



UFSM

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

**DIETIL-2-FENIL-2-TELUROFENIL VINILFOSFONATO: UM
COMPOSTO ORGÂNICO DE TELÚRIO COM ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E COM BAIXA TOXICIDADE *IN VIVO* EM
CAMUNDONGOS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daiana Silva de Ávila

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**DIETIL-2-FENIL-2-TELUROFENIL VINILFOSFONATO: UM
COMPOSTO ORGÂNICO DE TELÚRIO COM ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E COM BAIXA TOXICIDADE *IN VIVO*
EM CAMUNDONGOS**

por

Daiana Silva de Ávila

Dissertação apresentada ao Curso de pós - graduação em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**.

Santa Maria, RS, Brasil

2007

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

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

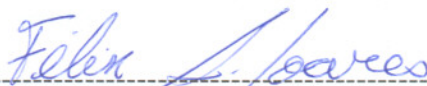
**DIETIL-2-FENIL-2-TELUROFENIL VINILFOSFONATO: UM COMPOSTO
ORGÂNICO DE TELÚRIO COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E
COM BAIXA TOXICIDADE *IN VIVO* EM CAMUNDONGOS**

elaborada por

DAIANA SILVA DE ÁVILA

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

COMISSÃO EXAMINADORA



* **Félix Alexandre Antunes Soares**
(Presidente/Orientador)
UFSM



Marcelo Farina
(UFSC)



Franciele Weber Santos
(UNIPAMPA)

Santa Maria, 14 de Fevereiro de 2007.

Agradecimentos

Em primeiro lugar a Deus, por sempre ter iluminado o caminho que eu escolhi seguir. Aos meus pais, Osmar e Djanira e meu irmão Tiago, pelo apoio carinhoso, pela torcida incondicional, pelas velas acesas, pelos pensamentos otimistas, enfim, por este momento.

Ao Maicon, amigo, companheiro, otimista, meu amor. Obrigada por agüentar a distância e por estar ao meu lado nos momentos bons e nem tão bons assim.

Agradeço ao pessoal do laboratório do Prof. João, que por tanto tempo conviveram comigo. Amigos muito queridos que vou levar pro resto da minha vida, bem como os vários momentos divertidos e estressantes que passamos juntos. Agradecimento especial às meninas Rose, Carol, Rominha, Vê, Danúbia, Alessandra, Jéssie, Zanza e aos meninos Robson, Daniel, Rafael, Jardel, Thiago, Matheus. Obrigada pela paciência!!

Ao pessoal dos laboratórios da Prof^a. Cristina e do Prof. Gilson pelos momentos muito divertidos e alegres no corredor, em meio a comes e bebes, e pela parceria em diversos momentos. Em especial ao “Schumacher”, o homem que sintetiza o composto estudado nesta dissertação.

Ao pessoal do laboratório do Prof. Félix, em especial à Cris, amiga, sempre dando um apoio incondicional e necessário, e às minhas “filhas”, Priscila, Aline e Dirleise, um agradecimento muito especial às três gurias pela competência, respeito, amizade e companheirismo. Também ao Gustavo, ao Rogério e à gurizada nova, que estão conosco na empreitada do novo laboratório.

Agradeço às “micas” Ana, Rita e Liz por compartilharem comigo tantos momentos bons, inúmeros, torcendo por mim, comemorando pequenas e grandes

vitórias, trocando experiências, fazendo festas, enfim, amigas para a vida inteira. Também aos meus amigos de Pelotas, inesquecíveis, também sempre muito próximos, apesar da distância, torcendo por mim, obrigada a todos!

Ao pessoal que me acompanhou no início desta jornada, os professores Carlos e Maribel e seus alunos, que foram de extrema importância para esta minha caminhada. Em especial à Fabi, Juliana, Ana Paula, Viviane, Jorgete e Marinei.

Aos funcionários Angélica e Rinaldo, afinal sem eles o trabalho seria quase impossível! Obrigada pela dedicação!

Ao CNPq, pela bolsa concedida, que me possibilitou o trabalho em tempo integral no laboratório durante este período.

Ao PPGBTOX, aos professores deste curso, pela dedicação e trabalho, fazendo com que o curso esteja sempre crescendo.

Por fim, o agradecimento mais especial aos professores Cristina e Gilson, pelo carinho e constante dedicação a todos, ao professor João Batista, meu pai científico, ensinou-me o que é realmente trabalhar em pesquisa por sua extrema dedicação, sinceridade, sua inteligência, seu caráter, sua amizade; e ao professor Félix, por ter me aceito como primeira orientada, pela paciência, pela atenção ao meu trabalho, pelas críticas e pelo trabalho honesto.

Resumo

Dissertação de mestrado
Programa de pós-graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

DIETIL-2-FENIL-2-TELUROFENIL VINILFOSFONATO: UM COMPOSTO ORGÂNICO DE TELÚRIO COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E COM BAIXA TOXICIDADE *IN VIVO* EM CAMUNDONGOS.

AUTORA: DAIANA SILVA DE ÁVILA
ORIENTADOR: FÉLIX ALEXANDRE ANTUNES SOARES
CO-ORIENTADOR: JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA
Local e data da defesa: Santa Maria, 14 de fevereiro de 2007.

Apesar do crescente uso dos compostos orgânicos de telúrio na química e na bioquímica, não há um grande conhecimento sobre sua toxicidade até agora. O Dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato é um β -organocalcogenil vinilfosfonato, uma útil ferramenta na síntese orgânica, mas nenhum estudo toxicológico e farmacológico estão ainda descritos na literatura. Neste estudo, nós investigamos, *in vitro*, a possível atividade antioxidante e as propriedades tóxicas deste composto, e avaliamos os prováveis efeitos tóxicos através de parâmetros bioquímicos, *ex vivo*, após administração pelas vias subcutânea ou intraperitoneal. Como outros compostos orgânicos de telúrio, o dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato também foi capaz de oxidar grupamentos -SH do DTT, bem como de inibir a atividade da δ -ALA-D de fígado, cérebro e rim, *in vitro*, entretanto, em relativamente baixas concentrações. A atividade antioxidante foi também observada em cérebro, fígado e rim, em concentrações muito baixas, e sua habilidade de reduzir a peroxidação lipídica induzida por Fe^{+2} foi comparável ao do composto orgânico de telúrio com atividade antioxidante bem conhecida, o ditelureto de difenila. *In vivo*, o dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato foi muito pouco tóxico a camundongos que receberam doze injeções diárias pelas vias subcutânea e intraperitoneal, diferente dos animais que receberam ditelureto de difenila s.c., que morreram após o quarto dia de tratamento. *Ex vivo*, a atividade da δ -ALA-D no fígado, rim e cérebro não foi afetada pelos tratamentos com dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato. O peso corporal dos camundongos tratados não mudou, contudo, o peso do fígado aumentou nos animais que receberam as doses maiores pela via i.p., provavelmente devido à metabolização. De fato, nenhum dano ao tecido hepático foi detectado, visto que as atividades plasmáticas da AST e da ALT não foram alteradas. Os parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo que foram avaliados, não foram alterados em rim e fígado, porém, em cérebro a atividade da SOD aumentou significativamente, enquanto a atividade da catalase aumentou nas doses intermediárias, indicando que este tecido estaria sofrendo alguma alteração devido à administração deste composto de telúrio orgânico. Juntos, estes dados sugerem que

este composto é promissor para maiores estudos farmacológicos, uma vez que não possui efeitos tóxicos pronunciados e possui uma atividade antioxidante considerável.

Palavras-chave: dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato, toxicidade, atividade antioxidante, camundongos, vias de administração.

Abstract

Dissertation of Marter's degree
Post-graduate Course of Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria

DIETHYL-2-PHENYL-2-TELLUROPHENYL VINYLPHOSPHONATE: AN ORGANOTELLURIUM COMPOUND WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY *IN VITRO* AND WITH LOW TOXICITY *IN VIVO* IM MICE

AUTHOR: DAIANA SILVA DE AVILA

ADVISOR: FELIX ALEXANDRE ANTUNES SOARES

CO-ADVISOR: JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA

Date and place of the defense: Santa Maria, February 14, 2007

Despite the growing use of organotellurium compounds in chemical and biochemical fields, there is no great concern about their toxicity until now. Diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate is a β -organochalcogenyl vinylphosphonate that is a useful tool for organic synthesis, but no toxicological and pharmacological studies about it are described in the literature. In this study, we investigated, *in vitro*, the possible antioxidant activity and toxic properties of this compound, and evaluated its putative toxicological effects through biochemical parameters, *ex vivo*, after subchronic administration by the subcutaneous and intraperitoneal vias. As other organotellurium compounds, the diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate also was able to oxidize -SH groups from DTT, as well as to inhibit hepatic, renal and cerebral δ -ALA-D *in vitro*, however, at relatively high concentrations. The antioxidant activity was also observed in brain, liver and kidney, at very low concentrations, and its ability to reduce the lipid peroxidation- induced by Fe^{+2} was comparable to the antioxidant organotellurium compound diphenyl ditelluride. *In vivo*, diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate was very low toxic to mice that received twelve daily injections through subcutaneous and intraperitoneal via, different from the animals that received diphenyl ditelluride s.c, which died after the fourth day of treatment. *Ex vivo*, the δ -ALA-D activity in liver, kidney and brain were not affected by these treatments with diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate, In addition, the i.p. treatment did not affect the survival of the treated mice. The body weight of treated mice did not change; however, the liver weight was increased in the animals that received the major doses, probably due to the increase in the metabolism; in fact, no tissue damage was detected, since plasmatic activities of AST and ALT were not altered. The biochemical parameters of oxidative stress that were evaluated, TBARS formation, Vitamin E levels, GSH/GSSG ratio, SOD and catalase activities, were not changed in liver and kidney, nevertheless, in brain, SOD activity significantly increase, whereas catalase activity tended to increase, at the intermediary doses, indicating that this tissue would be suffering some alteration due to the administration of the organotellurium compound. Taken together, these data

suggest that this organotellurium compound is promising for further pharmacological studies, once that it does not has pronounced toxic effects, but has antioxidant properties.

Key Words: diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate, toxicity, antioxidant activity, mice, administration vias.

LISTA DE FIGURAS:

I. Introdução:

FIGURA 1: Mecanismo catalítico da atividade glutathiona-peroxidase mimética de compostos diarílicos e dialquílicos de telúrio.	4
FIGURA 2: Cascata de reações de peroxidação lipídica	5
FIGURA 3: Mecanismo catalítico proposto para a atividade neutralizadora de peroxinitrito dos compostos orgânicos de telúrio	7
FIGURA 4: Estrutura química do ditelureto de difenila	9
FIGURA 5: Estrutura química do dietil - 2-fenil - 2- telurofenil vivifosfonato	12

III. Artigos Científicos: Artigo 1

FIGURE 1: Structure of diethyl – 2 – phenyl - 2- terullophenyl vinylphosphonate	20
FIGURE 2: DTT oxidation by diethyl - 2- phenyl -2- terullophenyl vinylphosphonate in the absence (A) or in the presence (B) of rat liver supernatant	21
FIGURE 3: In vitro effect of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate on rat δ -ALA-D and DTT reversion in liver (A), kidney (B) and brain (C)	21
FIGURE 4: Ex vivo mice δ -ALA-D activity in liver (A), kidney (B) and brain (C)	23

III. Artigos Científicos: Artigo 2

FIGURE 1: Chemical structure of diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate	52
---	----

- FIGURE 2: Effect of diethyl – 2 – phenyl -2 - tellurophenyl vinylphosphonate on thiobarbituric acid reactive substances formation of mice treated i.p. for 12 in liver (A), kidney (B) and brain (C) 54
- FIGURE 3: δ - ALA-D activity in liver (A), kidney (B) and brain (C) of mice treated with diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate, in the absence (O) or presence (●) of DTT 57
- FIGURE 4: Vitamin C levels determination of animals treated for 12 days with diethyl – 2 – phenyl – 2 - tellurophenyl vinylphosphonate in liver (A), kidney (B) and brain (C) 60
- FIGURE 5: GSH/GSSG ratio in liver (A), kidney (B) and brain (C) of mice treated with diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate 63
- FIGURE 6: SOD activity of mice treated i.p. with diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate for 12 days in liver (A), kidney (B) and brain (C) 66
- FIGURE 7: Effects of treatment with diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl Vinylphosphonate on catalase activity in liver (A), kidney(B) and brain (C) 69

LISTA DE TABELAS

III. Artigos Científicos: Artigo 1

TABLE 1: Effect of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate and diphenyl ditelluride in spontaneous TBARS production in rat brain, liver and kidney	22
TABLE 2: Effect of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate and diphenyl ditelluride in Fe(II)-induced TBARS production in rat brain, liver and kidney	22
TABLE 3: Body and organ weights of mice treated with diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate	22

III. Artigos Científicos: Artigo 2

TABLE 1: Organ weight/body weight ratio (g/g) of animals treated for twelve days with diethyl – 2 – phenyl – 2 - tellurophenyl vinylphosphonate	50
TABLE 2: Effects of diethyl – 2 – phenyl – 2 - tellurophenyl vinylphosphonate on AST and ALT plasmatic activities	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT: alanina aminotransferase
AS-101: telurato de tricloro amônio-dioxoetileno-O,O
AST: aspartato aminotransferase
DTT: ditioneitol
ER: espécie reativa
FAD: flavina adenina dinucleotídeo
GPX: glutaciona peroxidase
GSH: glutaciona reduzida
GSSG: glutaciona oxidada
i.p.: intraperitoneal
IC₅₀: concentração inibitória 50%
IL: interleucina
LDH: lactato desidrogenase
LP: lipoperoxidação
MDA: malondialdeído
Na⁺/K⁺ ATPase: sódio/potássio ATPase
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NMDA: N-metil-D-aspartato
OH[·]: radical hidroxil
ONOO[·]: peroxinitrito
R[·]: radical de fosfolípídeo
RH: ácido graxo insaturado
RL: radical livre
RO[·]: radical alcóxil
ROO[·]: radical peróxil

ROOH: hidroperóxido lipídico

s.c.: subcutâneo

-SH: grupamento tiólico

SOD: superóxido dismutase

S-S: dissulfeto

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF- α : fator de necrose tumoral

TRXr: tioredoxina redutase

TRX-SH: tioredoxina reduzida

δ -ALA-D: delta- aminolevulinato desidratase

III.1.5. Discussion	23
III.1.6. References	24
III.2. Artigo 2: UM ESTUDO BIOQUÍMICO E TOXICÓLOGICO COM O DIETIL-2-FENIL-2-TELUROFENIL VINILFOSFONATO NUM TRATAMENTO INTRAPERITONEAL SUBCRÔNICO EM CAMUNDONGOS.	26
III.1.1. Abstract:	28
III.1.2. Introduction	29
III.1.3. Materials and Methods	32
III.1.4. Results	35
III.1.5. Discussion	37
III.1.6. References	42
IV.DISSCUSSÃO	73
V. CONCLUSÕES	78
VI.PERSPECTIVAS	80
VII.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

APRESENTAÇÃO

No item I, INTRODUÇÃO, está descrita uma sucinta revisão bibliográfica sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

Os OBJETIVOS, geral e específicos, estão organizados no item II.

Os RESULTADOS estão dispostos na forma de artigos, um já publicado e outro submetido à publicação, organizados no item III. Os artigos científicos estão descritos na íntegra, contendo introdução, materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas, e representam a totalidade deste estudo.

No item IV, DISCUSSÃO, estão apresentados as interpretações e comentários gerais sobre os dois artigos científicos aqui apresentados. Também estão dispostos alguns pontos de vista da autora em relação aos resultados obtidos.

No item V, CONCLUSÕES, são apresentados as conclusões gerais do presente trabalho.

No item VI, PERSPECTIVAS, estão descritas alguns possíveis estudos para continuação deste trabalho.

O item VII, REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, refere-se somente às citações que aparecem nos itens I e III Introdução e Discussão.

I. Introdução

I.1. Telúrio

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

O Te^0 é utilizado no manufaturamento de semicondutores e outros componentes eletrônicos. Ele também é utilizado na produção industrial de vidro e aço, e como um aditivo anti-detonante da gasolina (Fairhill, 1969). Além disso, é empregado no processo de síntese de alguns fármacos e explosivos, na vulcanização da borracha, em lubrificantes sólidos e na petroquímica (Taylor, 1996).

O advento do uso industrial do Te^0 trouxe riscos ocupacionais e ambientais para a saúde humana, crescendo a preocupação em relação aos potenciais efeitos adversos que este elemento pode causar. Os primeiros relatos a respeito da toxicidade do telúrio aconteceram após o incidente de Windscale (UK) (Stewart & Crooks, 1958). Os sintomas mais comuns são dores de cabeça, náuseas, sonolência, alteração da frequência cardíaca e odor de alho na respiração e urina (Muller e cols, 1989; Taylor e cols, 1996).

Apesar da toxicidade do elemento telúrio, ele foi amplamente utilizado terapeuticamente em drogas que atuam no sistema imune, no tratamento da sífilis e da tuberculose (Hansen, 1853), sendo posteriormente substituídos por fármacos mais eficientes.

Em 1967, Shoeder e cols determinaram, utilizando espectrometria de absorção atômica, que os organismos humanos possuíam aproximadamente 600mg de telúrio, uma quantidade relativamente grande em comparação com outros elementos

- traço como o ferro e o zinco. Apesar desta grande quantidade, nenhuma função fisiológica foi ainda atribuída ao telúrio.

I.1.1. Compostos de telúrio

Compostos inorgânicos de telúrio são encontrados na forma inorgânica de sais. Alguns demonstraram alguma atividade farmacológica, sendo utilizados por certo tempo. Em 1899 o Manual da Merck indicava o telurato de potássio como antihidrotico. Além disso, o telurato de sódio era usado como antiséptico, antipirético e no tratamento de úlcera gástrica, de reumatismos e da febre tifóide. Até 1996, o telurato de potássio ainda estava listado como antihidrotico (Merck Manual, 1996).

Compostos de telúrio inorgânico são compostos altamente tóxicos, podem afetar a pele e outros órgãos, entre os quais os rins (Taylor, 1996). Também são potentes agentes neurotóxicos e, por serem permeáveis à barreira placentária, teratogênicos em ratos (Agnew & Curry, 1972). Causam hidrocefalia, hipomielinização ou desmielinização (D'gregório & Miler, 1988; Taylor, 1996; Toews e cols., 1991).

O primeiro composto orgânico de telúrio foi sintetizado por Friedrich Wöhler em 1840. Desde sua descoberta até metade do século 20, a química dos compostos orgânicos de telúrio permaneceu obscura e, devido ao pouco interesse dos pesquisadores, às difíceis condições de síntese destes compostos e, especialmente, pelo mau odor que estes exalavam, poucas são as publicações durante este período. Apenas a partir de 1970 os compostos orgânicos de telúrio começaram a serem explorados pelos químicos orgânicos, refletindo no crescimento exponencial de artigos publicados desde então (Klaman, 1990). Vários destes compostos, com diferentes características e estruturas químicas, vêm sendo estudados quanto às suas propriedades fármaco e toxicológicas, sendo alguns deles já reportados na literatura.

I.1.1.1. Farmacologia dos compostos orgânicos de telúrio

Em 1987, Sredni e cols descreveram pela primeira vez uma atividade farmacológica para um composto orgânico de telúrio, ao demonstrarem as propriedades imunomoduladoras do composto codificado como AS-101 (telurato de tricloro amônio-dioxoetileno-O,O') em camundongos, mediando efeitos antitumorais. Além disso, o AS-101 é capaz de estimular células linfóides a produzir citocinas como IL-1, IL-2, TNF- α (Kozenitzky e cols, 1992), podendo também restaurar a atividade de linfócitos T helper (Kalechman e cols, 1993).

A propriedade quimioprotetora dos compostos orgânicos de telúrio, proveniente de seus efeitos citotóxicos, começou a ser explorada por diversos grupos de pesquisa. Apesar da habilidade dos compostos de induzirem apoptose e alterações de outras naturezas a fim de causarem morte celular, um novo alvo para a pesquisa anticâncer vem surgindo, a enzima tiorredoxina redutase (TRXr). Esta enzima, responsável por fornecer equivalentes redutores (tiorredoxina - TRX-SH) às redutases de ribonucleotídeos, têm sua expressão gênica aumentada nas células tumorais, auxiliando no crescimento celular (Grogan e cols, 2000). Engman e cols (2000a) sintetizaram uma série de compostos análogos do telureto de difenila e observaram que alguns eram bons inibidores da tiorredoxina redutase e inibidores do crescimento de células cancerosas. Compostos orgânicos de telúrio na forma de sais, solúveis em água, também foram avaliados, e mostraram-se os melhores inibidores da TRXr já testados. Apesar da hidrofobicidade dos compostos ter restringido a captação celular, foram bastante eficientes contra culturas de câncer de cólon (Engman e cols, 2000b).

Os teluritos orgânicos também vêm sendo estudados quanto às suas possíveis propriedades antitumorais, sendo o alvo a enzima Catepsina B. Esta enzima é uma protease que auxilia na invasão do tumor, por degradar componentes celulares (Buck e cols, 1992). Ela possui no seu sítio ativo um resíduo tiólico, cuja oxidação pelos teluritos leva à inativação da enzima, sugerindo uma provável ação anti-metastática destes compostos (Cunha e cols, 2005)

Além destas importantes propriedades, alguns compostos orgânicos de telúrio possuem uma outra característica: são capazes de mimetizar a atividade da glutationa-peroxidase (GPX) que, à custa de GSH, neutraliza o peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Engman e cols (1992) demonstraram, utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear, que vários diaril diteluretos possuem atividade tiol peroxidase, propondo o mecanismo da reação para estes compostos. Posteriormente, Andersson e cols (1993) reportaram a atividade mimética da GPX de diaril teluretos, substituídos com moléculas doadoras de elétrons. Além disso, estes autores apontaram que o efeito antioxidante destes compostos se devia à formação de teluróxido, resultante da oxidação do Te^{+2} à Te^{+4} , que seria novamente reduzido ao estado inicial pela GSH, num mecanismo catalítico, neutralizando radicais livres e as espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (Figura 2) (Engman e cols, 1994; Andersson e cols, 1994).

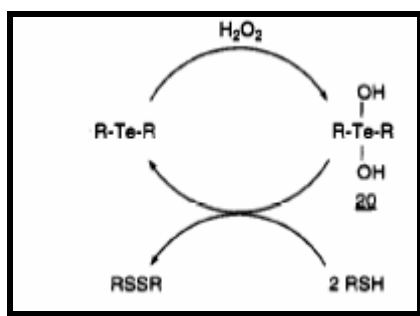


Figura 1: Mecanismo catalítico da atividade glutatona-peroxidase mimética de compostos diarílicos e dialquílicos de telúrio (Andersson e cols, 1994).

Os radicais livres (RL) são moléculas que possuem um elétron desemparelhado, tornando-se espécies eletrofílicas altamente reativas, que podem reagir com componentes celulares importantes, como proteínas, DNA e lipídeos (Josephy, 1997; Timbrell, 2000)

Os ácidos graxos poliinsaturados de fosfolipídeos em membranas biológicas são particularmente suscetíveis ao dano oxidativo causado pelas ER, num processo chamado de peroxidação lipídica (LP). A LP ocorre em três estágios: iniciação, propagação e terminação. No primeiro estágio, o RL inicia as reações em cadeia de LP. Já na fase de propagação, ele captura um elétron para se estabilizar, desencadeando

uma série de reações que culminam na formação de mais RL. Este processo pode ser interrompido por antioxidantes (Freeman e Crapo, 1982) ou quando duas espécies reativas se ligam, estabilizando-se.

