

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO COMPOSTO DIETIL FENIL FOSFATO EM ENSAIOS *IN VITRO*

ALEXANDRE JOST<sup>1</sup>; ALINE GONÇALVES<sup>1</sup>; LUCAS EMANUEL BELUZZO IAROCZ<sup>2</sup>; MÁRCIO SANTOS DA SILVA<sup>2</sup>; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO<sup>1</sup>; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), Universidade Federal de Pelotas – [alexandre.jost254@gmail.com](mailto:alexandre.jost254@gmail.com); [cabruning@yahoo.com.br](mailto:cabruning@yahoo.com.br)*

<sup>2</sup>*Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL), Universidade Federal de Pelotas – [silva.ms@ufpel.edu.br](mailto:silva.ms@ufpel.edu.br)*

### 1. INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) são átomos ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados, o que as torna altamente instáveis e reativas. Estas espécies são geradas naturalmente no organismo como subprodutos do metabolismo celular, especialmente durante a respiração mitocondrial, além de processos fisiológicos como inflamações. Fatores externos, como estresse crônico, prática intensa de exercícios físicos e exposição à radiação ultravioleta, também podem aumentar sua produção (JAKUBCZUK, 2020). A formação excessiva dessas espécies reativas pode causar danos moleculares e celulares por meio da modificação de biomoléculas como proteínas, lipídios, carboidratos e nucleotídeos, levando à perda de suas funções (JUAN, 2021). Além disso, o estresse oxidativo tem um efeito particularmente adverso sobre os sistemas circulatório, respiratório e nervoso. Essas alterações contribuem para o desenvolvimento de muitas doenças associadas ao acúmulo de radicais livres (JAKUBCZUK, 2020).

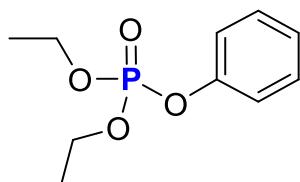
Alguns compostos apresentam características antioxidantes por sua capacidade de doar elétrons, estabilizando os radicais livres. É o caso dos ésteres de fosfato, que são compostos nos quais porções orgânicas estão ligadas ao grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) por meio de ligações covalentes carbono-oxigênio (C-O). Estes representam uma classe versátil de compostos antioxidantes utilizados no desenvolvimento de fármacos com diversas finalidades terapêuticas. Esses compostos são frequentemente empregados como pró-fármacos para melhorar a solubilidade em água, a biodisponibilidade e a seletividade de moléculas bioativas, além de reduzir efeitos adversos (YU, 2020).

Considerando esses aspectos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante do composto dietil fenil fosfato por meio das técnicas de eliminação de radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), e poder redutor do íon férrico (FRAP).

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1. Composto

O composto foi sintetizado pelo Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da Universidade Federal de Pelotas (GOULART, 2023).



**Figura 1.** Estrutura química do composto dietil fenil fosfato.

## 2.2. Atividade sequestradora de radicais livres 2,2'-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)

A atividade antioxidante do composto foi avaliada por meio dos ensaios ABTS e DPPH, conforme descrito por Re et al. (1999) e Sharma (2009). As soluções de ABTS<sup>•+</sup> (7 mM) e DPPH<sup>•</sup> (5,05 mM) foram preparadas em tampão fosfato de potássio (10 mM, pH 7,0) e etanol, respectivamente. Foram testadas concentrações de 1 a 500 µM do composto, previamente diluídas em DMSO, as quais foram incubadas por 30 minutos com os radicais. As leituras de absorbância foram realizadas nos comprimentos de onda de 734 nm para ABTS e 517 nm para DPPH. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle branco e o ácido ascórbico (25 µM) foi empregado como controle positivo.

## 2.3. Capacidade redutora de íons férricos pelo método FRAP

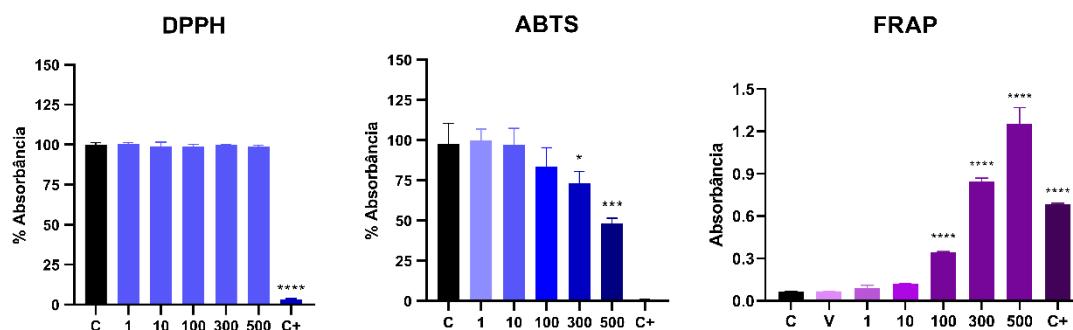
O poder antioxidante de redução do íon férrico (FRAP) consiste em verificar a capacidade dos compostos de reduzir o íon férrico (Fe<sup>3+</sup>) em íon ferroso (Fe<sup>2+</sup>) na presença de 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (YOSHINO, et al, 1998). O composto foi testado nas concentrações de 1 a 500 µM, previamente diluído em DMSO e a leitura da absorbância foi realizada a 593 nm. Os resultados foram expressos como média das absorbâncias e o ácido ascórbico (10 µM) foi empregado como controle positivo.

