

## SÍNTESE DE 1,3,5-TRIAZINAS SUBSTITUÍDAS E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE A *ARTEMIA SALINA* LEACH

Márcia Ferreira Cavalcante, Márcia Cristina Campos de Oliveira, Javier Rincón Velandia e Aurea Echevarria

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - 23851-970 - Seropédica - RJ

Recebido em 22/9/98; aceito em 10/6/99

**SYNTHESIS OF SUBSTITUTED 1,3,5-TRIAZINES AND TOXICITY EVALUATION AGAINST *ARTEMIA SALINA* LEACH.** The synthesis of ten symmetrically and unsymmetrically substituted 1,3,5-triazines by Phase Transfer Catalysis (PTC) method is described. Their toxicities were determined against *Artemia salina* Leach. The LD<sub>50</sub> values have also been obtained for these compounds.

**Keywords:** 1,3,5-triazines; brine shrimp bioassay; toxic activity.

### INTRODUÇÃO

A avaliação da bioatividade de compostos orgânicos, sejam eles provenientes de plantas ou de síntese, tem sido pouco viável em laboratórios tradicionais de química. Geralmente, a não ser que existam programas de colaboração com biólogos ou farmacólogos, os laboratórios de química não estão adequadamente equipados para a realização de bioensaios de rotina utilizando animais ou tecidos e órgãos isolados. A necessidade de realizar ensaios com procedimentos simples e rápidos, levou à busca de novos testes.

A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica<sup>1</sup>, onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida. Os resultados podem ser facilmente tratados estatisticamente. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e portanto é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica<sup>2</sup>. Um dos animais que tem sido utilizado nestes bioensaios é uma espécie de crustáceo marinho, *Artemia salina* Leach.

O primeiro trabalho relativo ao uso de camarão marinho (nome normalmente utilizado) em bioensaios foi publicado em 1956<sup>3</sup> e, a partir daí inúmeros artigos tem sido reportados na literatura em estudos ambientais<sup>4,5</sup>, utilizando produtos e toxinas naturais além de extratos de plantas<sup>1,6</sup> e tem sido proposto como teste padrão por VanHaecke e Persoone<sup>7</sup>.

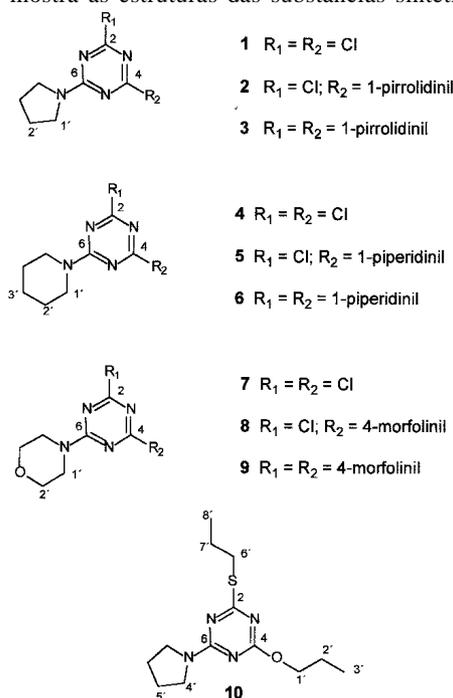
Assim, o bioensaio de letalidade de *Artemia salina* Leach, foi utilizado no monitoramento da toxicidade de 1,3,5-triazinas substituídas.

As triazinas são compostos heterocíclicos cuja síntese tem despertado interesse em função de suas variadas e úteis aplicações. Koopman e Daams<sup>8</sup> investigaram as atividades herbicida e fungicida de várias 2-(amino)-4,6-dicloro-1,3,5-triazinas, sendo a partir daí sintetizados diversos outros derivados de importância na área agrícola. A partir da década de 80, intensificaram-se os estudos desses compostos devido a descoberta de Kobayashi<sup>9</sup> que preparou a 2,4-dicloro-6-(N,N-dimetilamino)-1,3,5-triazina revelando ser inibidora da enzima aromatase, sendo usada como droga anti-câncer. Outras aplicações para esses compostos também tem sido reportadas na literatura recente, como por exemplo, sua utilização como corantes<sup>10</sup> e em colunas com fase estacionária quiral em CLAE para separação enantiomérica de aminoácidos e aminoácidos<sup>11</sup>.