A LP é iniciada pelo ataque de uma espécie reativa (ER) retira um átomo de hidrogênio (H) de um ácido graxo insaturado (RH), resultando na formação de um radical de fosfolípido (R \cdot) (Slater, 1984; Janero, 1990; Halliwell, 1992; Holley e Cheeseman, 1993). Após, ocorre a adição de oxigênio ao radical formado, originando um radical peróxil (ROO \cdot), que por sua vez pode retirar um átomo de H de outra molécula vizinha, formando um hidroperóxido lipídico (ROOH) e outro radical (R' \cdot), o qual pode desencadear nova seqüência de reações, levando à danos maiores (Slater, 1984; Halliwell, 1992) (Figura 1).

O hidroperóxido formado pode ser quebrado e formar outros produtos como alcanos, aldeídos e malondialdeído (MDA), que são marcadores químicos da LP. Estudos que visam investigar o envolvimento da peroxidação lipídica podem ser feitos utilizando uma técnica de determinação indireta das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, na qual um dos produtos finais da LP, o MDA, reage com o ácido tiobarbitúrico, originando um produto de cor rosa que pode ser quantificado espectrofotometricamente (Ohkawa, 1979). Esta técnica é pouco específica, visto que outros produtos que não os da oxidação lipídica podem também reagir com o TBA e serem equivocadamente quantificados como MDA (Kosugi e Kikugawa, 1986).

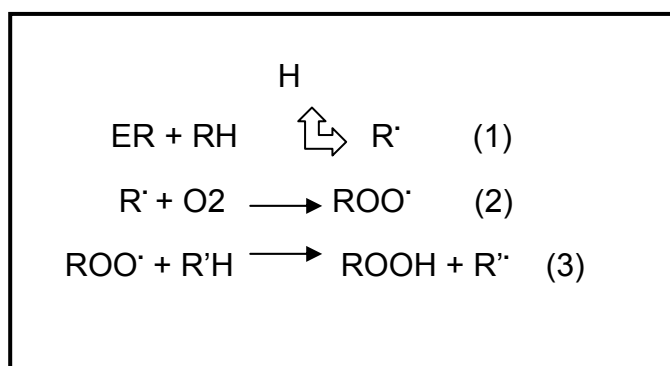


Figura 2: Reações da cascata de peroxidação lipídica (Halliwell, 1992).

Na segunda fase da LP, os ROOH primários são convertidos em produtos mais estáveis, porém esta quebra gera radicais alcóxil ($RO\cdot$), especialmente na presença de metais de transição como o Fe^{2+} , favorecendo o processo de propagação. Os radicais alcóxil são análogos altamente reativos do radical hidroxil ($OH\cdot$), uma potente espécie reativa de oxigênio (Graff e cols, 1984; Janero, 1990; Namiki, 1990; Halliwell, 1992).

Pela alta reatividade dos radicais hidroxil e alcóxil, vários compostos orgânicos de telúrio vêm sendo utilizados como seus neutralizadores. Em 2001, Kanski e cols demonstraram a capacidade de um telureto hidrossolúvel em diminuir a fluorescência emitida pelo ácido tereftálico em presença de $OH\cdot$ em baixas concentrações. Ren e cols (2001) também demonstraram atividade antioxidante contra o $OH\cdot$ para um dicitodextrinil ditelureto com atividade mimética da GPX.

Briviba e cols (1998) avaliaram alguns compostos orgânicos de telúrio num modelo de dano oxidativo por espécies reativas de nitrogênio, mais especificamente o peroxinitrito ($ONOO\cdot$). Os autores demonstraram a capacidade dos compostos de neutralizarem o ($ONOO\cdot$) e inibirem a sua capacidade de nitrosilar proteínas, também pela formação de teluróxido (Figura 3). Outros autores demonstraram o potencial antioxidante de diversos compostos orgânicos de telúrio em vários sistemas *in vitro*, bem como *ex vivo*, utilizando diferentes técnicas e obtendo resultados em baixas concentrações (Kanski e cols, 2001; Engman e cols, 1995; Wieslander e cols, 1998; Tiano e cols, 2000; Jacob e cols, 2000; Savegnago e cols, 2006, Ren e cols, 2001).

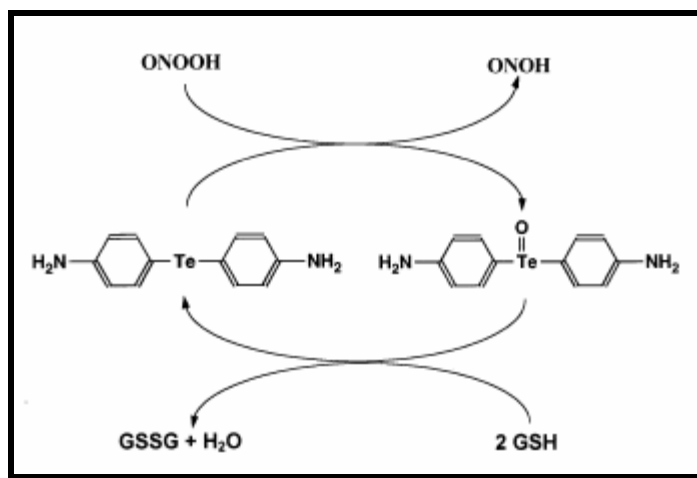


Figura 3: Mecanismo catalítico proposto para a atividade neutralizadora de peroxinitrito dos compostos orgânicos de telúrio (Briviba e cols, 1998).

Esta atividade antioxidante dos compostos de telúrio orgânico é muito interessante, especialmente porque quando comparados com análogos contendo selênio, seus efeitos são muito mais pronunciados. Além disso, cada vez mais se comprova a forte relação entre a formação de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e diversas doenças, tornando-se importante a pesquisa de novos e potentes agentes antioxidantes.

I.1.1.2. Toxicologia dos compostos orgânicos de telúrio

Assim como o telúrio elementar e os sais inorgânicos, os compostos orgânicos de telúrio são bastante tóxicos, e a intensidade desta toxicidade depende da estrutura do composto, da dose administrada e do tipo de animal testado (Nogueira e cols, 2004).

A toxicidade destes compostos deve-se principalmente pela interação com resíduos tiólicos (-SH) de moléculas biologicamente ativas. Os compostos orgânicos de telúrio têm a capacidade de oxidar estes grupamentos -SH, inativando uma enzima e/ou diminuindo a concentração de moléculas sulfidrílicas não-protéicas (Blais e cols, 1972; Deuticke e cols, 1992).

A oxidação da glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG) pode ser um dos principais fatores da toxicidade causada pelos compostos orgânicos de telúrio (Barbosa e cols, 1998). A glutathiona é uma importante biomolécula necessária ao sistema antioxidante da glutathiona peroxidase. Esta enzima requer GSH para neutralizar o peróxido de hidrogênio em água, gerando GSSG, que retorna a GSH pela ação da glutathiona redutase, às custas do equivalente redutor nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Outras biomoléculas sulfidrílicas como a cisteína, a coenzima A e o ácido diidrolipóico também podem ser alvos dos compostos orgânicos de telúrio, porém não há relatos na literatura sobre estas possibilidades.

A enzima sulfidrílica δ -ALA-D, que catalisa condensação assimétrica de duas moléculas de ácido aminolevulínico em porfobilinogênio, é um dos alvos dos compostos orgânicos de telúrio mais estudado. Esta enzima possui no seu sítio ativo dois resíduos cisteinil, que são facilmente oxidados *in vitro* e *in vivo* por compostos de telúrio orgânicos, levando a sua inibição (Maciel e cols, 2000, Meotti e cols, 2001; Nogueira e cols, 2003). Esta inativação impede a continuação da cascata de síntese de grupamentos heme, importantes na síntese de hemoglobina, citocromos e da enzima catalase. Além disso, esta inibição leva ao acúmulo do substrato da δ -ALA-D, o ácido aminolevulínico, que tem ação pró-oxidante (Bechara e cols, 1993; Emanuelli e cols, 2001). O mecanismo de inibição pela oxidação dos dois grupamentos -SH desta enzima é evidenciado pela reativação da sua atividade pela adição no meio reacional de ditioneitol (DTT), um composto dissulfidrílico capaz de doar seus grupamentos -SH à δ -ALA-D, reduzindo as pontes S-S à forma SH, antes oxidada pelos compostos.

Em 1998, Barbosa e cols foram os primeiros a observar a inibição desta enzima *in vitro* em sobrenadante de fígado pelo ditelureto de difenila (Figura 4) com IC_{50} (concentração inibitória 50%) de aproximadamente $10\mu M$, menor do que a IC_{50} do seu análogo, o disseleneto de difenila, nas mesmas condições. Por outro lado, a δ -ALA-D de folhas de abóbora não foi inibida pelo ditelureto de difenila, devido às diferenças entre a isoforma animal que possui dois resíduos cisteinil, e a vegetal, que possui apenas um. Além disso, o ditelureto de difenila também é capaz de inibir *in vitro* a δ -

ALA-D de eritrócitos humanos a partir da concentração de $4\mu\text{M}$ (Nogueira e cols, 2003a).

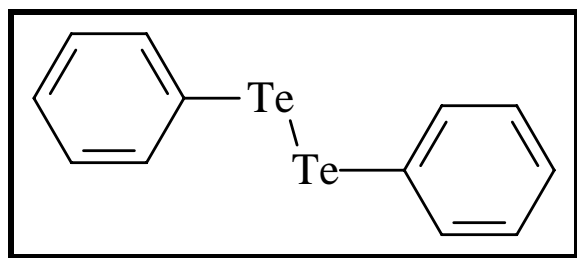


Figura 4: Estrutura química do ditelureto de difenila.

Maciel e cols (2000) demonstraram a inibição da δ -ALA-D em fígado, cérebro e rim em camundongos após administração aguda (1 dia) de ditelureto de difenila na dose de $500\mu\text{mol/Kg}$, bem como inibição da enzima hepática e cerebral após exposição sub crônica (14 dias) nas doses de 10 e $25\mu\text{mol/Kg}$. Meotti e cols (2001) verificaram a inibição de 40% da atividade desta enzima em eritrócitos de camundongos após três dias de administração única de ditelureto de difenila na dose de $150\mu\text{mol/Kg}$. Em contraste ao ditelureto de difenila, que inibe fortemente *in vitro* e *in vivo* a δ -ALA-D, um telureto vinílico, o 1-butiltelurenil-2-metiltiohepteno não inibe a atividade da enzima *in vitro*, mas após única administração de $75\mu\text{mol/Kg}$ foi capaz de inibi-la em fígado e baço (Savegnago e cols, 2006). Estes dados são bastante relevantes considerando que a δ -ALA-D é um importante biomarcador de toxicidade, mas é fracamente inibida por este composto.

As toxicidades hepática e renal *ex vivo* também já foram observadas para alguns compostos orgânicos de telúrio. Os marcadores mais comuns de hepatotoxicidade são as atividades plasmáticas da aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT), que se tornam aumentadas quando há dano causado pelos compostos (Meotti e cols, 2003; Savegnago e cols, 2006). A toxicidade renal pôde ser evidenciada pela diminuição das funções renais, como diminuição da

excreção de creatinina e uréia, que se tornam aumentadas no plasma (Savegnago e cols, 2006). Rooseboom e cols (2002) sintetizaram a Te-fenil-L-telurocisteína, e verificaram que este composto é capaz de depletar GSH e de diminuir a atividade da lactato desidrogenase (LDH) em hepatócitos de ratos tanto quanto o paracetamol, um conhecido agente hepatotóxico.

Uma característica tóxica bastante descrita para os compostos orgânicos de telúrio é a citotoxicidade. O ditelureto de difenila é capaz de afetar sistemas de fosforilação e desfosforilação de proteínas celulares, alterando a organização e a estrutura celular (Moretto e cols, 2005). Também é capaz de induzir a ativação de caspases em concentração de apenas $1\mu\text{M}$ (Iwase e cols, 2004). Sailer e cols (2004) mostraram, num trabalho comparativo, que outros diteluretos diarílicos são capazes de causar apoptose através de alterações no ciclo celular de células promielocíticas humanas, o que não ocorre com análogo sem telúrio.

A neurotoxicidade causada pelos compostos orgânicos de telúrio é evidenciada por várias alterações nos animais expostos, como por exemplo, alterações na memória, desmielinização, neuropatia periférica (Laden & Porter, 2001; Toews e cols., 1997, Goodrum, 1998). A desmielinização e suas conseqüências induzidas por compostos orgânicos de telúrio devem-se à inibição de uma outra enzima sulfidrílica importante na biossíntese do colesterol, principal lipídeo presente na mielina, a esqualeno monooxigenase. Esta enzima contém grupamentos sulfidrílicos vicinais que são oxidáveis tanto por telúrio elementar (Toews e cols, 1997) e por telúrio inorgânico, como pelas formas orgânicas de telúrio, dicloreto de dimetiltelúrio, cloreto de trimetiltelúrio e dimetiltelureto (Laden & Porter, 2001; Goodrum, 1998).

Além deste mecanismo de neurotoxicidade, há ainda outra enzima sulfidrílica bastante importante para a manutenção da atividade neuronal normal que é suscetível a agentes oxidantes como os compostos orgânicos de telúrio, a Na^+/K^+ ATPase. Esta enzima está presente na membrana celular e é responsável pelo transporte ativo de sódio e potássio nas células, especialmente nas do sistema nervoso central (Doucet, 1998; Jorgensen, 1986). Borges e cols (2005) verificaram que o ditelureto de difenila é capaz de inibir esta enzima *in vitro* em de baixas concentrações, sendo esta inibição

revertida pela co-incubação com DTT, comprovando a oxidação os grupamentos tiólicos. Além disso, este composto pode também alterar o sistema glutamatérgico, diminuindo a captação vesicular *in vitro* de [³H]glutamato, bem como diminuindo a união específica de [³H]glutamato no receptor NMDA (N- metil D -aspartato) em preparação de membranas *in vitro* e *ex vivo* em baixas concentrações (Nogueira e cols, 2001; 2002). Isto se deve à presença de grupamentos sulfidrílicos nos transportadores de glutamato de alta especificidade sódio-dependentes, assim como a presença, no receptor NMDA, de um sítio redox dependente da forma reduzida de seus grupos sulfidrílicos para a união específica com o neurotransmissor, ambos facilmente oxidáveis pelos compostos orgânicos de telúrio, (Trotti e cols, 1993).

É importante ressaltar que os compostos orgânicos contendo telúrio são bem mais tóxicos que os que contêm selênio, elemento que compartilha várias características com o telúrio por ser da mesma família (Maciel e cols, 2000; Nogueira e cols, 2001; Meotti e cols, 2003; Nogueira e cols 2004; Sailer e cols, 2004; Santos e cols, 2005).

I.1.2. Dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato

Apesar da potencial toxicidade que os compostos orgânicos de telúrio podem exercer sobre os organismos vivos, como foi aqui descrito, as possíveis e terapeuticamente relevantes propriedades farmacológicas que são relatadas na literatura nos encorajam a avaliar novos compostos.

O dietil-2 fenil-2-telurofenil vinilfosfonato (Figura 5) é um composto de telúrio orgânico de estrutura bastante distinta de outros já descritos na literatura. É um β -organocalcogenil vinilfosfonato de grande potencial sintético, visto que combina a conhecida reatividade química dos fosfonatos vinílicos e a capacidade dos calcogenetos vinílicos de facilmente se transformarem em outros compostos orgânicos com retenção da configuração (Comasseto e cols, 1997; Minami & Motoyoshiya, 1992, Zeni e cols, 2006).

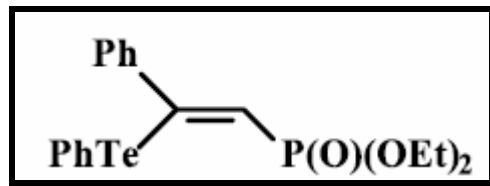


Figura 5: Estrutura química do dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato (Braga e cols, 2003).

I.2. Vias de administração

Um fármaco precisa estar presente em concentrações adequadas nos seus locais de ação para produzir seus efeitos característicos, ou seja, precisa estar biodisponível. A primeira barreira pela qual um fármaco atravessa para tanto e a sua absorção. O processo de absorção depende de alguns fatores, como o tamanho da molécula administrada, a solubilidade no local de absorção, a lipossolubilidade, bem como a via pela qual o fármaco foi administrado (Benet, 1978).

A escolha da via de administração é crucial para a biodisponibilidade, bem como para os efeitos tóxicos do fármaco administrado. Diversas vias são utilizadas clinicamente, como a intravenosa, a intramuscular, a oral, a pulmonar, a tópica e, em especial, a subcutânea e a intraperitoneal (Goodman e Gilman, 2003).

A via subcutânea (s.c.) é bastante útil pela fácil administração, porém a absorção pela pele pode ser lenta e resultar em uma absorção inicial pela circulação periférica, lenta, constante e de longa duração (Hogson e Levi, 1994). A administração intraperitoneal consiste na injeção do fármaco na cavidade abdominal, que oferece uma grande superfície de absorção a partir da qual os fármacos entram rapidamente na circulação, em especial pela veia porta. Isso aumenta muito o metabolismo de primeira passagem, o que pode diminuir a biodisponibilidade de um fármaco ou propiciar a formação de metabólitos tóxicos. (Goodman e Gilman, 2003).

Alguns trabalhos demonstraram a importância da via pela qual um composto orgânico de telúrio ou de selênio é administrado. O ditelureto de difenila, por exemplo, é mais tóxico a camundongos quando administrado pela via i.p. do que pela via s.c., da mesma forma que o seu análogo, o disseleneto de difenila, que chega a ter um IC₅₀ pela via s.c. cerca de três vezes maior do que pela via i.p. (Meotti e cols, 2001; Nogueira e cols, 2003b). Além disso, a capacidade de metabolização dos camundongos é maior do que a dos ratos, o que, associado a maior biodisponibilidade oferecida pela administração i.p., leva a formação mais rápida de metabólitos, tóxicos ou não (Hucker, 1970; Caldwell 1981).

II. Objetivos

II.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é demonstrar, *in vitro*, a atividade antioxidante do dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato, bem como avaliar *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* a toxicidade deste composto através de parâmetros bioquímicos já descritos na literatura.

II.2. Objetivos específicos:

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- 1) Determinar, *in vitro*, a atividade antioxidante do dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato e do ditelureto de difenila, através da determinação da formação de TBARS espontânea e induzida por Fe^{+2} em homogeneizados de cérebro, fígado e rim, e comparar a potência de seus efeitos;
- 2) Determinar, *in vitro*, a oxidação de grupamentos tiólicos do DTT na presença e na ausência de homogeneizado de fígado e a atividade da δ -ALA-D em homogeneizados de fígado, cérebro e rins na presença de diferentes concentrações de dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato;
- 3) Avaliar, *in vivo*, os efeitos da administração subcrônica pela via subcutânea (s.c.) e intraperitoneal (i.p.) de dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato e do ditelureto de difenila (s.c.) em diferentes doses sobre o índice de mortalidade e, após a morte, os pesos do fígado, dos rins e do cérebro de camundongos albinos;
- 4) Determinar, *ex vivo*, a atividade da δ - ALA-D em homogeneizados de fígado, cérebro e rins após o tratamento subcrônico de dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato pela via s.c e i.p.;

- 5) Analisar os efeitos *ex vivo* do dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato após 12 administrações diárias pela via i.p., sobre as atividades plasmáticas da AST e da ALT, bem como alterações em parâmetros de estresse oxidativo, através da determinação indireta de peroxidação lipídica (TBARS), dos níveis de vitamina C, de GSH e GSSG, e através das atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase em homogeneizados de fígado, cérebro e rins dos camundongos tratados.

III. Artigos científicos

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigos científicos, os quais se encontram aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos. O artigo 1 esta na forma como foi publicado na revista, enquanto o artigo 2 esta na forma como foi submetido à revista.

**III.1. DIETIL-2-FENIL-2-TELUROFENIL VINILFOSFONATO: UM
COMPOSTO ORGÂNICO DE TELÚRIO COM BAIXA TOXICIDADE.**

Artigo 1

**DIETHYL-2-PHENYL-2-TELLUROPHENYL
VINYLPHOSPHONATE: A ORGANOTELLURIUM COMPOUND
WITH LOW TOXICITY**

AVILA, D.S., BEQUE, M.C., FOLMER, V., BRAGA, A.L., ZENI, G.,
NOGUEIRA, C.W., SOARES, F.A.A., ROCHA, J.B.T.

Toxicology, 224 (2006) 100-107



Diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate: An organotellurium compound with low toxicity

Daiana Silva de Ávila, Marisa C. Beque, Vanderlei Folmer, Antônio L. Braga, Gilson Zeni, Cristina Wayne Nogueira, Félix Alexandre Antunes Soares, João Batista Teixeira Rocha*

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

Received 8 December 2005; received in revised form 23 February 2006; accepted 18 April 2006
Available online 27 April 2006

Abstract

It is well-known that organotellurium compounds can have antioxidant activity *in vitro*, but *in vivo* these compounds can be potentially toxic to rodents. Here we investigated the potential *in vitro* and *ex vivo* toxicity of a new β -organochalcogenyl vinylphosphonate, the diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate. The *in vitro* antioxidant activity of this organotellurium compound was also investigated. *In vitro*, the rate of dithiotreitol (DTT) oxidation was increased and the activity of cerebral, renal and hepatic delta-aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) was decreased by diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate (120–1200 μ M), indicating that this compound oxidize-SH groups. The antioxidant activity was also observed in brain, liver and kidney, in very low concentrations (0.4, 1.0, 4.0, 10.0 and 40.0 μ M), and this capacity was comparable to the antioxidant standard organotellurium compound, diphenyl ditelluride. *In vivo*, δ -ALA-D activity in liver, kidney and brain of mice treated for 12 days with dimethylsulfoxide (DMSO) as vehicle, 25, 75 or 250 μ mol/kg of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate was not affected. Furthermore, only one animal treated with the highest dose died, whereas all animals treated with diphenyl ditelluride died in the fourth day. These results suggest that this novel organotellurium compound interacts with the sulfhydryl groups, however only at higher doses when compared with diphenyl ditelluride. Since diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate had low toxicity to mice after sub-chronic exposure, it becomes important to investigate its possible pharmacological properties.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Organotellurium compounds; Diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate; Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity; Toxicity

1. Introduction

Tellurium (Te) is a trace element widely used as a component in microelectronic industry, in rubber compounding, in the synthesis of drugs and as gasoline

antiknock additive (Fairhill, 1969). Although it is not a particularly abundant element, it may be readily absorbed into the body through the diet, mainly in the form of organic compounds such as telluro-methionine (Lamer, 1995). The absorption of inorganic tellurium in the form of tellurites and tellurates can also occur (Lamer, 1995).

Organotellurium compounds have been synthesized since 1840 (Wöhler, 1840), but pharmacological and toxicological studies about them are still incipient. It

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8140; fax: +55 55 3220 8031.

E-mail address: felix_antunes_soares@yahoo.com.br (J.B.T. Rocha).

is known that organochalcogens containing Te in its structure are always more toxic than analogue selenium-containing compounds (Maciel et al., 2000; Nogueira et al., 2001; Meotti et al., 2003; Borges et al., 2003; Nogueira et al., 2004; Sailer et al., 2004; Santos et al., 2005). However, comparative toxicological studies are very rare in the literature.

