



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Síntese e Aplicações de Triazinanas, Triazinas e Sidnonas

ANDRÉ VINICIUS DOS SANTOS CANUTO

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Síntese e Aplicações de Triazinanas, Triazinas e Sidnonas

ANDRÉ VINICIUS DOS SANTOS CANUTO

Sob orientação da Professora

Aurea Echevarria Aznar Neves Lima

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração Química Orgânica.

Seropédica, RJ

Setembro, 2013

547.59

C235s Canuto, André Vinicius dos Santos, 1986-
T Síntese e aplicações de triazinanas,
triazinas e sidnonas / André Vinicius dos
Santos Canuto. - 2013.
221 f.: il.

Orientador: Aurea Echevarria Aznar
Neves Lima.

Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso
de Pós-Graduação em Química, 2013.

Bibliografia: f. 99-101.

1. Compostos heterocíclicos - Síntese
- Teses. 2. Compostos heterocíclicos -
Aplicações industriais - Teses. 3.
Triazinas - Teses. 4. Triazinanas -
Teses. 5. Sidnonas - Teses. 6. Sequestro
(Química) - Teses. 7. Sulfeto de
hidrogênio - Teses. 8. Química orgânica
- Teses. I. Lima, Aurea Echevarria Aznar
Neves, 1950-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Química. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ANDRÉ VINICIUS DOS SANTOS CANUTO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências em Química, na área de concentração de Química Orgânica.

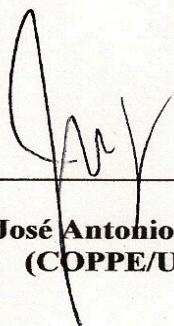
TESE APROVADA EM 11/09/2013

André Vinicius

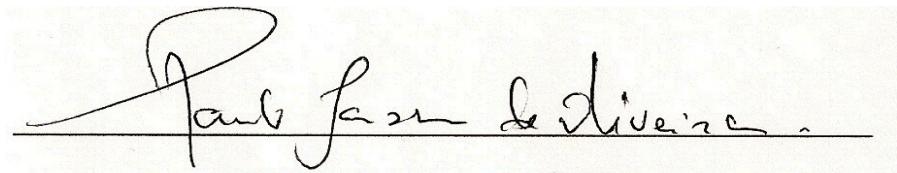
**Profª. Dra. Aurea Echevarria (Dep. De Química /ICE/UFRRJ)
(Orientadora e Presidente)**

Maria Carmen Moreira Bezerra

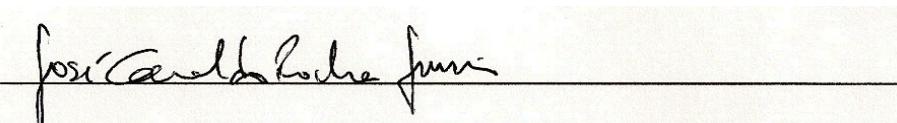
**Dra. Maria Carmen Moreira Bezerra
(CENPES/PETROBRAS)**



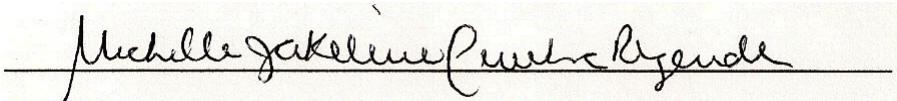
**Prof. Dr. José Antonio Ponciano Gomes
(COPPE/UFRJ)**



Prof. Dr. Paulo Jansen de Oliveira
(PPG em Engenharia Química/UFRRJ)



Prof. Dr. José Geraldo Rocha Júnior
(Dep. De Química /ICE/UFRRJ)



Profª. Dra Michelle Jakeline Cunha Rezende
(Instituto de Química/UFRJ)

Prof. Dr. Marcelo Hawrylak Herbst
(Dep. de Química/ICE/UFRRJ)

Dedico este trabalho em memória do meu pai.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

Aos meus pais por todo o apoio, incentivo e cuidado e por sempre terem confiado e acreditado em mim.