Neste trabalho relatamos a preparação de dez compostos, 1-10 e, os resultados da avaliação de toxicidade utilizando o bioensaio de letalidade com *Artemia salina* Leach.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram sintetizados dez derivados 1,3,5-triazínicos utilizando-se técnica de catálise por transferência de fase (CTF), sendo que 2, 3 e 10 são novos e os demais, 1, e 4 - 9, já descritos na literatura, obtidos porém através de outra metodologia<sup>12</sup>. A Figura 1 mostra as estruturas das substâncias sintetizadas.



**Figura 1.** 1,3,5-Triazinas preparadas e utilizadas no bioensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach.

A utilização da metodologia de CTF mostrou-se eficiente, rendimentos entre 75-99%, facilitando o isolamento e purificação dos produtos. O catalisador éter de coroa, 18-coroa-6, com dimensões específicas para a captura ideal do íon potássio<sup>12</sup>, permite o aumento exacerbado da basicidade do carbonato de potássio utilizado para remover o próton do intermediário formado na reação de substituição nucleofílica. O emprego da CTF favoreceu a seletividade em função da estequiometria utilizada para o reagente nucleofílico, o que não foi observado com a metodologia tradicional com a qual se obteve mistura

praticamente equimolar dos produtos mono e di-substituídos, além de apresentar menor facilidade na execução, sendo necessário o uso de atmosfera inerte. Os compostos **2**, **5** e **8** também foram obtidos pela metodologia tradicional<sup>13</sup>, ou seja à partir da reação do cloreto cianúrico e as respectivas aminas em benzeno seco a refluxo sob atmosfera de nitrogênio, obtendo-se rendimentos em torno de 15% (85, 80 e 90%, respectivamente por CTF), após a purificação por cromatografia em coluna de sílica gel.

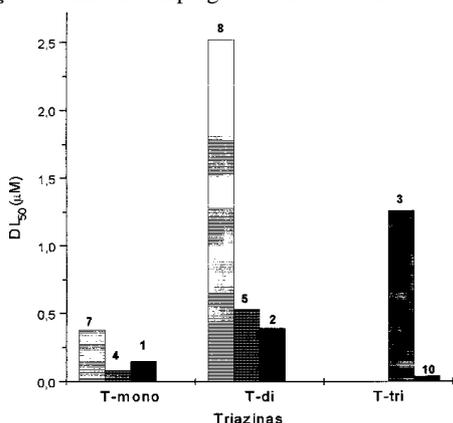
Os compostos sintetizados foram testados quanto à toxicidade geral utilizando o bioensaio de letalidade frente a *Artemia salina* Leach<sup>2</sup>. A toxicidade à *Artemia salina*, foi determinada através da dose letal de 50% (DL<sub>50</sub>) para os microcrustáceos.

Os derivados 1,3,5-triazínicos foram ensaiados em 4 concentrações diferentes em tubos de ensaio contendo água do mar artificial e 10 naupílis. As larvas vivas e mortas foram contadas após 24 h e os valores de DL<sub>50</sub> determinados à partir das equações obtidas por regressão linear. Os ensaios foram realizados em quintuplicata, assim como o ensaio controle. A Tabela 1 indica os valores de DL<sub>50</sub> obtidos.

**Tabela 1.** Valores de DL<sub>50</sub> obtidos no bioensaio de letalidade contra *Artemia salina* Leach para os derivados 1,3,5-triazínicos (**1-5**, **7**, **8** e **10**).