Recently, the possible pharmacological properties of organotellurium compounds have been investigated. Sredni and colleagues described that a tellurate, coded as AS 101, showed immunomodulating properties (Sredni et al., 1987). Furthermore, organotellurium compounds can exhibit potent antioxidant activity mediated by their Glutathione peroxidase (GPX) mimetic properties (Andersson et al., 1993, 1994; Engman et al., 1992, 1995; Ren et al., 2001; Rossato et al., 2002) and peroxynitrite scavenger abilities (Briviba et al., 1998).

The toxicity of organotellurium compounds is mediated at least in part by their ability to react with thiols groups from biologically important molecules. In fact, organotellurium compounds, including diphenyl ditelluride, can inhibit thiol-containing enzymes, such as δ -ALA-D (Barbosa et al., 1998; Maciel et al., 2000; Nogueira et al., 2001, 2003), Na^+ , K^+ ATPase, (Borges et al., 2005), cathepsin B (Cunha et al., 2005) and squalene monooxygenase (Laden and Porter, 2001). The inhibition of squalene monooxygenase can contribute to demyelination and, consequently, to neurotoxic effects of organotellurium compounds (Goodrum, 1998; Toews et al., 1991).

δ -ALA-D catalyzes the condensation of two aminolevulinic acid molecules with the formation of porphobilinogen, which is a heme precursor (Jaffe, 1995). Of particular toxicological importance, δ -ALA-D inhibition may impair heme biosynthesis and can result in the accumulation of aminolevulinic acid (ALA), which has some pro-oxidant activity (Bechara et al., 1993; Emanuelli et al., 2001). As indicated above, δ -ALA-D inactivation by diphenyl ditelluride is mediated by a direct interaction between cysteinyl residues and the organotellurium compound (Barbosa et al., 1998; Maciel et al., 2000; Meotti et al., 2003; Nogueira et al., 2004). However, data about inhibitory action of other organotellurium compounds in δ -ALA-D are lacking in the literature.

Diethyl 2-(organyl)-2-(organochalcogenyl) vinylphosphonates (β -organochalcogenyl vinylphosphonates) are intermediates of great synthetic potential since they combine the well-known chemical reactivity of vinylic chalcogenides and vinylic phosphonates (Zeni et al., 2003; Braga et al., 2000, 2003). These vinylic tellurides are important synthetic intermediates because of their easy transformation to other organic

compounds with retention of configuration (Comasseto et al., 1997). However, there are no available data about their pharmacological or toxicological effects.

In this study, we evaluated the toxicity of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate, using δ -ALA-D as biochemical marker of toxicity. Further insight in a potential interaction of 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate with thiols was obtained examining DTT oxidation in the presence of the tellurium compound. The antioxidant activity of this compound was also determined *in vitro*. Of particular importance for the prospective pharmacological use of organotellurium compounds, the antioxidant activity of the compound was obtained at concentrations significantly lower than that required to oxidize δ -ALA-D or DTT. In line with its lower affinity for thiols, administration of high doses of 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate to mice caused practically no signs of toxicity and did not inhibited cerebral, hepatic and renal δ -ALA-D.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult wistar rats and mice from our own breeding colony were maintained in an air conditioned room (20–25 °C) under natural lighting conditions with water and food (Guabi-RS, Brazil) *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with the Guiding Principles for the Use of Animals in Toxicology, adopted by the Society of Toxicology in July 1989.

2.2. Synthesis of diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate

β -Organotelluranyl vinylphosphonate (Fig. 1) synthesis was performed by addition of alkynylphosphonates to a solution of sodium organyl telluroate, prepared by the reduction of diorganyl ditellurides with sodium borohydride in ethanol at room temperature (Braga et al., 2000).

2.3. Chemicals

The reagents were purchased from local suppliers or from Sigma.

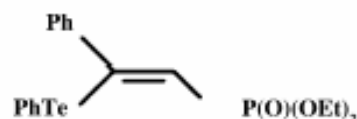


Fig. 1. Structure of diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate.

2.4. *In vitro* evaluations

2.4.1. Tissue preparation

Animals were anesthetized and killed by decapitation. Brain, kidney, and liver were quickly removed, placed on ice, and homogenized in 3, 7 and 10 volumes of 150 mM NaCl, respectively. The homogenate was centrifuged at $4000 \times g$ at 4°C for 10 min to yield a low-speed supernatant fraction (S1) that was used in the experiments.

2.4.2. Determination of the rate of dithiotreitol (DTT) oxidation

The rate of thiol oxidation was determined in a medium containing 84 mM potassium phosphate buffer, pH 6.4, 2 mM DTT and increasing concentrations of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate (0, 40, 120, 400 and 1200 μM) either in the presence or absence of rat liver S1. At 0, 30, and 120 min, aliquots of the reaction mixture (50 μL) were checked for the amount of -SH groups at 412 nm (absorption coefficient, $1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The -SH groups in the presence of tissue supernatants (S1) were calculated as the difference between -SH concentration in the tube containing DTT plus tissue and the -SH concentration in the tube containing tissue alone.

2.4.3. Enzyme assay

Rat and mice δ -ALA-D activity was assayed according to the method of Sassa (1982) by measuring the rate of product (porphobilinogen, PBG) formation, except that 84 mM potassium phosphate buffer, pH 6.4, and 2.5 mM ALA were used. All experiments were carried out after a 10 min preincubation with diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate at concentrations of 40, 120, 200, 400, 600 and 1200 μM . The reaction was started 10 min after the addition of the enzyme preparation by adding the substrate, and incubation was carried out for 1–3 h at 37°C . The reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm, with a molar absorption coefficient of $6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for the Ehrlich-porphobilinogen salt. The reactions rates were linear with respect to time of incubation and added protein for all the experimental conditions. Simultaneously, a set of tubes was assayed in the presence of 8 mM DTT to observe the possible reversion of the δ -ALA-D inhibition.

2.4.4. Lipid peroxidation

The formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in S1 of brain, liver and kidney of rats was assayed according to Ohkawa et al. (1979). Basal and Fe(II) stimulated TBARS production was determined after 1 h of incubation at 37°C with 0, 0.4, 1, 4, 10 and 40 μM of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate or diphenyl ditelluride.

2.5. *In vivo* evaluations

2.5.1. Animals treatment

Twenty-five mice were divided into five groups and treated daily with 25, 75, 250 $\mu\text{mol/kg}$ of diethyl 2-phenyl-2 tel-

lurophenyl vinylphosphonate subcutaneously (s.c.), DMSO (2.5 mL/kg, s.c.) or saline 0.9% (control, s.c.) for 12 days. The body weight and the number of dead mice were determined daily. In the 12th day, the animals were sacrificed and brain, liver and kidney were removed, weighted and homogenated for measurement of δ -ALA-D activity, as previously described.

Concomitantly, 25 mice were divided into five groups and treated with 12.5, 25 and 75 $\mu\text{mol/kg}$ of diphenyl ditelluride, DMSO (vehicle) or NaCl 0.9% (control) for the same time than that of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate in order to compare the survival rate and δ -ALA-D activity between two organotellurium compounds.

2.6. Statistical analysis

Statistical significance was assessed by one-way ANOVA, followed by Student–Newmann–Keuls test for post hoc comparison. Results were considered significant different at values of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. *In vitro* evaluations

3.1.1. Effects of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate on the rate of DTT oxidation

To investigate the effect of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate on the oxidation of sulfhydryl groups, we used DTT as substrate and determined the rate of DTT oxidation in the absence or the presence of liver supernatant preparations. In the absence of liver S1, diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate increased significantly the rate of DTT oxidation after 30 min of the start of the reaction ($p < 0.001$, Fig. 2A). In the presence of liver supernatant, diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate did not change the rate of DTT oxidation (Fig. 2B). Further, the oxidation of DTT was higher in the presence of hepatic S1, which is in accordance with previous studies (Barbosa et al., 1998; Soares et al., 2005) and indicates the presence of some tissue factor that has thiol-oxidase activity.

3.1.2. Effects of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate on δ -ALA-D activity

Diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate caused a concentration dependent inhibition of hepatic δ -ALA-D ($p < 0.01$; Fig. 3A) and the inhibition turned out to be significant from 200 to 1200 μM . The estimated IC_{50} was between 400 and 200 (42 and 58% of inhibition, respectively; Fig. 3A). DTT was included in the reaction medium to investigate the possible involvement of cysteinyl groups of δ -ALA-D in the inhibitory action

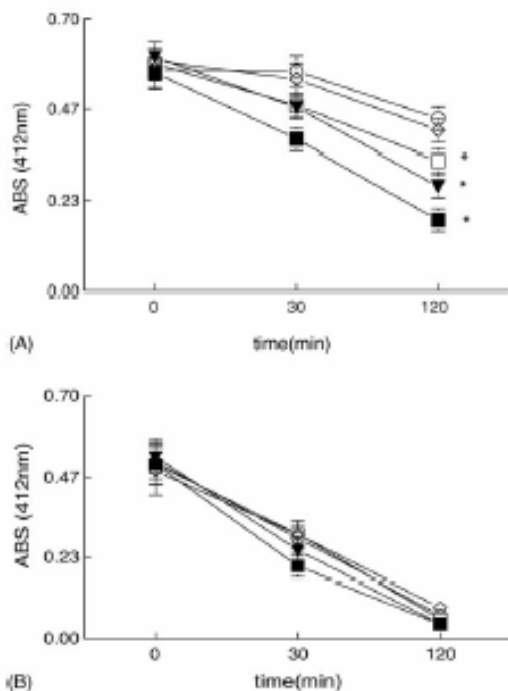


Fig. 2. Effect of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate on the rate of DTT oxidation. The experiments were carried out in the absence (A) or in the presence (B) of rat liver supernatant. The reaction was started by adding DTT to a final concentration of 2 mM in a medium containing 84 mM sodium phosphate buffer, pH 6.4, in the absence (○) or in the presence of 40 μM (◊), 120 μM (◻), 400 μM (◼) and 1200 μM (◼) of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate. Results are expressed as mean ± S.E.M. for 17 independent experiments. (*) Indicate significant difference from control (DMSO), $p < 0.05$ and post hoc by SNK.

of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate. DTT reversed the δ -ALA-D inhibition at all concentrations of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate tested ($p < 0.001$).

In kidney, the effect of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate was statistically significant at 120 μM ($p < 0.05$) and the compound presented a concentration-dependent effect up to 600 μM, when its maximum inhibitory effect was obtained $p < 0.001$, Fig. 3B). DTT protected the cysteinyl groups of renal δ -ALA-D and abolished the inhibitory effect of 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate ($p < 0.001$).

Similarly to liver and kidney, diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate inhibited cerebral δ -ALA-D activity ($p < 0.001$, Fig. 3C) and DTT completely abolished this inhibition ($p < 0.001$).

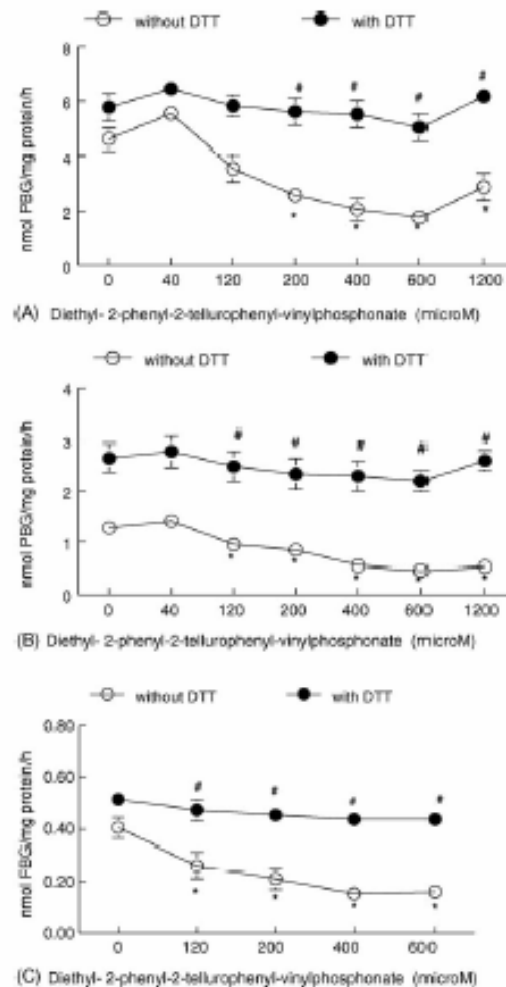


Fig. 3. In vitro effect of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate on rat δ -ALA-D and DTT reversion in liver (A), kidney (B) and brain (C). PBG is used as porphobilinogen abbreviation. Results are expressed as mean ± S.E.M. for five to ten independent experiments. (*) Significant difference from control (DMSO), $p < 0.05$ by SNK. (#) Significant effect of DTT on δ -ALA-D activity, $p < 0.05$ by SNK.

3.1.3. Effects of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate and diphenyl ditelluride on TBARS production

Diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate and diphenyl ditelluride compounds caused a significant decrease in cerebral, hepatic and renal TBARS contents ($p < 0.05$; Table 1). In brain, diphenyl ditelluride was more effective as antioxidant than diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate. Furthermore, the two

Table 1
Effect of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate and diphenyl ditelluride in spontaneous TBARS production in rat brain, liver and kidney

	Brain		Liver		Kidney	
	Phosphonate	Ph ₂ Te ₂	Phosphonate	Ph ₂ Te ₂	Phosphonate	Ph ₂ Te ₂
Basal	100.0 ± 0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
DMSO	86.34 ± 2.3	129.5 ± 14.2	106.1 ± 5.5	105.52 ± 8.9	86.87 ± 5.1	93.31 ± 1.7
0.4 μM	84.34 ± 2.8 [*] , ^{***}	58.4 ± 5.7 [*]	85.72 ± 5.4	60.69 ± 15.0	89.62 ± 8.6 ^{***}	67.8 ± 7.4 [*]
1.0 μM	79.76 ± 2.4 [*] , ^{***}	24.39 ± 9.7 [*]	62.93 ± 8.4 [*]	84.98 ± 25.9	71.9 ± 7.0 [*]	59.98 ± 3.2 [*]
4.0 μM	21.42 ± 5.2 [*]	22.74 ± 10.2 [*]	53.85 ± 10.4 [*]	58.54 ± 10.9	63.85 ± 3.8 [*]	49.53 ± 9.8 [*]
10 μM	10.78 ± 1.8 [*]	21.16 ± 8.1 [*]	54.76 ± 10.6 [*]	67.75 ± 17.0	59.22 ± 3.8 [*]	48.87 ± 10.1 [*]
40 μM	15.1 ± 4.5 [*]	16.69 ± 2.9 [*]	57.21 ± 11.0 [*]	75.76 ± 20.0	58.66 ± 2.0 [*] , ^{***}	43.7 ± 6.1 [*]

Data are expressed as percent of control ± S.E.M.

^{*} Statistical difference from diphenyl ditelluride ($p < 0.05$).

^{***} Statistical difference from basal ($p < 0.001$).

Table 2
Effect of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate and diphenyl ditelluride in Fe(II)-induced TBARS production in rat brain, liver and kidney

	Brain		Liver		Kidney	
	Phosphonate	Ph ₂ Te ₂	Phosphonate	Ph ₂ Te ₂	Phosphonate	Ph ₂ Te ₂
Fe	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Fe + DMSO	96.82 ± 8.1	102.0 ± 2.2	112.1 ± 4.3	99.6 ± 0.3	93.13 ± 2.2	98.8 ± 6.5
Fe + 0.4 μM	21.83 ± 4.8 [*] , ^{***}	11.82 ± 2.2 [*]	88.84 ± 7.4 ^{***}	55.22 ± 19.1	55.48 ± 3.0 [*] , ^{***}	33.44 ± 6.2 [*]
Fe + 1 μM	14.51 ± 1.7 [*] , ^{***}	5.11 ± 1.2 [*]	72.48 ± 13.9 [*] , ^{***}	11.97 ± 0.1 [*]	40.06 ± 3.0 [*] , ^{***}	19.82 ± 1.1 [*]
Fe + 4 μM	5.99 ± 1.5 [*]	4.98 ± 1.3 [*]	44.86 ± 8.6 [*] , ^{***}	13.0 ± 0.8 [*]	25.38 ± 3.9 [*]	20.36 ± 2.3 [*]
Fe + 10 μM	5.16 ± 1.2 [*]	5.26 ± 1.4 [*]	19.8 ± 3.3 [*] , ^{***}	12.21 ± 0.1 [*]	24.47 ± 3.1 [*]	18.7 ± 1.6 [*]
Fe + 40 μM	4.79 ± 1.1 [*]	4.86 ± 1.1 [*]	14.21 ± 1.9 [*]	10.68 ± 0.5 [*]	23.17 ± 3.3 [*] , ^{***}	13.97 ± 0.1 [*]

Data are expressed as percent of control ± S.E.M.

^{*} Statistical difference from diphenyl ditelluride ($p < 0.05$).

^{***} Statistical difference from control ($p < 0.001$).

compounds were more effective in brain than in liver and kidney.

The antioxidant activity of diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate and diphenyl ditelluride was also determined in the presence of Fe(II) (Bellé et al., 2004). Diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate and diphenyl ditelluride reduced significantly Fe(II)-induced TBARS production in brain, liver and

kidney ($p < 0.05$, Table 2). The antioxidant activity of these organochalcogens was higher in brain, when compared to liver and kidney. In hepatic tissue, diphenyl ditelluride was more effective than diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate ($p < 0.05$). Accordance with this, previous data from our laboratory have demonstrated that diphenyl ditelluride is an antioxidant agent at low concentrations (Rossato et al., 2002).

Table 3
Body and organ weights of mice treated with diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate

Group (μmol/kg)	BW1	BW6	BW12	Kidney weight	Liver weight	Brain weight
0	44.75 ± 2.7	43.75 ± 3.0	42.75 ± 3.1	0.59 ± 0.1	1.8 ± 0.01	0.43 ± 0.03
25	46.25 ± 2.6	47.25 ± 2.1	43.67 ± 1.5	0.56 ± 0.1	2.1 ± 0.03	0.34 ± 0.02
75	40.0 ± 2.0	41.0 ± 1.4	38.33 ± 1.6	0.49 ± 0.03	1.9 ± 0.01	0.38 ± 0.03
250	42.0 ± 1.3	40.3 ± 0.7	39.33 ± 1.3	0.67 ± 0.01	2.8 ± 0.01	0.31 ± 0.01
NaCl	48.5 ± 0.2	48.5 ± 0.7	48.0 ± 0.9	0.45 ± 0.23	2.0 ± 0.04	0.38 ± 0.03

BW (body weight) was determined on days 1, 6 and 12 of treatment. Data are expressed as mean ± S.E.M. for five mice in each group, except in group treated with 250 μmol/kg ($n = 4$).

3.2. Ex vivo evaluations

3.2.1. Body weight, organ-weight and animal survival

The body weight of mice treated with diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate was not

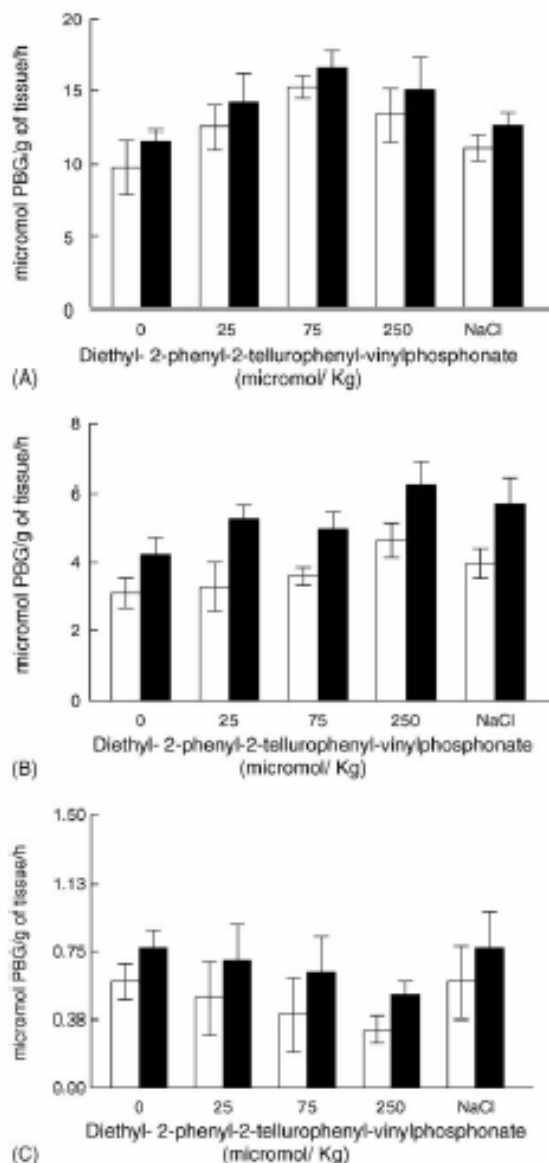


Fig. 4. Ex vivo mice δ -ALA-D activity in liver (A), kidney (B) and brain (C). Animals were treated with vehicle (DMSO), NaCl 0.9% (control) 25, 75 and 250 $\mu\text{mol/kg}$ of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate for 12 days. PBG is used as porphobilinogen abbreviation. Data are reported as mean \pm S.E.M. for five mice in each group, except for the group treated with 250 μM ($n=4$).

affected during the treatment. Similarly, the organ weights were not modified at the end of the treatment (Table 3). Moreover, all animals treated with 25 and 75 $\mu\text{mol/kg}$ of diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate survived, and only one animal treated with 250 $\mu\text{mol/kg}$ died. In contrast, all animals injected with diphenyl ditelluride died in the fourth day of treatment, regardless of the doses administered (12, 5, 25 and 75 $\mu\text{mol/kg}$).

3.2.2. δ -ALA-D activity in mice treated with diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate

δ -ALA-D activity from mice liver (Fig. 4A), kidney (Fig. 4B) and brain (Fig. 4C) was not affected by the sub-chronic treatment with diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate at all doses administered.

4. Discussion

The β -organochalcogenyl vinylphosphonate compounds are important intermediates for the synthesis of encephalophosphonates compounds (Braga et al., 2001), which may have antifungal (Alami et al., 1996), anti-tumor and antibiotic activity (Grissom et al., 1996). However, data regarding the toxicity of β -organogenyl vinylphosphonate compounds are lacking in the literature. Indeed, for the best of our knowledge, the present study is the first investigation about the toxicity of diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate.

The results here presented indicate that diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate inhibits δ -ALA-D in vitro. Furthermore, the mechanism of enzyme inhibition involves the oxidation of its essential -SH groups to disulfides, since DTT abolished the inhibitory effect of diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate. In line with this, the tellurium compound increased the rate of DTT oxidation. The oxidation of DTT and δ -ALA-D caused by diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate is significantly less than that previously published for diphenyl ditelluride (Barbosa et al., 1998). In the previous study, at 100 μM diphenyl ditelluride inhibited almost completely hepatic δ -ALA-D, whereas in the present study, diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate at 120 μM caused an inhibition of the enzyme that was less than 30%. The relative small inhibitory potency is certainly related to the stability of the Te-carbon bond in the diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate compound, when compared to that of Te-Te in ditelluride (Petraggiani, 1994).

