K. P.; SANTOS .E. L. **Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí).** Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015.

CARAPPELLA , S. C., Jr. Selenium, Van Nostrand Reinhold **Encyclopedia of Chemistry**, 4^o ed., New York, 1984.

CATANIA, A.S.; BARROS, C.R.; FERREIRA, S.R.G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.53, n.5, p.550-559, 2009.

DAVID, J. M.; BARREIROS, A. L. B.S.; DAVID, J.P Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração De Espécies Reativas E Defesa Do Organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p.113-123, 2006.

DENGG, M., MEEL, J. C. A., Caenorhabditis elegans as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. v. 50, 209 – 214.2004.

DONALD, D. L. C. *elegans* II. New York, NY: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1997.

ENGERS, V. K.; BEHLING, C. S.; FRIZZO, M. N. A INFLUÊNCIA DO ESTRESSE OXIDATIVO NO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO CELULAR **Revista Contexto & Saúde**, Ijuí , v. 10, n. 20, Jan./Jun. 2011.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo **Rev Ass Med Brasil**; v 43(1) p 61-8. 1997.

FLOHÉ L., ANDREESEN J.R., BRIGELIUS-FLOHÉ R., MAIORINO M., URSINI F. Selenium, the element of the moon, in life on earth. **IUBMB Life**, v 49 p 411-420, 2000.

FRE STONE, I.; MEEKS, N.; SAX, M.; HIGGITT,C. “The lycurgus cup-a roman nanotechnology”. **Gold Bulletin**, v 40(4) p 270, 2007.

GILLHAN, B. THOMAS J. H. **Biochemical basis of medicine**. Oxford: **Reed Educational and Professional Publishing**. 3 ed. P. 196-202. 1997

GOMES, M.M.; SAUNDERS C.; ACCIOLY E. Papel da vitamina A na prevenção do estresse oxidativo em recém-nascidos. **Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil**, v.5, n.3, p.275-282, 2005.

GONZAGA, I. B. MARTENS, A. COZZOLINO, S. M. F. Selênio. In: Cozzolino SMF Biodisponibilidade de Nutrientes. **Barueri:Manole**, ; p. 539-77. 2005.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in **Biology and Medicine**. **Oxford: Clarendon Press**, v. 543 p. 1989.

HAWKES W.C., HORNBOSTEL L. Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit. **Biol. Psychiatry**. V. 39, p. 121-128, 1996.

HYMER, C. B., CARUSO, J. A. Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry – **Review. Journal of Chromatography**, v. 1114, p. 1-20, 2006.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C-elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 34, p.387-398. 2006.

KREUTER, J. Nanoparticles—A historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**. v.331, p. 1-10, 2007.

LIA, H. Z.; TRUHLAR, D.G. Nanothermodynamics of metal nanoparticles. **Chem. Sci.**, v.5, p. 2605–2624. 2014

LITTLE, R. E.; GLADEN, B. C. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy. A review of the literature. **Reprod. Toxicol.** v.13, p. 347-352. 1999.

LIZ-MARZÁN, L.M. “Nanometals: Formation and color”. **Materials Today**, v.7. p. 26, 2004.

LUO ; WANG. F.; BAI, Y.; CHEN, T. ZHENG, W. Colloids and Surfaces B: **Biointerfaces**, v.94, p.304– 308. 2012.

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

MOTA, M.M.; DIOGO, A. **Caenorhabditis elegans: modelo biológico para o século XXI**. Laboratório de nematologia/ICAM. Deartamento de Biologia- Universidade de Évora.Chem. Rev. v.120, p. 246-251, 2001.

NAGARAJA, R. **Nanoparticles: Building Blocks for Nanotechnology**. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2008.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. The Lancet, **Quim. Nova** v. 356, p. 233-241. 2000.