Composto	DL <sub>50</sub> (10 <sup>-2</sup> μM)
<b>1</b>	15
<b>2</b>	39
<b>3</b>	126
<b>4</b>	8
<b>5</b>	53
<b>7</b>	38
<b>8</b>	252
<b>10</b>	3,8

Comparando-se os valores de DL<sub>50</sub> (Gráfico 1), podemos observar a maior toxicidade para o derivado **10** seguido dos derivados mono-substituídos (**1**, **4** e **7**). Os compostos **6** e **9**, apresentaram-se parcialmente solúveis no meio utilizado para os ensaios, não permitindo a determinação dos valores de DL<sub>50</sub>. A utilização de "tween 80" em DMSO à 2% (v/v), facilitou a solubilização dos compostos heterocíclicos para posterior adição de água de mar artificial e, o bioensaio controle, indicou que as larvas não foram afetadas pela composição da mistura empregada como solvente.



**Gráfico 1.** Comparação dos valores de DL<sub>50</sub> (μM) para as 1,3,5-triazinas mono (T-mono), di (T-di) e tri-substituídas (T-tri) ensaiadas contra a *Artemia salina* Leach.

A literatura relata que existe uma correlação entre a toxicidade geral frente a *Artemia salina* e a citotoxicidade diante de linhagens celulares humanas de tumores sólidos<sup>14</sup>. Estudos

experimentais mostram que para uma determinada droga, sua DL<sub>50</sub> referente a toxicidade frente à *Artemia salina* é 10 vezes maior do que sua dose efetiva (DE<sub>50</sub>) obtida para a citotoxicidade frente às linhagens celulares de tumores sólidos<sup>14</sup>. Os resultados obtidos mostraram-se interessantes, particularmente com os derivados **4** e **10**, que em função de seus valores de DL<sub>50</sub>, permitem a previsão de apresentarem potencial atividade citotóxica.

## CONCLUSÕES

A metodologia empregando a catálise por transferência de fase foi adequada e mais eficiente que a tradicionalmente utilizada na literatura para a preparação dessa classe de compostos. O bioensaio utilizando a letalidade da *Artemia salina* Leach, como parâmetro para avaliação da toxicidade geral, apresentou-se simples e eficiente, indicando resultados interessantes para os compostos ensaiados, remetendo-nos a posteriores estudos da citotoxicidade, principalmente para os derivados com menor DL<sub>50</sub>.

## PARTE EXPERIMENTAL

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho tipo Kofler e não foram corrigidos. Os espectros de infra-vermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo 1410, utilizando-se pastilha de KBr ou filme líquido. Os espectros de RMN foram obtidos em espectrofotômetro da Bruker modelo AC-200 operando a frequência de 200 MHz para hidrogênio e 50,3 MHz para o carbono, utilizando-se como solvente CDCl<sub>3</sub>. Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro da Hewlett-Packard, modelo 5989, acoplado à cromatógrafo gasoso (CG-EM), com coluna capilar SE-54. A análise elementar foi determinada em analisador da Perkin-Elmer, modelo 2400 CHN.

### Parte Química

As 1,3,5-triazinas substituídas foram preparadas a partir do cloreto cianúrico (20 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 mmol) e éter de coroa 18-coroa-6 (0,6 mmol) em benzeno, à temperatura ambiente com gotejamento do nucleófilo, 20 mmol para os produtos mono-substituídos (**1**, **4**, **7**) com 2 h de agitação; em benzeno à refluxo com 40 mmol do nucleófilo para os produtos di-substituídos (**2**, **5**, **8**) com 4 h de reação e em decalina à refluxo com 60 mmol do nucleófilo para os tri-substituídos (**3**, **6**, **9**) com 4 h de reação. A 1,3,5-triazina substituída não-simetricamente (**10**) foi obtida em etapas pelo mesmo procedimento das mono- e di-substituídas utilizando 20 mmol de propanol-1 em 10 h de reação, sendo após o isolamento tratada com 20 mmol de propanotiol-1 em 2 h de reação em benzeno a refluxo. O produto **10** foi obtido pelo tratamento da triazina di-substituída não-simetricamente, com 20 mmol de pirrolidina e demais reagentes e condições similares aos simetricamente substituídos. Os produtos foram isolados através de decantação e, após a adição de clorofórmio e carvão ativo, purificados por filtração em coluna com sílica gel, utilizando-se clorofórmio como eluente, posteriormente evaporado permitindo a cristalização dos derivados triazínicos.