One interesting finding was the very low mortality of animals treated for 12 days with diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate when compared to

animals injected with diphenyl ditelluride. All animals treated with diphenyl ditelluride died within 4 days of treatment (even those injected with the lowest dose of 12.5 $\mu\text{mol/kg}$), whereas only one animal treated with 250 $\mu\text{mol/kg}$ of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate died. This dose is at least 20 times higher than the lowest dose of diphenyl ditelluride administered. These data indicate an advantage of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate over other tellurium compounds that cause high mortality level even when tested at lower doses (Meotti et al., 2003; Laden and Porter, 2001).

In fact, previous studies from our laboratory (Maciel et al., 2000) indicated that diphenyl ditelluride administered to mice for 14 days at no lethal doses (2.5 and 10 $\mu\text{mol/kg}$) inhibited significantly δ -ALA-D from liver and brain. Taken together, these results might indicate that, in contrast to diphenyl ditelluride, δ -ALA-D it is not an *in vivo* molecular target for diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate. The results of *ex vivo* experiments showing that diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate did not affect the δ -ALA-D activity from different organs support this conclusion. We speculate that the lack of toxicity of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate in the *ex vivo* δ -ALA-D assay is related to its weak ability to oxidize thiols groups or due to its possible biotransformation (Nogueira et al., 2004).

It is evident that the potential toxic effects of diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate are lesser than that of alkyl and aryl ditellurides. Thus, it becomes relevant to investigate its antioxidant capacity and other potential activities that have already been described for other organotellurides (Rao et al., 1996; Attebery and Sailer, 2002; Sailer et al., 2003; Engman et al., 1995; Wieslander et al., 1998; Andersson et al., 1993; Ren et al., 2001, which shares with diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate some chemical properties related to the tellurium atom. Here we investigated the capacity of diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate to prevent the *in vitro* lipid peroxidation in brain, liver or kidney of rats. The different effects observed in the TBARS assay between the organotellurium compounds could be related to the fact that diphenyl ditelluride is more reactive when compared with diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate (Petragnani, 1994; Zeni et al., 2003). In line with this, the antioxidant activity of diphenyl ditelluride against spontaneous and Fe(II)-induced TBARS in brain was relatively higher than that of diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate (Tables 1 and 2). However, the difference between the two chalcogens is less

significant in the presence of Fe(II). In contrast, the antioxidant activity determined in liver and kidney under basal conditions (spontaneous TBARS production) was similar for the two compounds, but in the presence of Fe(II) diphenyl ditelluride was more potent than diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate. In spite of this, we must emphasize that diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate exhibit a good antioxidant activity and the estimated IC_{50} for iron-stimulated TBARS production was 2.53 μM .

Taken together the lack of *in vivo* δ -ALA-D inhibition, the *in vitro* antioxidant activity and the low mortality caused by diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate in mice, we can suggest that this organotelluride is a promising compound for future pharmacological studies involving organotellurium compounds. As its biological properties are still unknown, a relationship between its structure and biological effects, when compared to other tellurides, should be investigated.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq, FAPERGS, and CAPES.

References

- Alami, M., Ferri, F., Gaslain, Y., 1996. A two-step synthesis of terbinafine. *Tetrahedron Lett.* 37, 57–58.
- Andersson, C.M., Brattsand, R., Hallberg, A., 1994. Diaryl tellurides as inhibitors of lipid peroxidation in biological and chemical systems. *Free Radic. Res.* 20, 401–410.
- Andersson, C.M., Hallberg, A., Brattsand, R., Cotgrave, I.A., Engman, L., Persson, J., 1993. Glutathione peroxidase-like activity of diaryl tellurides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3, 2553–2558.
- Attebery, M., Sailer, B.L., 2002. Detection of apoptosis occurring in promyelocytic (line HL-60) cell populations induced by novel organotellurium compounds. *BIOSS* 73, 52–60.
- Barbosa, N.B.V., Rocha, J.B.T., Zeni, G., Emanuelli, T., Beque, M.C., Braga, A.L., 1998. Effect of organic forms of Selenium on delta-aminolevulinic dehydratase from liver, kidney and brain of adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149, 243–253.
- Bechara, E.J.H., Medeiros, M.H.G., Monteiro, H.P., Hermes-Lima, M., Pereira, B., Demasi, M., Costa, C., Adhalla, D.S.P., Omuki, J., Wendel, C.M.A., Masci, P.D., 1993. A free radical hypothesis of lead poisoning and in Born porphyrias associated with 5-aminolevulinic overload. *Quim. Nova* 16.
- Bellé, N.V., Dalmolin, G.D., Fonini, G., Rubin, M.A., Rocha, J.B.T., 2004. Polyamines reduced lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. *Brain Res.* 1008, 245–251.
- Borges, V.C., Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B., 2003. Organochalcogens affect neurotransmission in human platelets. *Neurochem. Res.* 29, 1505–1509.

- Borges, V.C., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and selen on cerebral Na⁺, K⁺ ATPase activity in rats. *Toxicology* 215, 191–197.
- Braga, A.L., Alves, E.F., Silveira, C.C., Andrade, L.H., 2000. Stereoselective addition of sodium organyl chalcogenolates to alkynyl-phosphonates: synthesis of diethyl 2-(organyl)-2-(organochalcogenyl)vinylphosphonates. *Tetrahedron Lett.* 41, 161–163.
- Braga, A.L., Rhodem, C.R.T., Zeni, G., Silveira, C.C., Andrade, L.H., 2003. Stereospecific synthesis of phosphono-(1Z, 3E)-dienyl compounds and vinyl-phosphines oxides. *J. Organomet. Chem.* 682, 35–40.
- Braga, A.L., Leandro, H.L., Silveira, C.C., Moro, A.V., Zeni, G., 2001. Stereospecific formation of enyne-phosphonates via Palladium-catalyzed cross-coupling reaction of beta-organotellurium vinylphosphonates with alkynes. *Tetrahedron Lett.* 42, 8563–8565.
- Briviba, K., Tamler, R., Klotz, L.-O., Engman, L., Cotgreave, I.A., Sies, H., 1998. Protection against organotellurium compounds against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration reactions. *Biochem. Pharmacol.* 55, 817–823.
- Comasseto, J.V., Ling, L.W., Petragiani, N., Stefani, H.A., 1997. Vinyl selenides and tellurides: preparation, reactivity and synthetic application. *Synthesis* 4, 373.
- Cunha, L.O.R., Urano, M.E., Chagas, J.R., Almeida, P.C., Bincoletto, C., Tersariol, I.L.S., Comasseto, J.V., 2005. Tellurium-based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium (IV) compounds as inhibitors of human Cathepsin B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 755–760.
- Emanelli, T., Pagel, F.W., Alves, L.B., Regner, A., Souza, D.O., 2001. Inhibition of adenylate cyclase activity by 5-aminolevulinic acid in rat and human brain. *Neurochem. Int.* 38, 213–218.
- Engman, L., Stern, D., Cotgreave, I., Andersson, C.M., 1992. Thiol peroxidase activity of diaryl ditellurides as determined by a ¹H NMR method. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 9737–9743.
- Engman, L., Persson, J., Vessman, K., Ekström, M., Berglund, M., Andersson, C.-M., 1995. Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 441–452.
- Fairhill, L.T., 1969. Tellurium. In: *Industrial Toxicology*. Hafner Publishing Co., New York, p. 120.
- Goodrum, J.F., 1998. Role of organotellurium species in tellurium neuropathy. *Neurochem. Res.* 10, 1313–1319.
- Grissom, J.W., Gunawardena, G.U., Klingberg, D., Huang, D., 1996. The chemistry of enediyne, enyne allenes and related compounds. *Tetrahedron* 52, 6453–6518.
- Jaffe, E.K., 1995. Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 169–179.
- Laden, B.P., Porter, T.D., 2001. Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal thiols. *J. Lipid Res.* 42, 235–240.
- Larner, A.J., 1995. Biological effects of tellurium: a review. *Trace Elem. Elect.* 12, 26–31.
- Maciel, E.N., Bolzan, R.C., Braga, A.L., Rocha, J.B.T., 2000. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney and brain of mice. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14, 310–319.
- Meotti, F.C., Borges, V.C., Zeni, J.B.T., Nogueira, C.W., 2003. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and selen for rats and mice. *Toxicol. Lett.* 143, 9–16.
- Nogueira, C.W., Borges, V.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003. Organochalcogens effects on 8-aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. *Toxicology* 191, 169–178.
- Nogueira, C.W., Rotta, L.N., Perry, M.L., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Res.* 906, 157–163.
- Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* 104, 6255–6285.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Petragiani, N., 1994. In: Katrizky, A.R., Meth-Cohn, O., Rees, C.W. (Eds.), *Tellurium in Organic Synthesis*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 89–242.
- Rao, A.S., Freerman, A.J., Jarvis, W.D., Chelliah, J., Bear, H.D., Mikkelsen, R., Grant, S., 1996. Effect of AS101 on bryostatin 1-mediated differentiation induction, cell arrest, and modulation of drug-induced apoptosis in human myeloid leukemia in cells. *Leukemia* 10, 1150–1158.
- Ren, X., Xue, Y., Zhang, K., Liu, J., Luo, G., Zheng, J., Mu, Y., Shen, J., 2001. A novel dicyclocloxy ditelluride compound with antioxidant activity. *HEBS Lett.* 507, 377–380.
- Rossato, J.I., Ketzler, L.A., Centurion, F.B., Silva, S.J.N., Zeni, G., Braga, A.L., Rubin, M.A., Rocha, J.B.T., 2002. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem. Res.* 3.
- Sailer, B.L., Liles, N., Dickerson, S., Summers, S., Chasteen, T.G., 2004. Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. *Toxicol. In Vitro* 18, 475–482.
- Sailer, B.L., Liles, N., Dickerson, S., Chasteen, T.G., 2003. Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line. *Arch. Toxicol.* 77, 30–36.
- Santos, F.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Weiss, S.N., Fachineto, J., Favero, A.F., Nogueira, C.W., 2005. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage of mice tissues. *Chem. Biol. Interact.* 151, 159–165.
- Sassa, S., 1982. Delta aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28, 133–145.
- Soares, F.A., Farina, Boettcher, A.C., Braga, A.L., Rocha, J.B.T., 2005. Organic and inorganic forms of selenium inhibited differently fish (*Rhamdia quelen*) and rats (*Rattus norvegicus*) delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Environ. Res.* 98, 46–54.
- Sredni, B., Caspi, R.R., Klein, A., Kalechman, Y., Danziger, Y., Ben Ya'akov, M., Tamari, T., Shalit, F., Albeck, M., 1987. A new immunomodulating compound (AS-101) with potential therapeutic industrial application. *Nature* 330, 173–176.
- Toews, A.D., Eckermann, M.D., Roberson, S.Y., Lee, S.Y., Morell, P., 1991. Primary demyelination induced by exposure to tellurium alters mRNA levels for nerve growth factor receptor, SCIP, 2'-3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, and myelin proteolipid in rat sciatic nerve. *Mol. Brain Res.* 11, 321–325.
- Wieslander, E., Engman, L., Svensjö, E., Erlansson, M., Johansson, U., Linden, M., Andersson, C.-M., Brattsand, R., 1998. Antioxidative properties of organotellurium compounds in cell system. *Biochem. Pharmacol.* 55, 573–584.
- Wöhler, F., 1840. *Ann. Chem.* 35, 111.
- Zeni, G., Braga, A.L., Stefani, H.A., 2003. Palladium-catalyzed coupling of sp²-hybridized tellurides. *Acc. Chem. Res.* 36, 731–738.

**III.2. UM ESTUDO BIOQUÍMICO E TOXICOLÓGICO COM O DIETIL-
2-FENIL-2-TELUROFENIL VINILFOSFONATO NUM TRATAMENTO
INTRAPERITONEAL SUBCRÔNICO EM CAMUNDONGOS.**

Artigo 2

**A BIOCHEMICAL AND TOXICOLOGICAL STUDY WITH DIETHYL 2-
PHENYL- 2 TELLUROPHENYL VINYLPHOSPHONATE IN A SUB
CHRONIC INTRAPERITONEAL TREATMENT IN MICE.**

AVILA, D.S., GUBERT, P., DALLA CORTE, C.L., ALVES, D.,
NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B.T ,SOARES, F.A.A.

Submetido à Life Sciences

A biochemical and toxicological study with diethyl 2- phenyl- 2 tellurophenyl vinylphosphonate in a sub-chronic intraperitoneal treatment in mice.

Daiana Silva de Ávila, Priscila Gubert, Cristiane Lenz Dalla Corte, Diego da Silva Alves,
Cristina Wayne Nogueira, João Batista Teixeira Rocha, Félix Alexandre Antunes
Soares* .

***Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade
Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil***

*Corresponding author:

Félix A. A. Soares

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade
Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

CEP 97105-900

fax: +55 55 3220 8031

phone: + 55 55 3220 8140

e-mail: felix_antunes_soares@yahoo.com.br

Abstract

Diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate (DPTVP) is an organotellurium compound with low toxicity after subcutaneous administration in mice. This study evaluated possible in vivo and ex vivo toxicological effects of daily injections of DPTVP for 12 days in mice, using the intraperitoneal administration. This route potentially increases the pharmacokinetics of absorption, distribution, metabolism and toxicity of DPTVP. Treatment with DPTVP (0, 30, 50, 75, 100, 250, 350 or 500 $\mu\text{mol/Kg}$) were not associated with mortality or body weight loss. Nevertheless, the liver and liver-to-body weight ratio increased in groups treated with 350 and 500 $\mu\text{mol/Kg}$ of DPTVP. However, plasmatic aspartate and alanine aminotransferase activities (classical markers of hepatotoxicity) were not increased after diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate administration. Hepatic, renal and cerebral thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), δ -ALA-D activity and Vitamin C levels were not modified after DPTVP treatment. Renal and hepatic superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were unchanged after DPTVP treatment. Conversely, SOD activity significantly increased in brain in groups treated with 50, 75, 100 and 500 $\mu\text{mol/kg}$ of DPTVP treated groups. Our findings corroborates that brain is a potential target for organochalcogen action. The absence of severe overt signs of toxicity after subchronic exposure to DPTVP reinforces the necessity for more detailed pharmacological studies concerning this new organotellurium compound.

Key words: tellurium, toxicity, mice, intraperitoneal injections, antioxidant enzymes, toxicity biomarkers.

Introduction

Despite the growing use of organotellurium compounds in the chemical and biochemical fields, there has been little concern about their toxicity. In fact, these compounds have been shown as promising and useful alternatives for numerous synthetic operations in organic synthesis, especially vinylic tellurides (Petraghani, 1994; Zeni et al., 2003 and 2006; Comasseto et al., 1997). Consequently, it is important to advance our understanding about their toxicological properties.

Previous studies have indicated that organotellurium compounds are potentially toxic and lethal to rodents at low doses (Meotti et al., 2003; Savegnago et al., 2006). Indeed, tellurides can cause cytotoxicity (Sailer et al., 2003 and 2004; Iwase et al., 2004; Rooseboom et al., 2002), hepatotoxicity (Meotti et al., 2003), glutamatergic system alterations (Nogueira et al., 2001 and 2002), and teratogenic effects (Stangherlin et al., 2005). In addition, organotellurium compounds can inhibit cysteinyl-containing enzymes, such as Na⁺/K⁺ ATPase (Boges et al., 2005), δ -ALA-D (Maciel et al., 2000; Nogueira et al., 2003; Barbosa et al., 1998) and squalene monooxygenase (Laden and Porter, 2001). Thus, the toxicity of organotellurides can be related to the interaction with thiol groups of important biomolecules (Nogueira et al., 2004), the replacement of selenium in selenoproteins, such as thioredoxin (Engman et al., 2000), and the capacity of the tellurium compounds to induce the formation of reactive oxygen species (Chen et al., 2001).

In spite of this, there has been a considerable interest in organotellurium compounds as potential antioxidants in living systems against several prooxidant agents, such as hydrogen peroxide, peroxyxynitrite, hydroxyl radicals and superoxide

radical anion (Ren et al., 2001; Wieslander et al., 1998; Engman et al., 1995; Briviba et al., 1998; Kanski et al., 2001; Jacob et al., 2000), since these compounds may mimic glutathione peroxidase activity (GPX) (Andersson et al., 1993; Engman et al., 1992, 1994). This property is thought to be due to oxidation of Te from the divalent to the tetravalent state. Besides, tellurides are promising antitumoral drugs and their chemoprotective effects can be related to their cytotoxic properties and to their ability to inhibit important enzymes necessary for the tumor growth. (Rao et al., 1996; Cunha et al., 2005; Engman et al., 2000). These pharmacological properties are much more evident in organotellurium compounds than in selenium or sulfur analogues, making these compounds extremely attractive in medical therapies.

Diethyl 2- phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate (DPTVP) is an asymmetric telluride used as an intermediate of great synthetic potential because it combines the chemical reactivity of vinylic tellurides and vinylic phosphonates (Zeni et al., 2003; Braga et al., 2001). In a previous study, this compound, showed a potent antioxidant activity *in vitro* and an unexpected very low toxicity *in vivo*, when injected subcutaneously (Ávila et al., 2006). The *in vitro* antioxidant activity was similar to that of diphenyl ditelluride, which is much more toxic than DPTVP.

Considering the low *in vivo* toxicity exhibited by DPTVP in s.c. protocol (Ávila et al., 2006), we were encouraged to investigate its possible toxicological/ pharmacological effects using a different via of administration (intraperitoneal). Considering our intend we exposed rodents to DPTVP in a sub-chronic treatment and we evaluated biochemical and toxicological parameters, such as the level of lipid peroxidation, δ - ALA-D activity,

antioxidant system (catalase and superoxide dismutase activity and vitamin C), the levels of glutathione (GSH) and hepatic damage (AST and ALT).

Materials and Methods:

Chemicals

DPTVP (Figure 1) synthesis was performed by addition of alkynylphosphonates to a solution of sodium organyl tellurolate, prepared by the reduction of diorganyl ditellurides with sodium borohydride in ethanol at room temperature (Braga et al., 2000).

Animals

Adult mice from our own breeding colony were maintained in an air conditioned room (20–25°C) under natural lighting conditions with water and food (Guabi-RS, Brasil) ad libitum. All experiments were conducted in accordance with the Guiding Principles for the Use of Animals in Toxicology, adopted by the Society of Toxicology in July 1989.

Animal's treatment

Mice were divided into eight groups and daily weighted and treated for 12 days with diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate 0 (canola oil), 30, 50, 75, 100, 250, 350 and 500 $\mu\text{mol/Kg}$) intraperitoneally (i.p.- 10 mL/Kg). After the 12th day, animals were anesthetized to the collection of blood via heart puncture and killed by decapitation.

Tissue preparation

Brain, liver and kidney were removed, weighted, homogenized (1:7, 1:10, 1:7, respectively) in Tris-HCl 10mM buffer, pH 7.4 and centrifuged at 4000X g for 10 minutes at 4°C. The low speed supernatant fraction obtained (S1) was maintained in ice-cold for the assays. Separately, small quantities of brain, liver and kidney were separated to perform GSH/GSSG levels determination.

Ex vivo assays

Lipid Peroxidation

Lipoperoxidation in liver, kidney and brain S1 was assessed by the measurement of thiobarbituric reactive substances (TBARS, Ohkawa et al. 1979). TBARS were determined spectrophotometrically at 532nm after one hour of incubation with SDS 8.1%, Acetic acid/ HCl buffer and thiobarbituric acid 0.6% at 95°C , using Malondialdehyde as standard.

δ- ALA- D activity

Mice δ-ALA-D activity was assayed according to the method of Sassa (1982), by measuring the rate of product (porphobilinogen, PBG) formation, except that 84 mM potassium phosphate buffer, pH 6.4, and 2.5 mM ALA were used. All experiments were carried out after a 15 min preincubation of S1 with the medium, starting the reaction by adding the substrate, aminolevulinic acid. Incubation was carried out for 1, 2 and 3 hs for liver, kidney and brain, respectively, at 37°C. The reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm, with a molar absorption coefficient of $6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for the Ehrlich-porphobilinogen salt. The reactions rates were linear with respect to time of incubation and added protein for all the experimental conditions. Simultaneously, a set of tubes was assayed in the presence of 8 mM DTT to observe the possible reversion of the δ-ALA-D inhibition.

Vitamin C levels determination

S1 of liver, kidney and brain were precipitated with Trichloroacetic acid 10% and centrifuged at 4000Xg. The supernatant was used according to Jacques-Silva et al. (2001) and the ascorbic acid levels were measured spectrophotometrically at 520 nm.

GSH and GSSG levels

Reduced and oxidized glutathione was determined fluorimetrically according to the method described by Hissin and Hilf (1976).

Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD was determined in S1 of liver, brain and kidney according to the methodology of Misra and Fridowich (1972). The adrenochrome production was measured spectrophotometrically at 480 nm. One unit of the enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of adrenaline auto-oxidation by 50%.

Catalase activity

Catalase activity was assessed according to Aebi et al. (1984) in S1 of liver, kidney and brain, measuring the rate of disappearance of H₂O₂ spectrophotometrically at 240nm. One unit of the enzyme is considered as the amount of enzyme which decomposes 1 μmol H₂O₂/min at pH 7.

Hepatic damage

Plasmatic aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were quantified as biochemical endpoints of hepatotoxicity using commercial kit (LABTEST, Diagnostica S.A., Minas Gerais, BR).

Statistical Analysis

Statistical significance was assessed by one-way ANOVA, followed by Duncan test for post hoc comparison. Results were considered statistically significant at values of $p < 0.05$.

Results

Body and organ weight

The body weight of the animals treated with diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate was not affected after twelve days of treatment when compared with control animals. The weight of brain and kidney of treated animals did not differ between the groups. However, the liver weight of animals that received 350 and 500 μ mol/Kg were significantly higher than the liver weight in the others groups (data not shown). In accordance, the body weight/liver weight ratio (g/g) was higher in these groups ($p < 0.05$, table 1).

TBARS formation

Hepatic (Figure 2A), renal (Figure 2B) and cerebral (Figure 2C) TBARS levels were not changed in groups treated with diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate, when compared to control group.

δ -ALA-D activity

Hepatic (Figure 3A), renal (Figure 3B) and cerebral (Figure 3C) δ -ALA-D activity determined in the presence or absence of DTT was not affected by the sub-chronic treatment with diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate. DTT (8mM) was used in order to reverse a possible inhibition of the enzyme, in case of oxidation of thiol groups. The high values of porphobilinogen obtained in δ -ALA-D assays using DTT in kidney and brain could be explained by the ability of DTT to restore the –SH groups in

the catalytic site of the enzyme due to sensitivity of –SH groups to the processes of tissue preparation and incubation.

Vitamin C levels

The levels of vitamin C were not altered by the treatment with the organotellurium compound in liver (Figure 4A), kidney (Figure 4B) or in brain (Figure 4C).

GSH/GSSH ratio

To better express the measurements of GSH and GSSH, we calculated the ratio between reduced and oxidized glutathione. In brain, we did not observe any change in this ratio (Figure 5C), however in liver (Figure 5A) and kidney (Figure 5B) no statistically significant difference were detected.