## 2.4. Análise estatística

Os dados foram analisados no software GraphPad Prism (v. 8.0.2) utilizando ANOVA unidirecional, seguido pelo teste post hoc de Newman-Keuls. Os dados são expressos como média ± EPM. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme está ilustrado nos gráficos (figura 2), podemos observar os resultados quanto a capacidade antioxidante do composto dietil fenil fosfato testada nos ensaios *in vitro* DPPH, ABTS e FRAP. No ensaio ABTS o composto apresentou efeito antioxidante nas concentrações de 300 µM e 500 µM [ $F_{(6, 14)}=52,21$ ;  $p < 0,0001$ ]. Já no ensaio FRAP, o composto foi capaz de apresentar efeito a partir de 100 µM [ $F_{(7, 16)}=352,7$ ;  $p < 0,0001$ ]. Contudo, no ensaio que utiliza DPPH, o composto não apresentou diferença estatística entre os grupos.



**Figura 2.** Atividade antioxidante do composto dietil fenil fosfato nas técnicas DPPH, ABTS e FRAP. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. \* $p<0,05$  e \*\*\* $p<0,001$  em comparação ao controle.

Como visto, o ensaio que avalia o poder de eliminação de radicais livres utilizando DPPH não apresentou resultados em nenhuma concentração, uma vez que esse método requer a presença de um grupo fenólico livre ou de hidrogênios ácidos facilmente doáveis para neutralizar os radicais livres. Contudo, o composto dietil fenil fosfato não apresenta essas características, o que explica sua ausência de atividade antioxidante nesse ensaio, como podemos observar no primeiro gráfico, em que apenas o controle positivo apresentou atividade. A técnica de eliminação de radicais livres com ABTS é mais sensível à doação de elétrons de forma indireta por compostos que não possuem hidrogênios fenólicos livres, como é o caso do composto testado (CANO, 2023). Os resultados obtidos nesse ensaio indicam que o composto possui relevante capacidade redutora, mesmo na ausência de hidroxilas fenólicas, o que amplia sua aplicabilidade terapêutica por mecanismos distintos da doação direta de hidrogênios. Já o ensaio FRAP demonstrou que o composto dietil fenil fosfato possui atividade redutora, sendo capaz de doar elétrons e converter íons metálicos à sua forma menos oxidada, característica essencial de agentes antioxidantes, uma vez que a doação de elétrons é um dos principais mecanismos responsáveis por neutralizar espécies reativas de oxigênio e interromper reações em cadeia causadas pelo estresse oxidativo (RUMPF, 2023).

#### 4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, o composto dietil fenil fosfato apresentou atividade antioxidante em ensaios *in vitro*, indicando sua capacidade de neutralizar radicais livres associados ao desenvolvimento de diversas patologias. Diante desse potencial, a nossa perspectiva é realizar novos ensaios *in vitro* para aprofundar a caracterização de sua ação redutora, bem como estudos *in vivo* para avaliar sua toxicidade e investigar sua aplicabilidade na indústria farmacêutica.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CANO, A.; MAESTRE, A. B.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; ARNAO, M. B. ABTS/TAC Methodology: Main Milestones and Recent Applications. **Processes**, Basel, v. 11, n. 1, p. 185, 2023.
- GOULART, H. A.; ARAÚJO, D. R. Synthesis of Phosphate Esters by Using Diphenyl Ditelluride as Organocatalyst. **European Journal of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 26, n. 14, p. e202300021, 2023.
- JAKUBCZYK, K.; DEC, K.; KAŁDUŃSKA, J.; KAWCZUGA, D.; KOCHMAN, J.; JANDA, K. Reactive oxygen species – sources, functions, oxidative damage. **Polski Merkuriusz Lekarski**, Szczecin, v. 48, n. 284, p. 124-127, 2020.
- JUAN, C. A.; PÉREZ DE LA LASTRA, J. M.; PLOU, F. J.; PÉREZ-LEBEÑA, E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n. 9, p. 4642, 2021.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.
- RUMPF, J.; BURGER, R.; SCHULZE, M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 233, p. 123470, 2023.
- SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, Oxford, v. 113, n. 4, p. 1202–1205, 2009.
- YOSHINO, M.; MURAKAMI, K. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 257, n. 1, p. 40–44, 1998.
- YU, H.; YANG, H.; SHI, E.; TANG, W. Development and Clinical Application of Phosphorus-Containing Drugs. **Medicine in Drug Discovery**, Amsterdam, v. 8, p. 100063, 2020.