**1** [2,4-dicloro-6-(1-pirrolidinil)-1,3,5-triazina]. Cristais incolores em rendimento de 95%; p.f. 98°C (lit.<sup>13</sup> p.f. 98-90°C); IV (cm<sup>-1</sup>) 2972-2874, 1564, 1238, 795; RMN <sup>1</sup>H, δ 1,96 (4H, dq, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3,59 (4H, dt, CH<sub>2</sub>-N); RMN <sup>13</sup>C, δ 169,37 (C-2, 4), 162,17 (C-6), 47,13 (C-1'), 24,87 (C-2'); CG-EM, m/z (M<sup>+</sup>) 219.

**2** [2-cloro-4,6-bis(1-pirrolidinil)-1,3,5-triazina]. Cristais incolores em rendimento de 85%; p.f. 102°C. Análise elementar: calculado para C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>Cl, C 52,05; H 6,37; N 27,60%. Encontrado: C 52,08; H 6,11 e N 27,95%. IV (cm<sup>-1</sup>) 2986-2885, 1593, 1226, 838; RMN <sup>1</sup>H, δ 1,89 (8H, dq, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N);

3,50 (8H, dt, CH<sub>2</sub>-N); RMN <sup>13</sup>C, δ 168,18 (C-2), 162,52 (C-4), 46,25 (C-1'), 25,14 (C-2'); CG-EM, m/z (M<sup>+</sup>) 253.

**3** [2,4,6-tris(1-piperidinil)-1,3,5-triazina]. Cristais incolores em rendimento de 82%; p.f. 180°C. Análise elemental: calculado para C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>, C 62,45; H 8,40; N 29,14. Encontrado: C 62,78; H 8,15 e N 29,43%. IV (cm<sup>-1</sup>) 2954-2859, 1528, 1220; RMN <sup>1</sup>H, δ 1,86 (12H, dq, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3,50 (12H, dt, CH<sub>2</sub>-N); RMN <sup>13</sup>C, δ 163,52 (C-2, 4, 6), 45,46 (C-1'), 25,15 (C-2'); CG-EM, m/z (M<sup>+</sup>) 288.

**4** [2,4-dicloro-6-(1-piperidinil)-1,3,5-triazina]. Cristais incolores em rendimento de 93%; p.f. 88°C (lit.<sup>15</sup> p.f. 90-1°C); IV (cm<sup>-1</sup>) 2943-2861, 1593, 1230, 844; RMN <sup>1</sup>H, δ 1,68 (6H, m, 3 CH<sub>2</sub>); 3,82 (4H, m ap., CH<sub>2</sub>-N); RMN <sup>13</sup>C, δ 169,96 (C-2, 4), 163,35 (C-6), 45,22 (C-1'), 25,54 (C-2'); 24,08 (C-3'); CG-EM, m/z (M<sup>+</sup>) 233.

**5** [2-cloro-4,6-bis(1-piperidinil)-1,3,5-triazina]. Cristais incolores em rendimento de 80%; p.f. 114°C (lit.<sup>16</sup> p.f. 117-9°C); IV (cm<sup>-1</sup>) 2937-2856, 1569, 1232, 796; RMN <sup>1</sup>H, δ 1,57 (12H, s, 6 CH<sub>2</sub>); 3,69 (8H, dt, CH<sub>2</sub>-N); RMN <sup>13</sup>C, δ 169,31 (C-2), 163,95 (C-4, 6), 44,27 (C-1'), 25,59 (C-2'); 24,51 (C-3'); CG-EM, m/z (M<sup>+</sup>) 281.