SOD activity

Superoxide dismutase activity was not altered in liver (Figure 6A) and kidney (Figure 6B). In brain, SOD was significantly increased in groups treated with 50, 75, 100 and 500 $\mu\text{mol/kg}$ of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate in relation to control (Figure 6C, $p < 0.05$).

Catalase activity

Catalase activity was not changed in liver (Figure 7A) and kidney (Figure 7B), however in brain there was a small tendency to an increase in the enzyme activity, but this was not statistically significant (Figure 7C).

Transaminases activities

AST and ALT plasmatic activities were not increased after exposure to different doses of diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate, indicating that hepatic damage was not detected (Table 2).

Discussion

In this paper, we confirm and extended the low toxicity of the DPTVP *in vivo* and *ex vivo*, using now the intraperitoneal route of administration. It is well-known that when the subcutaneous administration is used, the drug is slowly and continuously absorbed in the region near the local of the injection. After *i.p.* administration, the drug is rapidly absorbed by the peritoneal blood circulation (Goodman and Gilman, 2003). This type of administration potentially makes the action of the compound more pronounced, especially as a toxicant.

In fact, the body weight of the animals did not change along the treatment, but treatment with 350 and 500 $\mu\text{mol/Kg}$ of DPTVP cause an increase in liver weights after 12 days of treatment. In view of the fact that tellurium compounds are metabolized in liver (Amdur, 1947), this may indicates that the high concentration of the compound in hepatocytes caused an increase in the function of oxidase system that was accompanied by an enlargement of the liver, partially due to the lipid accumulation and the increase in endoplasmic reticulum (Tani et al., 1981).

In order to determine if DPTVP could cause hepatic damage, we measured plasmatic activities of AST and ALT. These transaminases are located in different subcellular spaces in hepatocytes, and they are typically released into the blood after exposure to hepatotoxic chemical agents (Gabriel et al., 2005). In our study, AST and ALT did not increased in the plasma of treated animals. These findings indicate that the increase in liver weight detected at the highest doses used are not associated with severe hepatic damage.

δ - aminolevulinatase dehydratase is an important biomarker of toxicity for many xenobiotics because of potential sites of inhibition, including chemical modification of the lysine residue (Reitman and Frankel, 1957) or cysteinil residues (Barbosa et al., 1998; Jaffe et al., 1995; Farina et al., 2001 and 2002; Nogueira et al., 2003) and release of the prosthetic Zn^{+2} (Emanuelli et al., 1998; Vieira et al., 2000). Particularly, organotellurium compounds may interact with the thiol groups of this enzyme, oxidizing two SH groups of the active site, changing the configuration of the enzyme and impairing its activity. Hipotetically, the inhibition of δ - ALA-D could result in accumulation of its substrate, aminolevulinic acid, which could generate pro-oxidant effects (Bechara et al., 1993; Emanuelli et al., 2001). In addition, δ - ALA-D is involved in the heme synthesis, and its inhibition may be associated with haemoglobin, cytochromes and catalase synthesis decrease. Indeed, in vitro DPTVP inhibits hepatic, renal and cerebral δ - ALA-D probably by oxidation of SH groups (Ávila et al., 2006). However, here we reported that in vivo δ - ALA-D seems not to be a molecular target to DPTVP. This is an important find, supporting the low toxicity of the parent tellurium compound and its potential metabolites, because here we used high doses and i.p. administration. Moreover, other organotellurides and organoselenides inhibit this enzyme after in vivo exposure (Jacques-Silva et al., 2001; Maciel et al., 2000; Savegnago et al., 2006)

The antioxidant system was not significantly altered by the i.p. sub-chronic administration of diethyl 2- phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate. One of the toxic mechanisms of organotellurium compounds is their ability to generate some oxidizing radicals agents (Chen at al., 2001), but in this study the lipid peroxidation was not increased by the organotellurium compound. Furthermore, vitamin C, levels, a non-

enzymatic antioxidant defense (Tsao et al., 1989), was not modified by organotellurium treatment. In addition, the sub-chronic treatment did not significantly altered GSH, which plays a central role in the endogenous antioxidant defense (Nogueira et al., 2004).

In the same vein, renal and hepatic catalase and SOD activities were not modified after treatment with DPTVP in contrast, SOD was increased and catalase activity tended to be increase in brain homogenates after exposure to 75 and 100 $\mu\text{mol/kg}$ of DPTVP. This indicates that this compound across the blood-brain barrier, which is in accordance with its high lipophilicity and the effects depicted by other organotellurium compounds in the central nervous system (Maciel et al., 2000; Nogueira et al., 2001, 2004; Jacques-Silva et al., 2001). At the moment, it is not clear whether this effect of DPTVP is related to some neurotoxic effect or whether it can be considered a desirable effect and represents an improvement in the antioxidant system caused by the compound.

In general, the data showed in this paper confirm the very low toxicity of DPTVP in liver, kidney and brain. It is important to note that the structure of this molecule is very different from the ditellurides and tellurides already studied and reported in the literature. It is known that ditellurides are more reactivities than tellurides because of the weak Te-Te bound when compared to the Te-Carbon bound (Petraghani, 1994), and this probably is the main reason to many different effects found in vivo for DPTVP when compared to diphenyl ditelluride, once the biotransformation process seem to be important to the actions of these compounds in vivo.

In a recent study, Savegnago et al., 2006 described another vinylic telluride, 1-buthyltelurenyl-2-methylthioheptene, which also possess potent antioxidant activity in vitro, but it reduced the body weight of treated animals since the dose of $0.5\mu\text{mol/Kg}$,

and all animals injected with 100 and 200 $\mu\text{mol/Kg}$ died after 72 hs of oral administration. This compound shares similar chemical characteristics of DPTVP, however contains sulfur atom in its structure, and instead phenyl group, it has a buthyl radical bind to tellurium atom, which probably modifies the reactivity of the metabolite. In addition, DPTVP showed an antioxidant activity, that was demonstrated in vitro using iron as a pro-oxidant agent in liver, kidney and brain homogenates and DPTVP decreased the TBARS production at very low concentrations, in almost equal levels than diphenyl ditelluride, a well recognized organotellurium compound with a very good antioxidant capacity (Nogueira et al., 2004; Ávila et al., 2006). Further investigations about possible pharmacological applications of DPTVP and other vinylic tellurides are necessary, since this organotellurium compound seems to be a promising molecule that posses a high antioxidant activity, can be easily synthesized and has low toxicity.

Acknowledgements

We are grateful to Prof Gilson Zeni and his students to provide the organotellurium compound. We are thankful to the financial support from CNPq, UFSM, FAPERGS, and CAPES.

References

- Aebi, H. Catalase "in vitro", 1984. *Methods Enzymology*. 105, 121-127.
- Amdur, M.L., 1947. Tellurium: accidental exposure and treatment with BAL in oil. *Occupational Medicine* 3, 386-391.
- Andersson, C-M., Hallberg, A., Brattsand, R., Cotgrave, I.A., Engman, L., Persson, J., 1993. Glutathione peroxidase-like activity of diaryl tellurides. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 3, 2553–2558.
- Ávila, D.S., Beque, M.C., Folmer, V., Braga, A.L., Zeni, G., Nogueira, C.W., Soares, F.A.A., Rocha, J.B.T., 2006. Diethyl 2- phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate: an organotellurium compound with low toxicity. *Toxicology* 224, 100-107.
- Barbosa, N.B.V., Rocha, J.B.T., Zeni, G., Emanuelli, T., Beque, M.C., Braga, A. L., 1998. Effect of organic forms of Selenium on delta-aminolevulinatase from liver, kidney and brain of adult rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 149, 243-253.
- Bechara, E.J.H., Medeiros, M.H.G., Monteiro, H.P., Hermes-Lima, M., Pereira, B., Demasi, M., Costa, C.A., Adballa, D.S.P., Onuki, J., Wendel, C.M.A., Masci, P.D., 1993. A free radical hypothesis of lead poisoning and in Born porphyrias associated with 5-aminolevulinic overload. *Quimica Nova* 16, 385-392.
- Borges, V.C., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na⁺, K⁺ ATPase activity in rats. *Toxicology* 215,191-197.

Braga, A.L., Alves, E.F., Silveira, C.C., Andrade, L.H., 2000. Stereoselective addition of sodium organyl chalcogenolates to alkynylphosphonates: synthesis of diethyl 2-(organyl)-2-(organochalcogenyl)vinylphosphonates. *Tetrahedron Letters* 41,161-163.

Braga, A.L., Leandro, H.L., Silveira, C.C., Moro, A.V., Zeni, G., 2001. Stereospecific formation of enynephosphonates via Palladium- catalyzed cross-coupling reaction of beta- organotelluro vinylphosphonates with alkynes. *Tetrahedron Letters* 42, 8563-8565.

Briviba, K., Tamler, R., Klotz, L-O., Engman, L., Cotgreave, I.A., Sies, H., 1998. Protection against organotellurium compounds against peroxynitrite- mediated oxidation and nitration reactions. *Biochemical Pharmacology* 55, 817-823.

Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L., 2003. In: Goodman and Gilman: The pharmacological basis of therapeutics. 10th edition, Mc Graw-Hill Editor (Chapter 1).

Chen, F., Vallyathan, V., Castranova, V., Shi, X., 2001. Cell apoptosis induced carcinogenic metals. *Molecular and Cellular Biochemistry* 221, 183-188.

Comasseto, J.V., Ling, L.W., Petraghani, N., Stefani, H.A., 1997. Vinylic selenides and tellurides-Preparation, reactivity an synthetic application. *Synthesis* 4, 373-376.

Cunha, L.O.R., Urano, M.E., Chagas, J.R., Almeida, P.C., Bincoletto, C., Tersariol, I.L.S., Comasseto, J.V., 2005. Tellurium- based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium (IV) compounds as inhibitors of human Cathepsin B. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 15, 755-760.

Emanuelli, T., Pagel, F.W., Alves, L.B., Regner, A., Souza, D.O., 2001. Inhibition of adenylate cyclase activity by 5- aminolevulinic acid in rat and human brain, *Neurochemistry International* 38, 213-218.

Emanuelli, T., Rocha, J.B.T., Pereira, M.E., Nascimento, P.C., Beber, F.A., Souza, D.O., 1998. Delta-aminolevulinate dehydratase inhibition by 2,3 dimercaptopropanol is mediated by chelation of zinc from a site involved in maintaining cysteinyl residues in a reduced state. *Pharmacology and Toxicology* 83, 95–103.

Engman, L., Kanda, T., Gallegos, A., Williams, R., Powis, G., 2000. Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. *Anti Cancer Drug Design* 15, 323-330.

Engman, L., Person, J., Vessman, K., Ekstrom, M., Berglund, M., Andersson, C-M., 1995. Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. *Free Radical Biology Medicine* 19, 441-452.

Engman, L., Stern, D., Cotgreave, I., Andersson, CM., 1992. Thiol peroxidase activity of diaryl ditellurides as determined by a ¹H NMR method. *Journal of American Chemistry Society* 114, 9737–9743.

Engman, L., Stern, D., Pelcman, M., 1994. [Thiol peroxidase-activity of diorganyl tellurides](#). *Journal of Organic Chemistry*, 59, 1973-1979.

Farina, M., Barbosa, N.B.V., Nogueira, C.W., Folmer, V., Andrade, L.H., Zeni, G., Bolzan, R.C., Braga, A.L., Rocha, J.B.T., 2002. Reaction of dipheyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of delta-aminolevulinate dehydratase from rat liver and cucumber leaves. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35, 623-631.

Farina, M., Folmer, V., Andrade, L.H., Zeni, G., Bolzan, R.C., Braga, A.L., Rocha, J.B.T., 2001. Selenoxides inhibit aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicology Letters* 119, 27- 37.

Gabriel, D., Pivetta, L., Folmer, V., Soares, J.C.M., Augusti, G.R., Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2005. Human erythrocyte δ - aminolevulinate dehydratase inhibition by monosaccharides is not mediated by oxidation of enzyme sulfhydryl groups. *Cell Biology International* 29, 669-674.

Hissin, P. and Hilf, R., 1976. A Fluorimetric method for determination of oxidized and reduced Glutathione in tissue. *Analytical Biochemistry* 74, 214-226.

Iwase, K., Tatsuishi, T., Nishimura, Y., Yamaguchi, J., Oyama, Y., Miyoshi, N., Wada, M., 2004. Cytometric analysis of adverse action of diphenyl ditelluride on rat thymocytes: cell shrinkage as a cytotoxic parameter. *Environmental Toxicology* 19, 614-619.

Jacob, C., Arteel, G.E., Kanda, T., Engman, L., Sies, H., 2000. Water soluble organotellurium compounds: catalytic protection against peroxynitrite and release of zinc from metallothionein. *Chemical Research Toxicology* 13, 3-9.

Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M.M., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacology and Toxicology* 88,119-125.

Jaffe, E.K., Ali, S., Mitchell, L.W., Taylor, K.M., Volin, M., Markham, G.D., 1995. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of escherichia coli porphobilinogen synthase. *Biochemistry* 34, 244–251.

Kanski, J., Drake, J., Aksenova, M., Engman, L., Butterfield, D.A., 2001. Antioxidant activity of the organotellurium compound 3-[4-(N,N-dimethylamino)benzenetellurenyl]propanesulfonic acid against oxidative stress in synaptosomal membrane systems and neuronal cultures. *Brain Research* 911, 12-21.

Laden, B.P. and Porter, T.D., 2001. Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *Journal of Lipid Research* 42, 235-240.

Maciel, E.N., Bolzan, R.C., Braga, A.L., Rocha, J.B.T., 2000. Diphenyl Diselenide and diphenyl ditelluride affect delta- aminolevulinate dehydratase from liver, kidney and brain of mice. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology* 14, 310-319.

Meotti, F.C., Borges, V.C., Zeni, J.B.T., Nogueira, C.W., 2003. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicology Letters* 143, 9-16.

Misra, H.P. and Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 247, 3170-3175.

Nogueira, C.W., Borges, V.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003. Organochalcogens effects on δ - aminolevulinic dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. *Toxicology* 191, 169-178.

Nogueira, C.W., Rotta, L.N., Perry, M.L., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Research* 906, 157-163.

Nogueira, C.W., Rotta, L.N., Zeni, G., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., 2002. Exposure to Ebselen changes glutamate uptake and release by rat brain synaptosomes. *Neurochemical Research* 27, 283-288.

Nogueira, C.W., Soares, F.A., Nascimento, P.C., Muller, D., Rocha, J.B.T., 2003. 2,3 Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3- dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmiuminduced inhibition of d-aminolevulinate dehydratase. *Toxicology* 84, 85-95.

Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and Pharmacology. *Chemical Reviews* 104, 6255-6285.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351-358.

Petragnani N., 1994. In: *Tellurium in Organic Synthesis*. Academic Press, New York.

Rao, A.S., Freerman, A.J., Jarvis, W.D., Chelliah, J., Bear, H.D., Mikkelsen, R., Grant, S., 1996. Effect of AS101 on bryostatin 1- mediated differentiation induction, cell arrest, and modulation of drug- induced apoptosis in human myeloid leukemia in cells. *Leukemia* 10, 1150-1158.

Reitman, S. and Frankel, S., 1957. A colorimetric method for the determination of serum oxalacetic and pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology* 28,56-63.

Ren, X., Xue, Y., Zhang, K., Liu, J., Luo, G., Zheng, J., Mu, Y., Shen, J., 2001. A novel dicyclodextrinyl ditelluride compound with antioxidant activity. *FEBS Letters* 507, 377-380.

Rooseboom, M., Vermeulen, N.P.E., Durgut, F., Commandeur, J.N.M., 2002. Comparative study on the bioactivation mechanisms and cytotoxicity of Te- Phenyl-L-tellurocysteine, Se-Phenyl-L-selenocysteine and S-Phenyl-L- cysteine. *Chemical Research Toxicology* 15, 1610-1618.

Sailer, B.L., Liles, N., Dickerson, S., Chasteen, T.G., 2003. Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line. *Archives of Toxicology* 77, 30-36.

Sailer, B.L., Liles, N., Dickerson, S., Sumners, S., Chasteen, T.G., 2004. Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium- containing organic analog, *Toxicology in vitro* 18, 475-482.

Sassa, S., 1982. Delta aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28, 133-145.

Savegnago, L., Borges, V.C., Alves, D., Jesse, C., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2006. Evaluation of antioxidant activity and potential toxicity of 1-buthyltelurenyl-2-methylthioheptene. *Life Sciences* 79, 1546-1552.

Stangherlin, E.C., Favero, A.M., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005. Teratogenic vulnerability of wistar rats to diphenyl ditelluride. *Toxicology* 20, 561-568.

Tani, T., Kato, N., Horio, F., Yoshida, A., 1981. Characteristic properties of isolated soy protein in the metabolic changes due to dietary polychlorinated biphenyls. *Nutrition Research* 1, 83–92.

Tsao, C.S., Young, M., 1989. Effects of exogenous ascorbic acid intake on biosynthesis of ascorbic acid in mice. *Life Sciences* 45, 1553-1557.

Vieira, V.L.P., Rocha, J.B.T., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Rodrigues, S.R., Tuerlinckz, M., Bohrer, D., Nascimento, P.C., 2000. Effect of aluminum on d-aminolevulinic acid dehydratase from mouse blood. *Toxicology Letters* 117, 45–52.

Wieslander, E., Engman, L., Svensjo, E., Erlansson, M., Johansson, U., Linden, M., Andersson, C-M., Brattsand, R., 1998. Antioxidative properties of organotellurium compounds in cell system. *Biochemical Pharmacology* 55, 573-584.

Zeni, G., Braga, A.L., Stefani, H.A., 2003. Palladium-catalyzed coupling of sp²-hybridized tellurides. *Accounts in Chemical Research* 36, 731-718.

Zeni, G., Ludtke, D., Panatieri, R.B., Braga, A.L., 2006. Vinylic tellurides: from preparation to their applicability in organic synthesis. *Chemical Reviews* 106, 1032-1076.

Figure Legends:

Figure 1: Chemical structure of diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate.

Figure 2: Effect of diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate on thiobarbituric acid reactive substances formation of mice treated i.p.. Liver (A), kidney (B) and brain (C) were incubated with SDS 8.1%, TBA 0.6% and acetic acid/HCl buffer for 1h at 95°C, and TBARS levels were measured at $\lambda = 520\text{nm}$ Results are expressed as mean \pm SEM for n= 8 animals per group.

Figure 3: δ - ALA-D activity in liver (A), kidney (B) and brain (C) of mice treated with diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate. The assay was performed according in the absence (O) or presence (●) of the dithiol containing reagent, DTT. Results are expressed as mean \pm SEM for n= 8 animals per group.

Figure 4: Vitamin C levels determination of animals treated for 12 days with diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate in liver (A), kidney (B) and brain (C). Samples were previously precipitated with TCA 10% and the incubated during 3h in the presence of 2,4 dinitrophenylhydrazine. The reaction was stopped with H_2SO_4 65% and the colored product was read spectrophotometrically at 520 nm Results are expressed as mean \pm SEM, n=8 per group.

Figure 5: GSH/GSSG ratio in liver (A), kidney (B) and brain (C) of mice treated with diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate. Results are expressed as mean \pm SEM, n=8 per group.

Figure 6: SOD activity of mice treated i.p. with diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate. Liver (A), kidney (B) and brain (C). The enzymic activity was monitored by the decrease of epinephrine oxidation in alkaline pH at 480 nm. Results

are expressed as mean \pm SEM, n=8 per group. (a,b,c) Indicate significant difference between groups, $p < 0.05$ and post- hoc by Duncan test.

Figure 7: Effects of treatment with diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate on catalase activity. Liver (A), kidney (B) and brain (C). Enzyme activity was monitored by the decrease of H_2O_2 at 240 nm. Results are expressed as mean \pm SEM, n=8 per group.

Figure 1

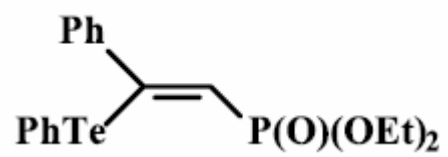


Table 1: Organ weight/body weight ratio (g/g) of animals treated for twelve days with diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate.

Dose ($\mu\text{mol/Kg}$)	LIVER	KIDNEY	BRAIN
0	0.052 \pm 0.003	0.013 \pm 0.001	0.013 \pm 0.001
30	0.054 \pm 0.003	0.013 \pm 0.001	0.015 \pm 0.001
50	0.060 \pm 0.003	0.014 \pm 0.001	0.014 \pm 0.001
75	0.058 \pm 0.003	0.014 \pm 0.001	0.015 \pm 0.001
100	0.052 \pm 0.003	0.014 \pm 0.001	0.015 \pm 0.001
250	0.058 \pm 0.003	0.014 \pm 0.001	0.015 \pm 0.001
350	0.064 \pm 0.004*	0.014 \pm 0.001	0.014 \pm 0.001
500	0.066 \pm 0.003*	0.015 \pm 0.001	0.014 \pm 0.001

Data are expressed as mean \pm S.E.M for eight animals in each group.