RONSEIN, G.E.; MIYAMOTO S.; BECHARA, E.; MASCIO, P. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v.29, n.3, p.563-568, 2006

ROTRUCK J.T., POPE A.L., GANTHER H.E., SWANSON A.B., HAFEMAN D.G., HOESTRA W.G. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v.179, p. 558-560, 1973.

SANTOS, R; MENDES, L. ; SILVA, B.; GUEDES, P. ; VALENTAO, P., ANDRADE, P.; PEREIRA, J. C. M. Phytochemical profiles and inhibitory effect on free radical-induced human erythrocyte damage of *Dracaena draco*. A potential novel antioxidant agent. **Food Chemistry**, v 124, p. 927-934, 2011.

SAVARINO L., GRANCHI D., CIAPETTI G., CENNI E., RAVAGLIA G., FORTI P., MAIOLI F., MATTIOLI R. **Serum concentrations of zinc and selenium in elderly people: results in healthy nonagenarians/centenarians**. *Experim. Gerontol.* v 36, p. 327-339, 2001.

SCHNEIDER, C.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercícios: mecanismo de formação de treinamento físico. **Rev. Bras Med Esporte**, n. 10, p. 87-90. 2004.

SCHOUEST, K. et al. Toxicological assessment of chemicals using *Caenorhabditis elegans* and optical oxygen respirometry. **Environ Toxicol Chem**, v. 28, n. 4, p. 791-799, 2009.

SCHMID, 1992). SCHMID, G. "Large clusters and colloids: metals in the embryonic state". **Chem. Rev.**, v 92, p. 1709, 1992.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW. K. D. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. **Biomed Pharmacoloth**, v. 57, p. 134-144. 2003.

URSINI F., BINDOLI A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. **Chem. Phys. Lip**. v.44, p.255-276, 1987.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, v.12, n.10, p.1161-1208, 2005.

VASCONSELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.L.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VIARO, R. S., VIARO, M. S., FLECK, J. Importância bioquímica do selênio para o organismo humano, **Ciê. Biol. e da Saúde**, v. 2, p. 17-21, 2001.

WACHOWICZ, B. ZBIKOWSKA, H.A. & NOWAK, P. Selenium compounds in the environment: their effect on human health. **Cellular and Molecular Biology Letters**, n. 6, p. 375-381. 2001.

WANG, Y., FU, L. Forms of Selenium Affect its Transport, Uptake and Glutathione Peroxidase Activity in the Caco-2 Cell Model, **Biol Trace Elem Res**, 2012.

Wen, H., Fu-Lan, H., Jui-Tung, Vivian H. L. The ameliorative and toxic effects of selenite on *Caenorhabditis elegans*. **Food and Chemical Toxicology**, n. 49, p. 812–819, 2011.

WOLLENHAUPT SG et al. Seleno- and telluro-xylofuranosides attenuate Mn-induced toxicity in *C. elegans* via the DAF-16/FOXO pathway. **Food Chem Toxicol**, v. 64, p.192-9, 2014.

8. MEMORIAL DAS ATIVIDADES

8.1 CRÉDITOS EXIGIDOS PELO PROGRAMA

Total de créditos exigidos pelo programa: 24

- ✓ Disciplinas obrigatórias: 4
- ✓ Disciplinas optativas: 15
- ✓ Seminários: 4
- ✓ Estágio Docência: 2
- ✓ Dissertação: 4

8.2 CRÉDITOS CUMPRIDOS

Disciplinas Cursadas	Créditos	Conceitos
Obrigatórias		
Inovação Biotecnológica	02	A
Meio Ambiente e Tecnologia	02	B
Seminário I	02	A
Seminário II	02	A
Estágio Docência I	02	A
Estágio Docência II	02	A
Optativas		
Biologia Molecular Aplicada a Biodiversidade e Monitoramento Ambiental	03	A
Fundamentos de Química Verde	04	A
Processamento de Alimentos Naturais do Cerrado.	04	A
Aplicação Ambiental e Industrial de Enzimas Microbianas	04	A
Total de Créditos Cursados	27	
Dissertação	04	-