**6** [2,4,6-tris(1-piperidinil)-1,3,5-triazina]. Cristais incolores em rendimento de 75%; p.f. 216°C (lit.<sup>17</sup> p.f. 216-7°C); IV (cm<sup>-1</sup>) 2932-2848, 1520, 1231; RMN <sup>1</sup>H, δ 1,55 (18H, sl, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 3,67 (12H, sl, CH<sub>2</sub>-N); RMN <sup>13</sup>C, δ 165,32 (C-2, 4, 6), 43,95 (C-1'), 25,75 (C-2'); 25,00 (C-3'); CG-EM, m/z (M<sup>+</sup>) 330.

**7** [2,4-dicloro-6-(4-morfolinil)-1,3,5-triazina]. Cristais incolores em rendimento de 72%; p.f. 156°C (lit.<sup>8</sup> p.f. 157-8°C); IV (cm<sup>-1</sup>) 2969-2860, 1587, 1276, 1233, 841; RMN <sup>1</sup>H, δ 3,73 (2H, t, CH<sub>2</sub>-N), 3,75 (2H, t, CH<sub>2</sub>-N), 3,85 (2H, t, CH<sub>2</sub>-O), 3,86 (2H, t, CH<sub>2</sub>-O); RMN <sup>13</sup>C, δ 170,17 (C-2,4), 163,83 (C-6), 66,17 (C-2'), 44,26 (C-1'); CG-EM, m/z (M<sup>+</sup>) 235.

**8** [2-cloro-4,6-bis(4-morfolinil)-1,3,5-triazina]. Cristais incolores em rendimento de 90%; p.f. 176°C (lit.<sup>16</sup> p.f. 172-4°C); IV (cm<sup>-1</sup>) 2990-2854, 1574, 1269, 1237, 798; RMN <sup>1</sup>H, δ 3,67 (8H, t, CH<sub>2</sub>-N), 3,74 (8H, sl, CH<sub>2</sub>-O); RMN <sup>13</sup>C, δ 169,38 (C-2), 164,17 (C-4, 6), 66,37 (C-2'), 43,55 (C-1'); CG-EM, m/z (M<sup>+</sup>) 285.

**9** [2,4,6-tris(4-morfolinil)-1,3,5-triazina]. Cristais incolores em rendimento de 78%; p.f. 265°C (lit.<sup>18</sup> p.f. 272-3°C); IV (cm<sup>-1</sup>) 2962-2856, 1364, 1252, 1214; RMN <sup>1</sup>H, δ 3,70 (24H, sl); RMN <sup>13</sup>C, δ 165,29 (C-2, 4, 6), 66,79 (C-2'), 43,60 (C-1'); CG-EM, m/z (M<sup>+</sup>) 336.

**10** [2-piperidinil-4-propanoxi-6-tiopropoxi-1,3,5-triazina]. Líquido incolor em rendimento de 90%; p.e. 135-7°C. Análise elemental: calculado para C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>OS, C 55,29; H 7,87; N 19,85. Encontrado: C 55,45; 7,62 e N 20,05%. IV (cm<sup>-1</sup>) 2980-2850, 1560, 1280, 1220, 850, 600; RMN <sup>1</sup>H, δ 0,97 (6H, m, CH<sub>3</sub>); 1,74 (4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,92 (4H, sl, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3,04 (2H, t, CH<sub>2</sub>S), 3,56 (4H, sl, CH<sub>2</sub>N), 4,24 (2H, t, CH<sub>2</sub>O); RMN <sup>13</sup>C, δ 181,09 (C-2), 168,60 (C-4), 162,53 (C-6), 68,41 (C-1'), 46,17 (C-4'), 31,73 (C-6'), 24,88 (C-2'), 22,66 (C-5'), 21,85 (C-7'), 13,21 (C-3'), 10,18 (C-8'); CG-EM, m/z (M<sup>+</sup>) 282.