* indicates statistically difference from control group ($p < 0.05$, Duncan post hoc test)

Figure 2A

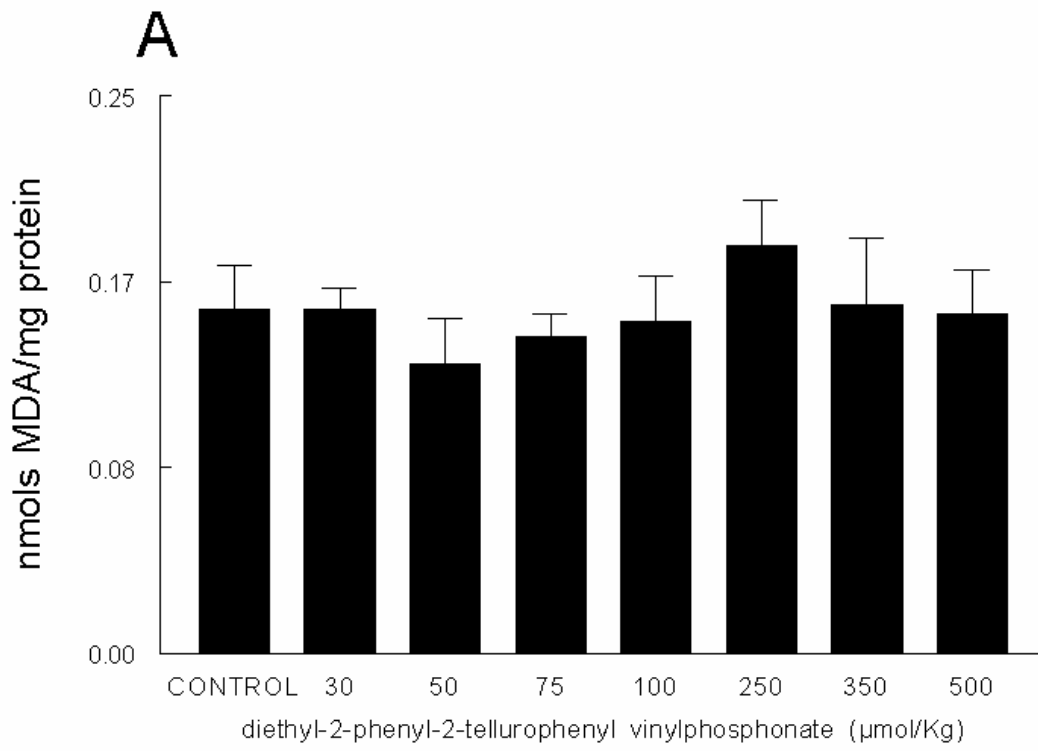


Figure 2B

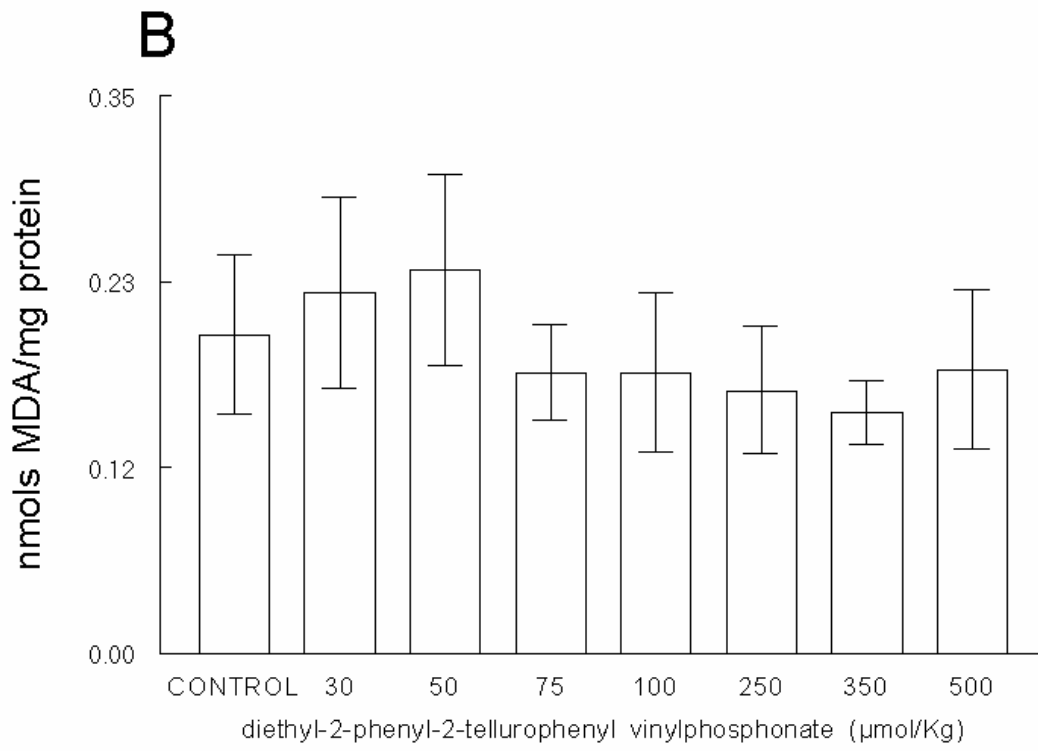


Figure 2C

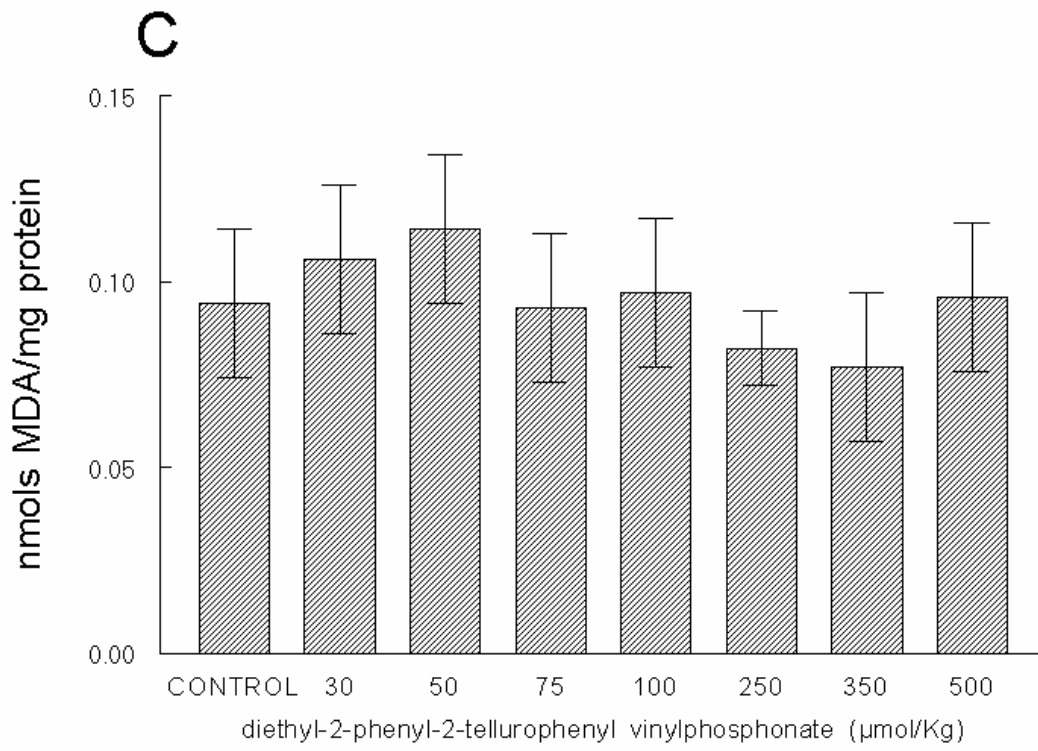


Figure 3A

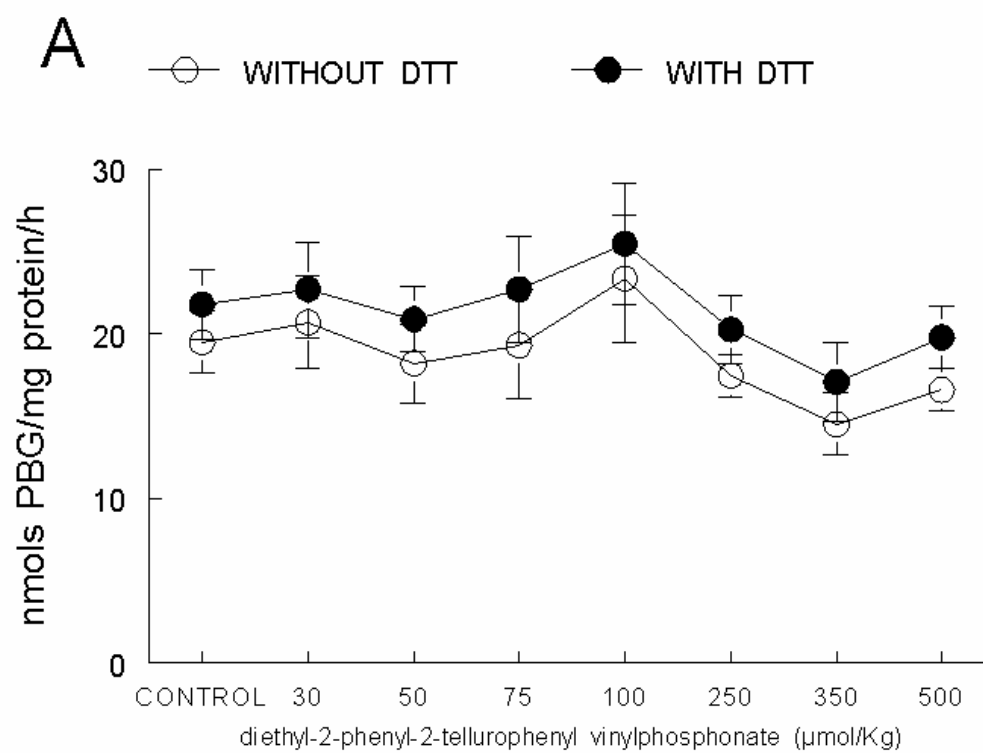


Figure 3B

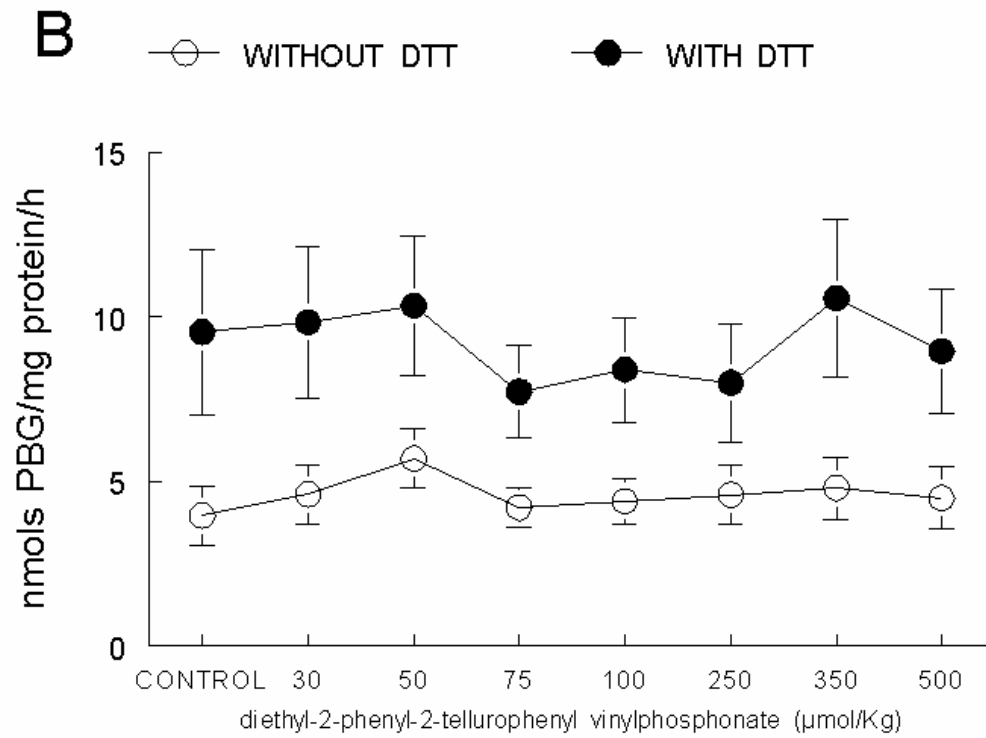


Figure 3C

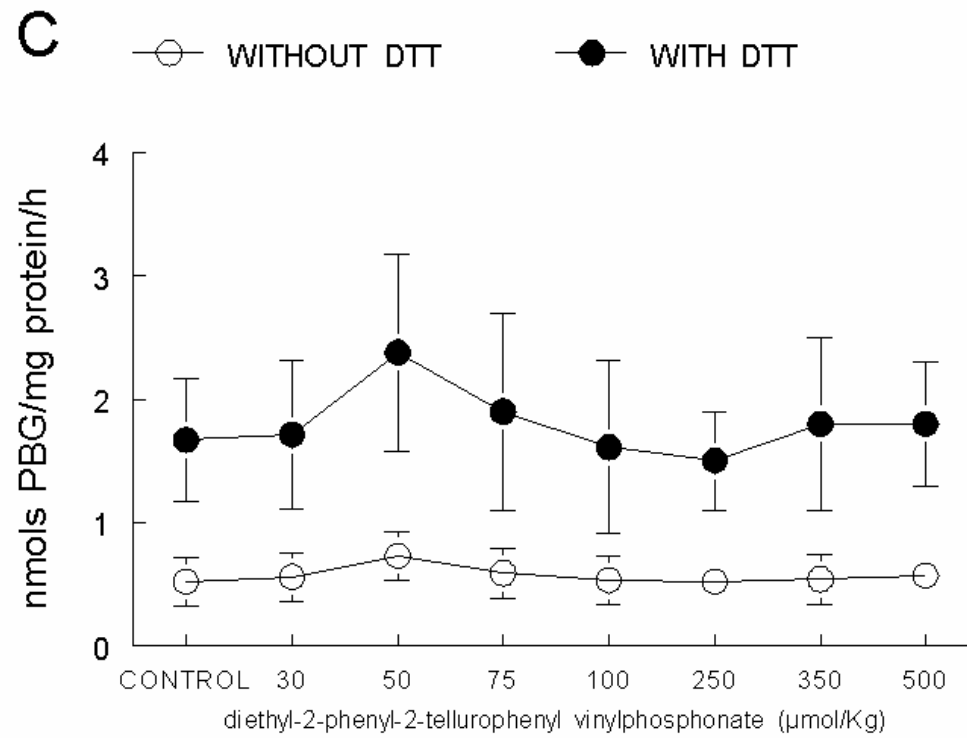


Figure 4A

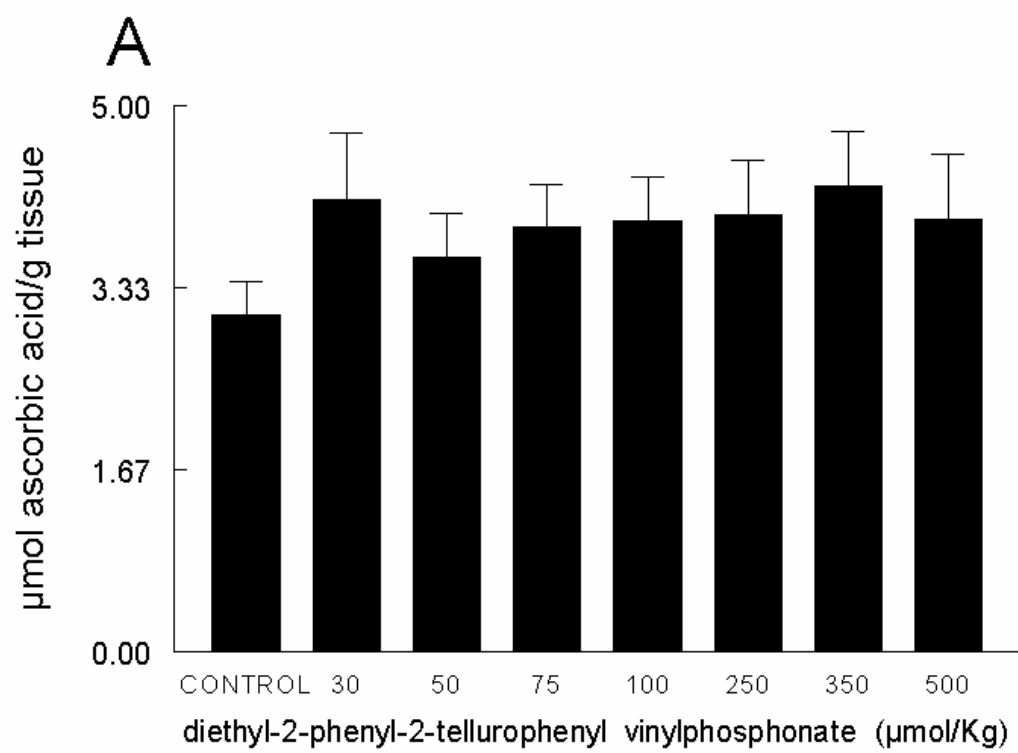


Figure 4B

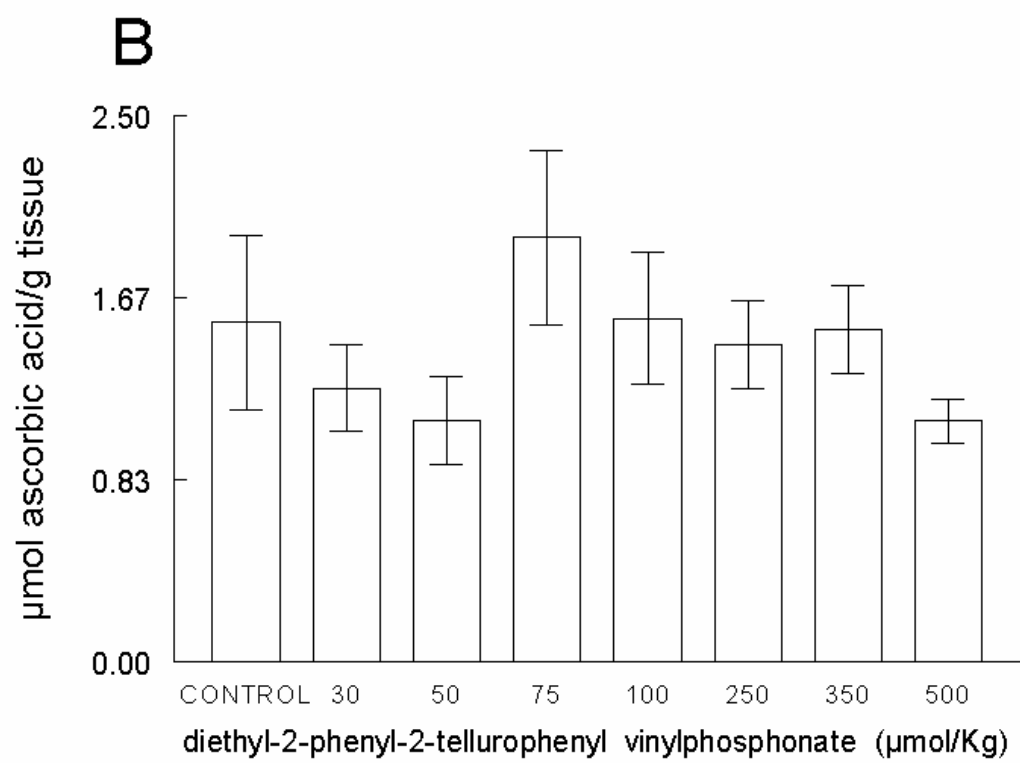


Figure 4C

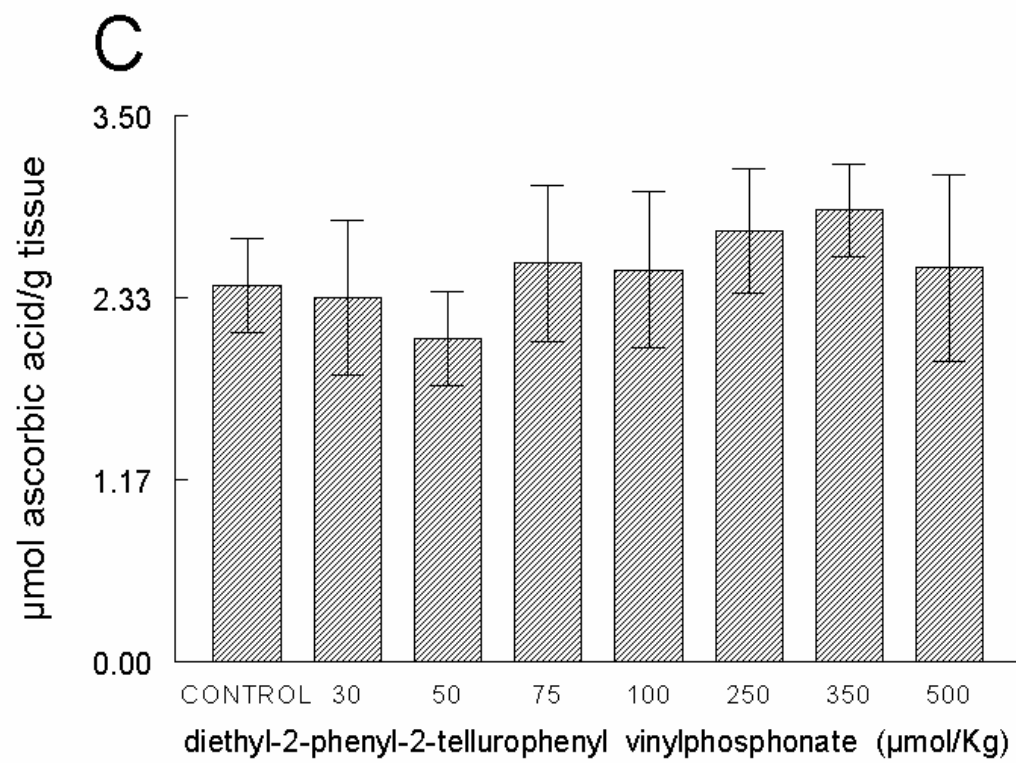


Figure 5A

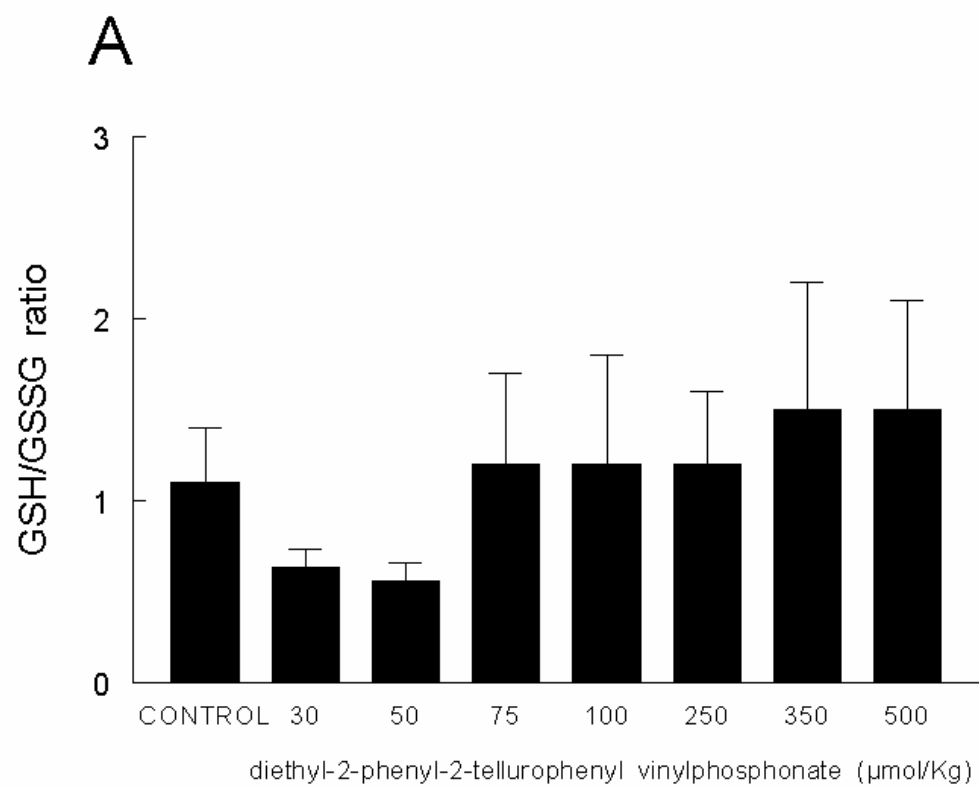


Figure 5B

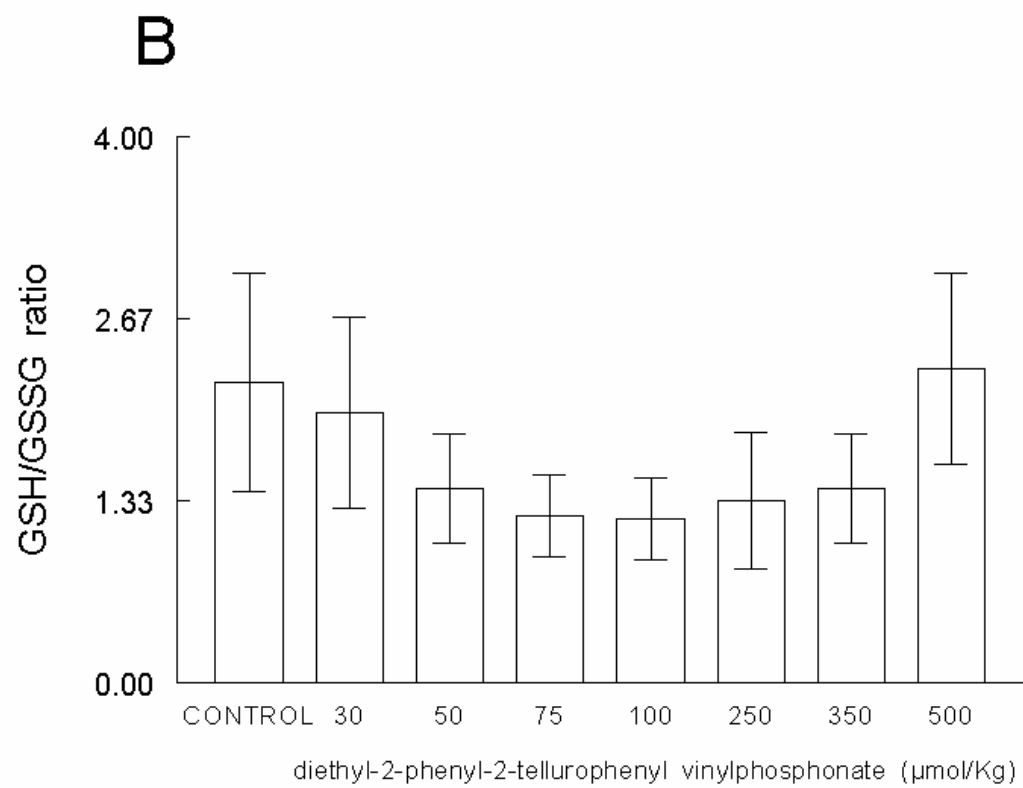


Figure 5C

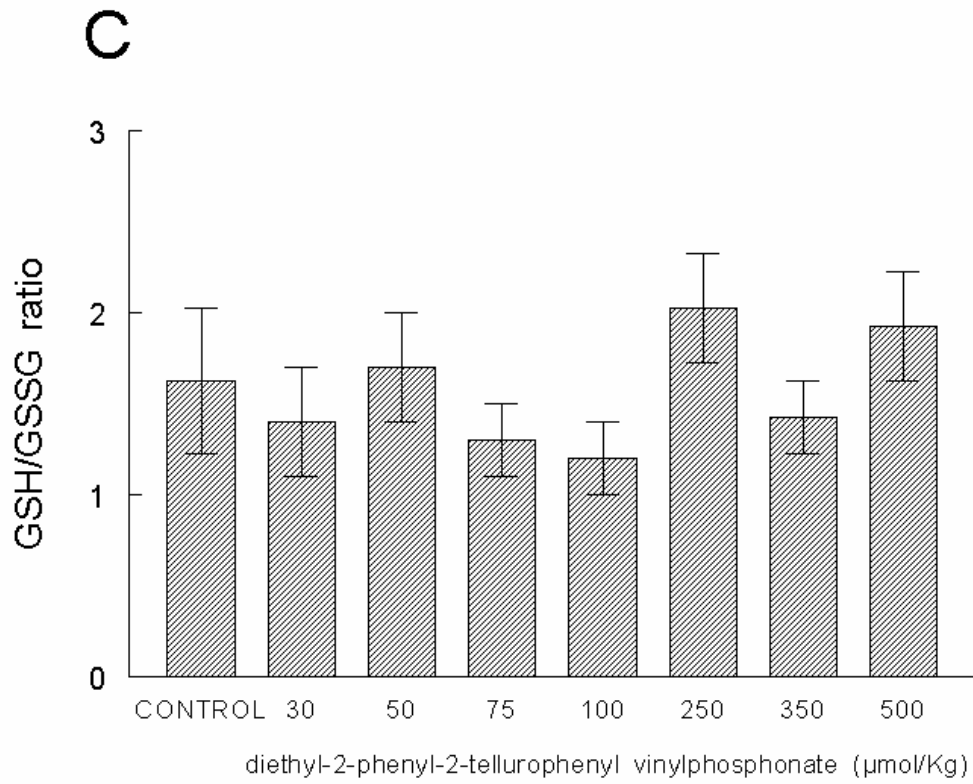


Figure 6A

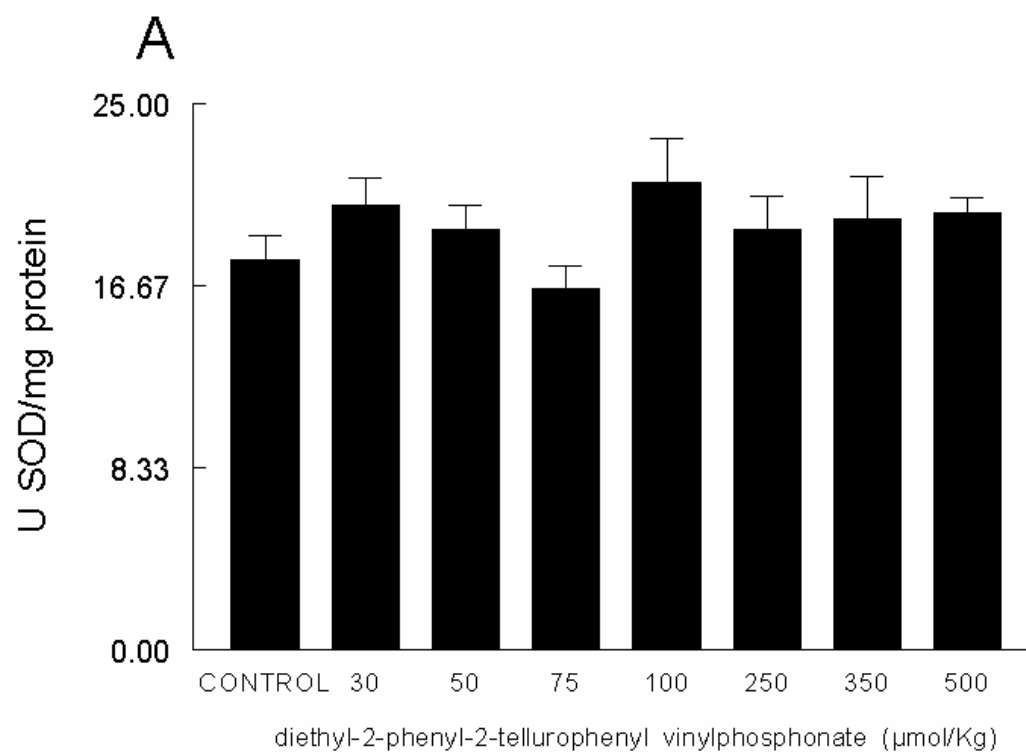


Figure 6B

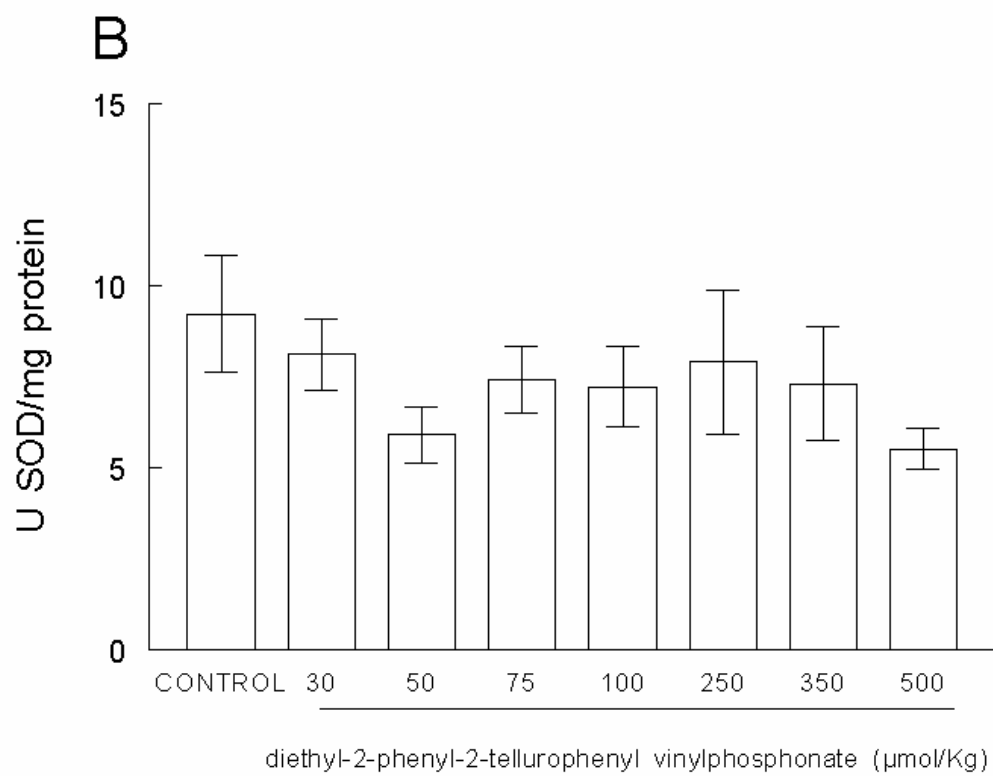


Figure 6C

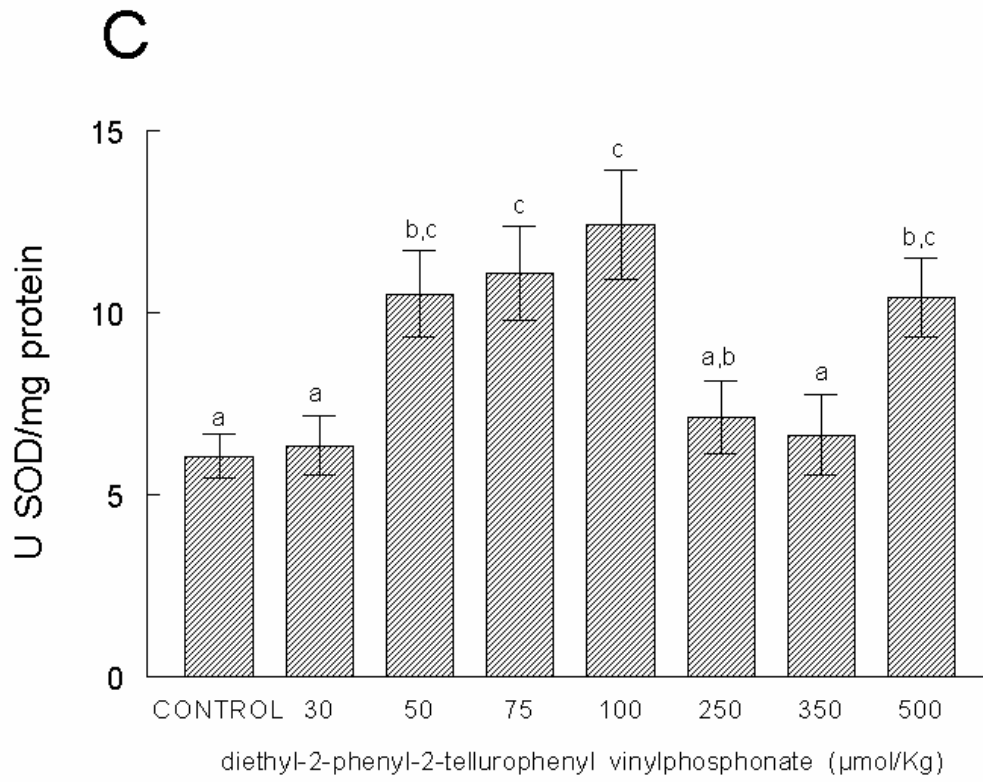


Figure 7A

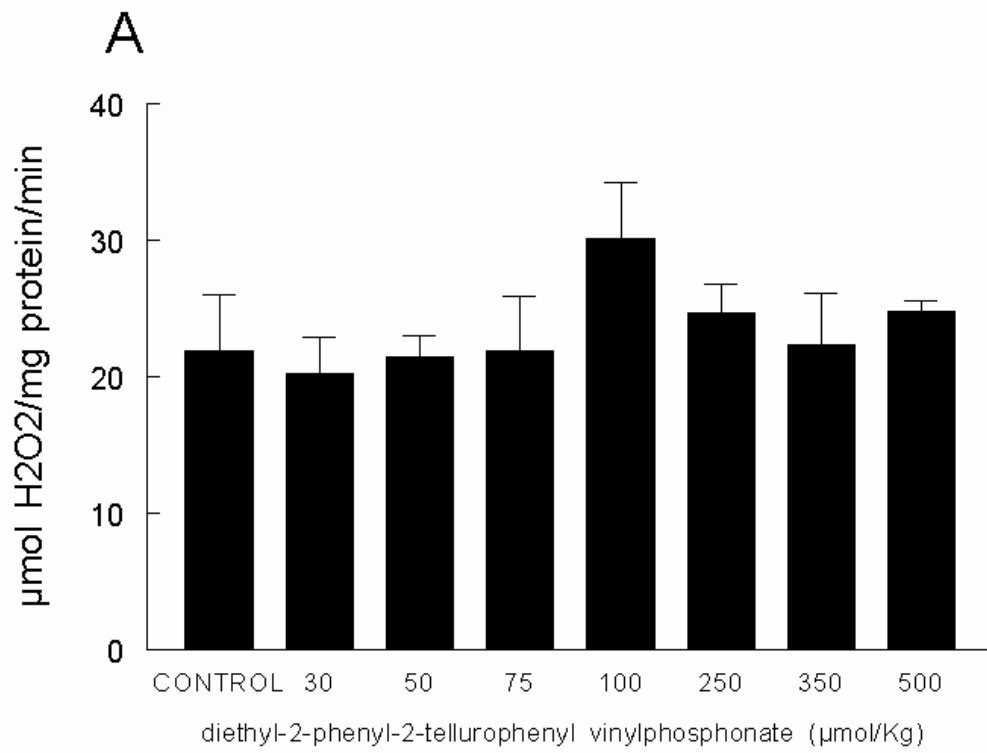


Figure 7B

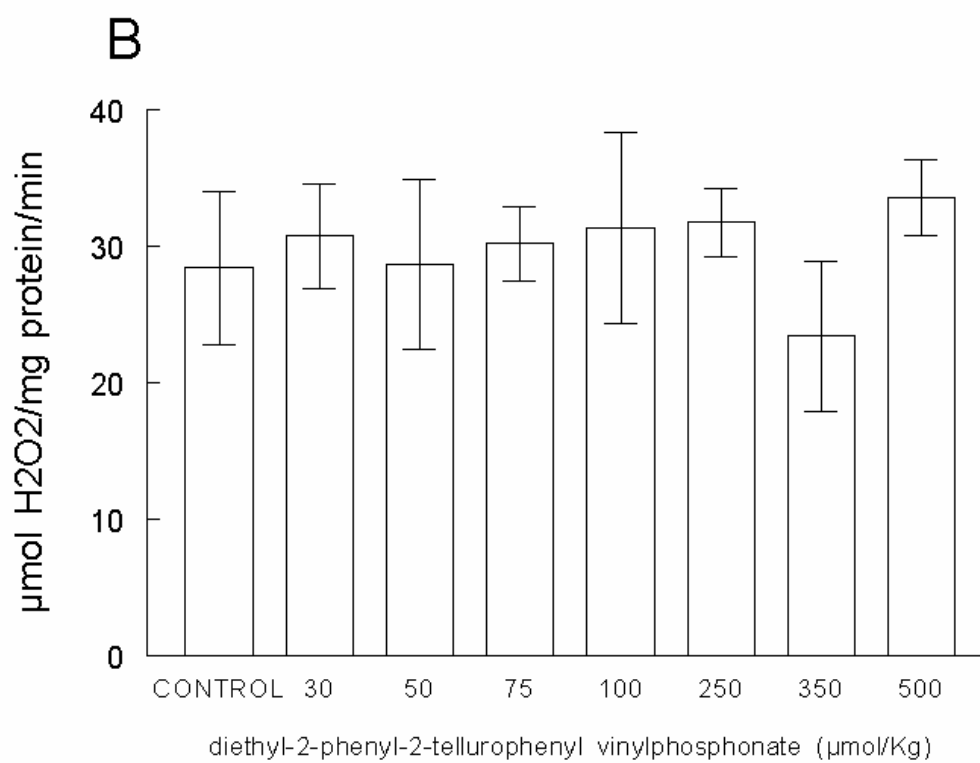


Figure 7C

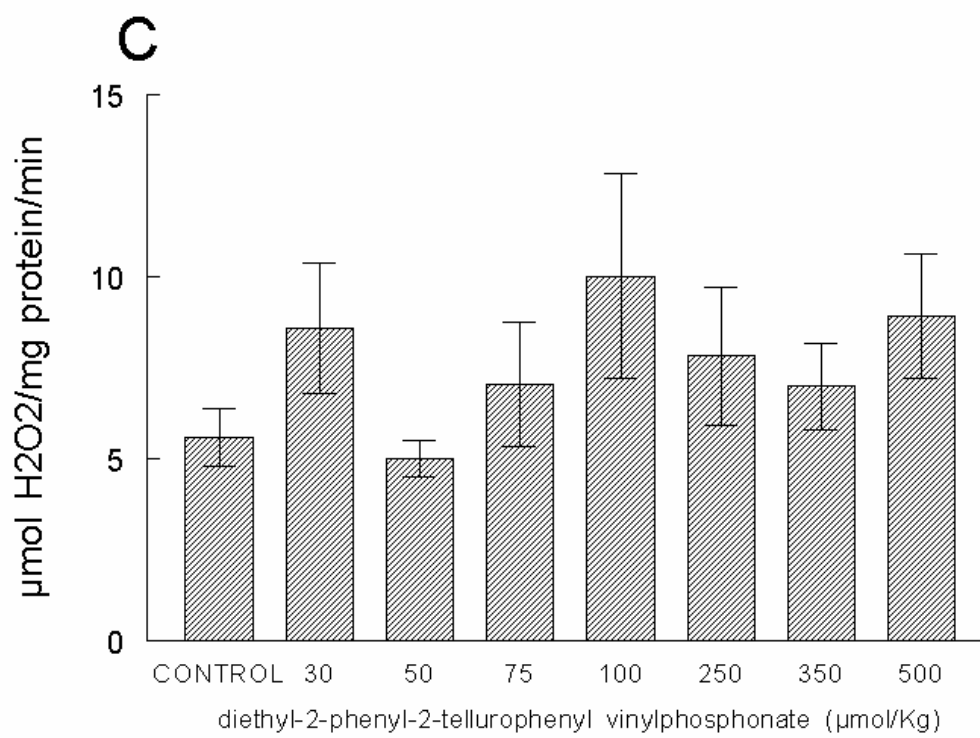


Table 2: Effects of diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate on AST and ALT plasmatic activities.

Dose ($\mu\text{mol/Kg}$)	AST (U/mL)	ALT (U/mL)
0	115.3 \pm 10.7	34.71 \pm 6.4
30	145.09 \pm 9.7	34.08 \pm 5.3
50	151.35 \pm 11.8	37.65 \pm 6.4
75	152.49 \pm 16.0	36.03 \pm 6.6
100	154.08 \pm 14.3	31.03 \pm 5.6
250	141.44 \pm 12.9	40.28 \pm 15.5
350	155.79 \pm 12.9	33.35 \pm 9.1
500	156.37 \pm 15.2	37.52 \pm 7.0

Data are expressed as mean \pm S.E.M for eight animals in each group.

IV. Discussão

Este trabalho demonstrou, pela primeira vez, a baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo* de um composto de telúrio orgânico, o dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato, bem como a sua ação antioxidante *in vitro* em baixas concentrações.

Inicialmente, os resultados *in vitro* demonstraram que o composto pode inibir a δ -ALA-D em cérebro, fígado e rim, indicando que o possível mecanismo de ação poderia incluir a oxidação dos grupamentos -SH à dissulfetos, uma vez que o DTT foi capaz de restaurar a atividade enzimática. Fortalecendo esta possibilidade, o composto também se mostrou capaz de aumentar a taxa de oxidação do DTT. Entretanto, o maior efeito do dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato só foi obtido na presença de relativamente altas concentrações do composto. De fato, estudos prévios utilizando praticamente as mesmas condições deste trabalho, demonstrou que o ditelureto de difenila é capaz de inibir aproximadamente 80% da atividade da δ -ALA-D hepática na concentração de 100 μ M (Barbosa e cols, 1998), enquanto que o dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato não atingiu o mesmo efeito, nem mesmo na maior concentração testada de 1200 μ M.

Além disso, o dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato mostrou-se um potente agente antioxidante *in vitro* contra a produção de TBARS induzida por Fe^{+2} em homogeneizados de cérebro, fígado e rim. O ditelureto de difenila, um conhecido composto orgânico de telúrio com propriedade antioxidante, foi utilizado para fins de comparação, nas mesmas concentrações. De fato, o dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato se mostrou um agente antioxidante comparável ao ditelureto de difenila, apesar deste ainda demonstrar melhor eficiência em baixas concentrações. Além disso, a produção espontânea de TBARS também foi diminuída pelo dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato nos três tecidos testados.

As diferenças observadas entre os dois compostos tanto na produção de TBARS quanto no grau de inibição da δ -ALA-D pode ser atribuída ao fato de o ditelureto de difenila ser bem mais reativo do que o dietil-2-fenil-2-telurofenil

vinilfosfonato, por este possuir uma ligação Te-C, relativamente mais estável e menos reativa que a ligação Te-Te, presente no ditelureto de difenila (Petragani, 1994).

Devido à sua relativamente baixa toxicidade *in vitro*, o dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato foi administrado em camundongos pela via subcutânea em três diferentes doses, 25, 75 e 250 $\mu\text{mol/Kg}$, enquanto outro grupo de camundongos foi também dividido em três grupos, recebendo ditelureto de difenila pela mesma via, nas doses de 12,5, 25 e 75 $\mu\text{mol/Kg}$. A exposição diária por doze dias foi utilizada para melhor observar o efeito cumulativo do composto, visto que os animais que recebiam o dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato não morriam nem apresentavam sinais de intoxicação após poucos dias de exposição. Interessantemente, mesmo após doze dias de tratamento, a mortalidade dos animais que receberam dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato foi quase nula, exceto pela morte de apenas um animal do grupo que recebia 250 $\mu\text{mol/Kg}$. Nos animais que foram sacrificados, não houve perda de peso corporal, assim como não houve alteração de peso nos órgãos analisados, cérebro, fígado e rins. Além disso, a atividade da δ -ALA-D, utilizada como parâmetro bioquímico de toxicidade neste estudo, não foi inibida por nenhuma das doses administradas. Por outro lado, após o quinto dia de tratamento, todos os animais que receberam ditelureto de difenila já haviam morrido, mesmo na dose mais baixa, que é aproximadamente 20 vezes menor que a dose mais alta de dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato administrada.

De fato, um trabalho anterior mostrou que a administração por 14 dias de ditelureto de difenila em doses mais baixas (2,5 e 10 $\mu\text{mol/Kg}$) não causou a morte dos camundongos, porém a inibição da δ -ALA-D em fígado e cérebro foi de aproximadamente 50% para a maior dose (Maciel e cols, 2000). Estes resultados podem sugerir que, diferentemente do ditelureto de difenila, a δ -ALA-D não é um alvo molecular *in vivo* para o dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato.