### Parte Biológica

Os derivados triazínicos em quantidades na faixa de 8 a 50 mg foram dissolvidos em 5 mL de DMSO e posteriormente adicionados em alíquotas para sucessivas diluições, perfazendo 4 concentrações diferentes, a tubos contendo 5 mL de solução de água do

mar artificial:tween 80 (2% v/v). Para cada concentração da substância testada e controle, foram preparadas cinco réplicas.

*Eclosão dos cistos de Artemia salina*: O meio para o cultivo das larvas de *Artemia salina* foi água do mar artificial. Para eclosão dos cistos foi utilizada uma caixa contendo divisória, de maneira que apenas um dos lados ficasse iluminado para permitir, por fototropismo, a migração das larvas.

*Bioensaio de Letalidade da Artemia salina*: Utilizou-se a metodologia de Meyer<sup>1</sup> adaptada. Dez naupilus de *Artemia salina* foram transferidos para cada um dos 5 tubos contendo água do mar artificial e a substância a ser testada em quatro concentrações diferentes. Os tubos foram mantidos sob iluminação e a contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24 h.

*Determinação da Dose Letal de 50% (DL<sub>50</sub>)*: A partir do gráfico do percentual de animais vivos contra o logaritmo da dose ensaiada, a DL<sub>50</sub> foi determinada sendo realizado o ajuste dos pontos através de regressão linear.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e CAPES pela concessão de bolsas de Pós-graduação e produtividade em pesquisa, e também pelo apoio financeiro recebido.

### REFERÊNCIAS

1. Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, B.; McLaughlin, J. L.; *J. Med. Plant Res.* **1982**, *45*, 31.
2. Colegate, S. M.; Molyneux, R. J.; *Bioactive Natural Products : Detection, Isolation and Structural Determination*; Colegate, S. M., Ed.; CRC Press; London, 1993, p 441.
3. Michael, A. S.; Thompson, C. G.; Abramovitz, M.; *Science* **1956**, *123*, 464.
4. Price, K. S.; Waggy, G. T.; Conway, R. A.; *J. Water Pollut. Control Fed.* **1974**, *46*, 63.
5. Sorgeloos, P.; Remiche-van der Wielen, C.; Persoone, G.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1978**, *2*, 249.
6. Harwig, J.; Scott, P. M.; *Appl. Microbiol.* **1971**, *21*, 1011.
7. VanHaeke, P.; Persoone, G.; *Colloq. Inst. Natl. Saute Rec. Med.* **1982**, *106*, 359.
8. Koopman, H.; Daams, J.; *Res. Trav. Chim.* **1958**, *77*, 235.
9. Kobayashi, H.; Komatsu, T.; Fukuda, S.; Tsuchida, Y.; Kato, M.; Yaguchi, S.; *Zenyaku Kogyo Kabushiky Kaisha Pat.; CA* **1994**, *120*, 191737z.
10. Jarman, M.; Coley, H. M.; *PCT Int. Appl. WO9320,056 Pat.; CA* **1994**, *120*, 134536j.
11. Chen, C.; Lin, C.; *J. Chromatogr. Sci.* **1995**, *33*, 229.
12. Gokel, G. W.; Durst, H. D.; *Synthesis* **1976**, 168.
13. Reimlinger, N.; Jadot, V. O.; *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 1954.
14. MacLaughlin, J. L.; *Methods in Plant Biochemistry*; Hostettmann, K., Ed; Academic Press; London, 1991, vol. 6, p 1.
15. Svetsitskaia, L. E.; Kropacheva, A. A.; Sergievskaya, S. I.; *Zhur. Obshchei Khim.* **1958**, *28*, 1601; *CA* **1959**, *54*, 1369h.
16. Peariman, W. M.; Banks, C. K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 3726.
17. Caubere, P.; Parry, D.; *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1973**, *6*, 2112.
18. Goi, M.; Koshida, Z.; Konishi, K.; *Osaka Furitsu Kogyo-Shoreikan Hokok Pat.; CA* **1963**, *38*, 5165g.