A via subcutânea é uma via bastante utilizada clinicamente, por sua fácil administração e também pela sua característica de permitir uma absorção lenta e contínua das drogas administradas (Goodman & Gillman, 2003). Como não foi observado nenhum sinal de toxicidade nos camundongos que receberam o dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato por esta via, decidimos utilizar outra, que oferecesse uma

absorção mais rápida e que conseqüentemente causasse uma maior biodisponibilidade do composto, bem como uma otimização no tempo de metabolização, visto que possivelmente os metabólitos dos compostos orgânicos de telúrio são os responsáveis por suas toxicidades (Nogueira e cols, 2004). O peritônio oferece uma grande área absorptiva, na qual os compostos administrados rapidamente entram na circulação e são levados ao fígado pela veia porta e, por isto, a via intraperitoneal foi escolhida (Goodman & Gillman, 2003). Além disso, outros parâmetros bioquímicos e toxicológicos importantes foram determinados.

Após o mesmo tempo de tratamento do protocolo s.c., todos camundongos que receberam as diferentes doses de dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato (30, 50, 75, 100, 250, 350 e 500 $\mu\text{mol/Kg}$) sobreviveram, sem nenhuma alteração significativa de peso corporal quando comparados aos animais controle. Por outro lado, houve um aumento significativo no peso do fígado dos animais tratados com as maiores doses (350 e 500 $\mu\text{mol/Kg}$). Visto que os compostos de telúrio são metabolizados no fígado, este achado pode estar indicando que as altas concentrações do composto que estariam chegando ao fígado aumentariam a atividade do sistema oxidase dos hepatócitos, acompanhado de um aumento do tamanho do tecido pelo acúmulo de lipídeos e pelo aumento do retículo endoplasmático (Amdur, 1947; Tani e cols, 1981).

Para verificar se o dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato estaria causando um dano ao tecido hepático, foram dosadas as atividades da ALT e da AST. Estas transaminases estão presentes em diferentes espaços intracelulares, e qualquer dano ao tecido faz com que estas sejam liberadas para o sangue (Gabriel e cols, 2005). Neste trabalho, nenhum aumento significativo da atividade destas enzimas foi observado, indicando que o tecido hepático não estaria sofrendo danos pela exposição ao composto.

A atividade da δ - ALA-D foi também determinada neste protocolo. Mesmo utilizando doses mais altas e em uma via que favorece a biodisponibilidade, este biomarcador novamente não foi alterado em nenhuma das doses testadas e em nenhum dos tecidos avaliados. A baixa capacidade de inibir a atividade da δ - ALA-D *in vitro*, e *in vivo* nas duas vias e nas diversas doses testadas, indicam uma grande

vantagem do dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato comparado aos outros compostos orgânicos de telúrio (Savegnago e cols, 2006, Meotti e cols., 2003; Laden & Porter, 2001).

O sistema antioxidante não foi alterado pelo tratamento subcrônico pela via intraperitoneal. Sabe-se que um dos mecanismos de toxicidade dos compostos orgânicos de telúrio é a capacidade que eles têm de gerar agentes oxidantes (Chen e cols, 2001). Aqui, observamos que o dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato não causou aumento na peroxidação lipídica, bem como não alterou os níveis de vitamina C, um antioxidante não enzimático, em nenhum dos tecidos analisados. Os níveis de GSH e GSSG, formas reduzida e oxidada, respectivamente, do principal antioxidante endógeno, a glutathiona, não foram alterados. No tecido renal, houve apenas uma tendência à diminuição nos níveis de GSH, indicada pela diminuição da razão GSH/GSSG, nas doses intermediárias. As atividades de duas enzimas importantes para o sistema antioxidante celular, a superóxido dismutase e a catalase, também foram determinadas nos três tecidos. Interessantemente, houve um aumento significativo na atividade da SOD e uma tendência ao aumento da catalase somente no cérebro e nas doses intermediárias. Estes resultados podem indicar que o dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato está atravessando a barreira sangue-cérebro, uma vez que os compostos orgânicos de telúrio são lipofílicos e podem passar através desta barreira, afetando apenas o cérebro, um órgão - alvo para estes compostos (Nogueira e cols., 2001; 2004; Jacques-Silva e cols, 2001; Maciel e cols., 2000). Porém, não se pode afirmar se o tecido estaria sendo prejudicado pela presença do composto ou se este estaria fornecendo uma proteção prévia ao tecido.

Recentemente, Savegnago e cols (2006) reportaram as ações *in vitro* e *ex vivo* de um composto relativamente semelhante ao dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato, o 1-butiltelurenil-2-metilhepteno. Este composto não altera a atividade da δ -ALA-D *in vitro*, porém quando administrados a ratos, somente as doses mais elevadas (a partir de 75 $\mu\text{mol/Kg}$) foram letais aos animais, alterando os parâmetros analisados nos animais sobreviventes. Este composto compartilha alguma característica estrutural do dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato, por ser também um telureto vinílico, podendo este fato

ser o primeiro passo para futuras investigações sobre a toxicidade destes compostos (Zeni e cols, 2006).

Dessa forma, verificamos a baixa toxicidade *in vivo* do dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato através de determinações bioquímicas *ex vivo* em diferentes tecidos de camundongos expostos subcronicamente ao composto, independente da via de administração. *In vitro*, o composto demonstrou reagir com grupamentos tiólicos, característica de qualquer composto de telúrio orgânico, porém de forma mais amena do que outros anteriormente estudados. É importante notar a sua distinta estrutura molecular em relação aos outros compostos orgânicos de telúrio, especialmente devido à presença da ligação relativamente estável Te-C presente no composto. De qualquer maneira, podemos sugerir que este composto é promissor para futuros estudos farmacológicos, especialmente pela potente atividade antioxidante *in vitro* também aqui demonstrada.

V. Conclusões:

- 1) O dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato mostrou-se um ótimo agente antioxidante *in vitro*, diminuindo a formação de TBARS espontânea e induzida por Fe^{+2} em homogeneizado de fígado, rim e cérebro em baixas concentrações, de uma forma quase tão eficiente do que o ditelureto de difenila, um conhecido composto orgânico de telúrio antioxidante;
- 2) O dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato foi capaz de aumentar a taxa de oxidação de grupamentos tiólicos do DTT, *in vitro*, na ausência de homogeneizado de fígado, bem como capaz de inibir, *in vitro*, a atividade da δ - ALA-D em fígado, cérebro e rins, porém em concentrações relativamente mais altas do que outros compostos anteriormente estudados, comprovando sua capacidade de oxidar grupamentos -SH como outros compostos orgânicos de telúrio;
- 3) Após administração subcrônica pela via s.c. em camundongos, o dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato mostrou ter baixa toxicidade pelo baixo índice de mortalidade, além de não ter alterado o peso corporal nem dos órgãos dos animais expostos, enquanto que os animais tratados com ditelureto de difenila morreram após alguns dias de tratamento;
- 4) O uso da via i.p. para a administração do dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato, não causou perda de peso corporal nos camundongos tratados diariamente por doze dias. O cérebro e os rins dos animais também não tiveram seus pesos alterados, porém os fígados dos animais que receberam as maiores doses tiveram um aumento significativo de peso, indicando um aumento da atividade hepática para metabolizar o composto;
- 5) A administração s.c. e i.p. de dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato não alterou, *ex vivo*, a atividade da δ - ALA-D em fígado, cérebro e rins

de camundongos, sugerindo uma baixa toxicidade deste novo composto;

- 6) A administração i.p. de dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato por doze dias não alterou os marcadores de hepatotoxicidade, as atividades da AST e ALT. A formação de TBARS, os níveis de vitamina C e a razão GSH/GSG também não foram alterados em nenhum dos tecidos avaliados. Porém, a atividade da enzima antioxidante SOD foi significativamente aumentada no cérebro dos animais tratados com doses intermediárias, bem como uma tendência ao aumento nas mesmas doses da atividade da catalase, o que poderia estar indicando um dano ou proteção ao tecido.

VI. Perspectivas

Devido aos interessantes achados sobre a baixa toxicidade e potencial atividade antioxidante do dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato, torna-se necessário maiores investigações sobre as ações benéficas deste composto.

Inicialmente, seria interessante observar seus efeitos quando administrado pela via oral, a via mais usada clinicamente e tão explorada nos artigos publicados mais recentemente. Além disso, a toxicidade deste composto poderia ser avaliada em ratos, uma vez que são mais sensíveis aos efeitos tóxicos do telúrio.

Também seria interessante avaliar especificamente os efeitos do dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato sobre o sistema nervoso central, especialmente sobre o sistema glutamatérgico, uma vez que o ditelureto de difenila mostrou-se altamente neurotóxico, enquanto o ebselen, um composto orgânico de selênio, parece ser neuroprotetor.

A fim de elucidar o mecanismo de ação da atividade antioxidante deste composto, outras técnicas poderiam ser utilizadas a fim de determinar a capacidade de neutralizar espécies reativas, como os métodos de fluorescência e de quimioluminescência já padronizados pelo nosso grupo.

Alguma possível atividade farmacológica poderia também ser avaliada, utilizando-se algum modelo de dano oxidativo eficiente, bem como um tratamento adequado com o composto.

Por fim, a comparação com um análogo contendo selênio seria também interessante, a fim de avaliar diferenças e semelhanças nos parâmetros analisados para o dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato.

VII. Referências Bibliográficas

AGNEW W.F., CURRY E. Period of teratogenic vulnerability of rat embryo to induction of hydrocephalus by tellurium. **Experientia**. v. 28, p. 1444-1445, 1972.

AMDUR M.L. Tellurium: accidental exposure and treatment with BAL in oil. **Occup. Med.** v. 3,p. 386-391, 1947.

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

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

Anom. Merck's Manual of the materia medica, 1st edition; Merck e co. New York, 1899; 1999 fascilime edition.

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

BECHARA E.J.H., MEDEIROS M.H.G., MONTEIRO H.P., HERMES-LIMA M.,PEREIRA B., DEMASI M., COSTA C.A., ADBALLA D.S.P., ONUKI J., WENDEL C.M.A., MASCI P.D. A free radical hypothesis of lead poisoning and in Born porphyrias associated with 5-aminolevulinic overload. **Quimica Nova**. v.16, 1993.

BENET L.Z. Effect of route of administration and distribution on drug action. **J. Pharmacokinet. Biopharmacol.** v.6, p.559- 585, 1978.

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

BORGES V.C., ROCHA J.B.T., NOGUEIRA C.W. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na⁺, K⁺ ATPase activity in rats. **Toxicology**. v. 215, p. 191-197, 2005.

BRAGA A. L., ALVES E.F., SILVEIRA C.C., ANDRADE L.H. Stereoselective addition of sodium organyl chalcogenolates to alkynylphosphonates: synthesis of diethyl 2-(organyl)-2-(organochalcogenyl)vinylphosphonates. **Tetrahed. Lett.** v.41, p. 161-163, 2001.

BRAGA A.L., RHODEN C.R.B., ZENI G., SILVEIRA C.C., ANDRADE L.H. Stereospecific synthesis of phosphono-(1Z, 3E)-dienyl compounds from β -phenyltelluro-vinylphosphonates and vinylphosphine oxides. **J. Org.Metal.Chem.** v. 682, p. 35-40, 2003.

BRIVIBA K., TAMLER R., KLOTZ L-O., ENGMAN L., COTGREAVE I.A., SIES H. Protection against organotellurium compounds against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration reactions. **Biochem. Pharmacol.** v.55, p. 817-823, 1998.

BUCK M.R., KARUSTIS D.G., DAY N.A., HONN K.V., SLOANE B.F. **Biochem J.** v.282, p. 273-,1992.

CALDWELL j. The current status of attempts to predict species differences in drug metabolism. **Drug Metab.Rev.** v. 12, p. 221-237, 1981.

CHEN F., VALLYATHAN V., CASTRANOVA V., SHI X. Cell apoptosis induced carcinogenic metals. **Mol. Cell. Biochem.** v.221, p.183-188, 2001.

COMASSETO J.V., LING L.W., STEFANI H.A., PETRAGNANI N., Vinyllic selenides and tellurides- preparation, reactivity and synthetic applications. **Synthesis**. v. 4, p.373, 1997.

CUNHA L.O.R, URANO M.E., CHAGAS J.R., ALMEIDA P.C., BINCOLETTO C., TERSARIOL I.L.S., COMASSETO J.V. Tellurium- based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium (IV) compounds as inhibitors of human Cathepsin B. **Bioorg. Med Chem. Lett.** v.15, p. 755-760, 2005.

D'GREGÓRIO R.E.P & MILLER R.K. Teratogenicity of tellurium dioxide: prenatal assessment. **Teratology**. v. 37, p. 307-316, 1988.

DEUTICKE B., LUTKEMEIER R.K., POSE B. Tellurite- induced damage of the erythrocyte membrane. Manifestations and mechanisms. **Biochem. Biophys Acta**. v. 1109, p. 97-107, 1992.

DOUCET A. Function and control of Na⁺/K⁺ ATPase in single nephron segments of the mammalian kidney. **Kidney Internat.** v 34, p. 749-760, 1998.

EMANUELLI T., PAGEL F.W., ALVES L.B., REGNER A., SOUZA D.O. Inhibition of adenylate cyclase activity by 5- aminolevulinic acid in rat and human brain, **Neurochem. Int.** v.38, p. 213-218, 2001.

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

ENGMAN L., AL- MAHARIC N., MCNAUGHTON M., BIRMINGHAM A., POWIS G. Thioredoxin Reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium compounds that could be selectively incorporated into tumor cells. **Bioorg. Medic. Chem.** v. 11, p. 5091-5100, 2000a.

ENGMAN L., KANDA T., GALLEGOS A., WILLIAMS R., POWIS G. Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. **Anti-Cancer Drug Des.** v. 15, p. 323-330, 2000b.

ENGMAN L., PERSON J., VESSMAN K., EKSTROM M., BERGLUND M., ANDERSSON C-M. Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. **Free Rad. Biol. Med.** v.19, p. 441-452, 1995.

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

FAIRHILL L.T. **Tellurium. In: Industrial Toxicology**, Hafner Publishing Co, New York, 1969.

FREEMAN B.A & CRAPO J.D.C. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Lab. Inv.** v. 47, p. 412-426, 1982

GABRIEL D., PIVETTA L., FOLMER V., SOARES J.C.M., AUGUSTI G.R., NOGUEIRA C.W., ZENI G., ROCHA J.B.T. Human erythrocyte δ - aminolevulinate dehydratase inhibition by monosaccharides is not mediated by oxidation of enzyme sulfhydryl groups. **Cell Biol. Int.** v.29, p.669-674, 2005.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 10^o ed, editora Mc Graw- Hill, 2003.

GOODRUM J.F. Role of organotellurium species in tellurium neuropathy. **Neurochem. Res.** v.10, p. 1313-1319, 1998.

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

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

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

HANSEN H. Versuch uber die wirkung der tellurs auf den lebeden organismus. **Liebigs Annale Chemistry and Pharmacology**, v. 86, p. 208, 1853.

HODGSON E., LEVI P. Absorption and distribution. In: **Riviere J.E.: Introduction to Biochemical Toxicology**. 2nd ed. Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, USA, p. 11-48, 1994.

HOLLEY A.E & CHEESEMAN K.H. Measuring free radicals reactions in vivo. **British Med. Bull.** v. 49, p. 494-505, 1993.

HUCKER H.B. Species differences in drug metabolism. **Annu.Rev.Pharmacol.** v. 10, p. 99-117, 1970.

IWASE K., TATSUISHI T., NISHIMURA Y., YAMAGUCH J., OYAMA Y., MIYOSHI N., WADA M. Cytometric analysis of adverse action of diphenyl

ditelluride on rat thymocytes: cell shrinkage as a cytotoxic parameter. **Env. Toxicol.** v. 19, p. 614-619, 2004.

JACOB C., ARTEEL G.E., KANDA T., ENGMAN L., SIES H. Water soluble organotellurium compounds: catalytic protection against peroxyxynitrite and release of zinc from metallothionein. **Chem. Res. Toxicol.** v.13, p. 3-9, 2000.

JACQUES-SILVA M.C., NOGUEIRA C.W., BROCH L.C., FLORES E.M.M., ROCHA J.B.T. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacol. Toxicol.** v. 88, p. 119-125, 2001.

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

JORGENSEN P.L. Structure, function and regulation of Na⁺/K⁺ ATPase in the kidney. **Kidney Internat.** v.29, p. 10-20, 1986.

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

KALECHMAN Y., LEDERER G., ALBECK M., SREDNI B. Prevention of toxicity to circulating blood-elements in chemotherapy treated mice by the immunomodulator ammonium trichloro(dioxyethylene-o-o')tellurate (AS101). **Exp. Hematol.** v. 21, p. 1176-1176, 1993.

KANSKI J., DRAKE J., AKSENOVA M., ENGMAN L., BUTTERFIELD D.A. Antioxidant activity of the organotellurium compound 3-[4-(N,N-dimethylamino)benzenetellurenyl]propanesulfonic acid against oxidative stress in synaptosomal membrane systems and neuronal cultures. **Brain Res.** v. 911, p.12-21, 2001.

KLAMAN D. Organotellurium compounds. **In: Methods of organic chemistry.** 4th edition, George Thieme Verlag Stuttgart- New York, 1990.

KOSUGI H., KIKUGAWA K. reaction of thiobarbituric acid with saturated aldehydes. **Lipids.** v. 21, p. 537-542, 1986.

KOZENITZKY L, DAVID M, SREDNI B, ET AL. Immunomodulatory effects of AS101 on interleukin-2 production and lymphocyte-t function of lymphocytes treated with psoralens and ultraviolet-A. **Photodermatol. Photoimmunol & Photomedic.** v. 9, p. 24-28, 1992.

LADEN B.P. & PORTER T.D. Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. **J. Lipid. Res.** v. 42, p. 235-240, 2001.

MACIEL E.N, BOLZAN R.C., BRAGA A.L., ROCHA J.B.T. Diphenyl Diselenide and diphenyl ditelluride affect delta- aminolevulinatase from liver, kidney and brain of mice. **J. Biochem. Mol. Toxicol.** v.14, p. 310-319, 2000.

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

MINAMI T., MOTOYOSHIYA J. Vinylphosphonate in organic synthesis. **Synthesis.** v. 3, p. 333-349, 1992.

MORETTO M.B., FUNCHAL C., ZENI G., ROCHA J.B.T., PESSOA-PUREUR R. Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal protein induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. **Toxicology.** v.210, p. 213-222, 2005.

MÜLLER R., ZSCHIESCHE W., STEFFEN H.M., SCHALLER K.H. Tellurium intoxication. **Klin.Wochenschr.** v. 67, p. 1152-1155, 1989.

NAMIKI M. Antioxidants/antimutagens in food. **Food Sci. Nutr.** v. 29, p. 273-300, 1990.

NOGUEIRA C.W., BORGES V.C., ZENI G., ROCHA J.B.T. Organochalcogens effects on δ - aminolevulinatase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology** v. 191, p. 169-178, 2003a.

NOGUEIRA C.W., MEOTTI F.C., CURTE E., PILISSAO C., ZENI G., ROCHA J.B.T. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology.** v. 183, p. 29-37, 2003b.

NOGUEIRA C.W., ROTTA L.N., PERRY M.L., SOUZA,D.O., ROCHA J.B.T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. **Brain Res.** v. 906, p. 157-163, 2001.

NOGUEIRA C.W., ROTTA L.N., ZENI G., SOUZA D.O., ROCHA J.B.T. Exposure to Ebselen changes glutamate uptake and release by rat brain synaptosomes. **Neurochem. Res.** v. 27, p. 283-288, 2002.

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

OHKAWA H., OHISHI N., YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues bu thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.** v.95, p.351-358, 1979.

PETRAGNANI N. & DE MOURA CAMPOS M. **Organometal. Chem. Rev.** v.2, p. 61- ,1967.

PETRAGNANI N. **Annual N.Y. Academic Sciences.** v.192, p. 10, 1972.

PETRAGNANI N. **Tellurium in organic synthesis.** Eds Katrizky A.R., Meth-Cohn, O. and Ress, C.W. Academic Press, San Diego, CA, pp. 89-242, 1994.

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

ROOSEBOOM M., VERMEULEN N.P.E., DURGUT F., COMMANDEUR J.N.M. Comparative study on the bioactivation mechanisms and cytotoxicity of Te- Phenyl-L-tellurocysteine, Se-Phenyl-L-selenocysteine and S-Phenyl-L-cysteine. **Chem. Res Toxicol.** v.15, p. 1610-1618, 2002.

SAILER B.L., LILES N., DICKERSON S., SUMNERS S., CHASTEEN T.G. Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium- containing organic analog. **Toxicol. in vitro.** v.18, p. 475-482, 2004.

SANTOS F.W., ZENI G., ROCHA J.B.T., WEISS S.N., FACHINETTO J., FAVERO A.F., NOGUEIRA C.W. Diphenyl diselenide reverses Cadmium-

induced oxidative damage of mice tissues. **Chem- Biol. Interact.** v.151, p.159-165, 2005.

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

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

SCHOROEDER H.A., BUCKMAN J., BALASSA J.J. Abnormal trace elements in man: tellurium. **J.Crronic Dis.** v. 20, p. 147-161, 1967.

SLATER T.F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.** V. 105, P.283-293,1984

SREDNI B., CASPI R.R., KLEIN A., KALECHMAN Y., DANZIGER Y., BEM YA'AKOVM., TAMARI, T., SHALIT F., ALBECK M. A new immunomodulating compound (AS-101) with potential therapeutic Industrial application. **Nature** v. 330, p. 173–176, 1987.

STWART N.G. & CROOKS R.N. Long range travel of the radioactive cloud from the accident of Windscale. **Nature.** v. 182, p. 627-628, 1958.

TANI T., KATO N., HORIO F., YOSHIDA A. Characteristic properties of isolated soy protein in the metabolic changes due to dietary polychlorinated biphenyls. **Nutr. Res.** v.1, p.83–92, 1981.

TAYLOR, A. Biochemistry of tellurium. **Biological Trace Elements**, v. 55, p. 231-239, 1996

TIANO L., FEDELI D., SANTRONI A. M., VILLARINI M., ENGMAN L., FALCIONI G. Effect of three diaryl tellurides, and and organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro. **Genet. Toxicol. Env. Mutag.** v.464, p. 269-277, 2000.

TIMBRELL J. **Principles of biochemical toxicology**, 3rd ed, London: Taylor & Francis, 2000.

TOEWS A.D., ECKERMANN M.D., ROBERSON S.Y., LEE S.Y., MORELL P. Primary demyelination induced by exposure to tellurium alters mRNA levels for

nerve growth factor receptor, SCIP, 2'3'-cyclic nucleotide 3'phosphodiesterase, and myelin proteolipid in rat sciatic nerve. **Mol. Brain Res.** v.11, p.321-325, 1991.

TROTTI D, RIZZINI BL, ROSSI D, HAUGETO O, RACAGNI G, DANBOLT NC, VOLTERRA A. Neuronal and glial glutamate transporters possess a SH-based redox regulatory mechanism. **Eur. J. Neurosci.** v.9, p. 1236-1243, 1993.

WIESLANDER E., ENGMAN L., SVENSJO E., ERLANSSON M., JOHANSSON U., LINDEN, M., ANDERSSON C-M., BRATTSAND R. Antioxidative properties of organotellurium compounds in cell system. **Biochem. Pharmacol.** v. 55 , p.573-584, 1998.

WÖHLER F. **Ann Chemistry.** v.35, p. 111 1840.

ZENI G., LUDTKE D., PANATIERI R.B., BRAGA A.L. Vinylic tellurides: from preparation to their applicability in organic synthesis. **Chem. Rev.** v.106, p. 1032-1076, 2006.