À Professora Áurea Echevarria, pela oportunidade, paciência, amizade e orientação.

Aos amigos e companheiros de laboratório que tornaram o ambiente de trabalho um lugar de ótima convivência durante os anos de trabalho.

Aos professores pertencentes ao Curso de Pós Graduação que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, à Petrobras, ao CENPES e a CAPES, pela oportunidade de crescimento profissional e de vida.

E a mim mesmo, é claro.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do sulfeto de hidrogênio nos seres humanos	2
Tabela 2: Volumes utilizados e valores das concentrações na padronização do HCl pelo tetraborato de sódio	49
Tabela 3: Volumes gastos de titulante, pH(s) e pKa(s) para o composto 3	50
Tabela 4: Volumes gastos de titulante, pH(s) e pKa(s) para o composto 5	50
Tabela 5: Volumes gastos de titulante, pH(s) e pKa(s) para o composto 7	50
Tabela 6: Volumes gastos de titulante, pH(s) e pKa(s) para o composto 9	50
Tabela 7: Volumes gastos de titulante, pH(s) e pKa(s) para o composto 11	50
Tabela 8: Volumes gastos de titulante, pH(s) e pKa(s) para o composto 12	51
Tabela 9: Volumes gastos de titulante, pH(s) e pKa(s) para o composto 14	51
Tabela 10: Volumes gastos de titulante, pH(s) e pKa(s) para o composto 15	51
Tabela 11: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto 3	53
Tabela 12: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto 5 .	53
Tabela 13: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto 11 .	53
Tabela 14: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto 12 .	54
Tabela 15: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto 14	54
Tabela 16: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto 15	54

Tabela 17: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto 18	55
Tabela 18: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto 19	55
Tabela 19: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto 21	55
Tabela 20: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto 22	56
Tabela 21: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto 27	56
Tabela 22: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto 28	56
Tabela 23: Quantidade (em mol) dos produtos da reação de sequestro de íons sulfeto pela triazinana 3 através da quantificação por RMN ^1H em pH 7 nas alíquotas de 0,5 mL	63
Tabela 24: Quantidade (em mol) dos produtos da reação de sequestro de íons sulfeto pela triazinana 3 através da quantificação por RMN ^1H em pH 10 nas alíquotas de 0,5 mL	64
Tabela 25: Resultados obtidos pela quantificação por RMN em pH 5 do composto 3 nas alíquotas de 0,5 mL	64
Tabela 26: Quantidade (em mol) dos produtos da reação de sequestro de íons sulfeto pela triazinana 5 através da quantificação por RMN ^1H em pH 7 nas alíquotas de 0,5 mL	65
Tabela 27: Quantidade (em mol) dos produtos da reação de sequestro de íons sulfeto pela triazinana 5 através da quantificação por RMN ^1H em pH 10 nas alíquotas de 0,5 mL	65
Tabela 28: Rendimento da síntese das triazinanas	69

Tabela 29: Deslocamentos químicos do carbono do anel das triazinanas sintetizadas	70
Tabela 30: Rendimentos das 1,3,5-triazinas obtidas	74
Tabela 31: Deslocamentos químicos do carbono aromático das triazinas sintetizadas	75
Tabela 32: Rendimentos obtidos para os derivados fosfatados sintetizados	77
Tabela 33: Deslocamento s químicos dos átomos do anel e os diretamente ligados aos grupos retiradores dos compostos triazínicos e triazinanicos	78
Tabela 34: Valores de pKa(s) obtidos para as triazinanas sintetizadas	82
Tabela 35: Valores obtidos de DL ₅₀ para os compostos ensaiados	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corrosão por H ₂ S em água de formação.	3
Figura 2. Corrosão microbiológica provocada por H ₂ S.	3
Figura 3. Mecanismo de corrosão por pite	5
Figura 4. Corrosão por pite.	5
Figura 5. Aspecto de corrosão microbiológica em aço-carbono.	6
Figura 6. Mecanismo da corrosão sob tensão na presença de H ₂ S.	7
Figura 7. Estruturas genéricas dos isômeros das triazinanas	8
Figura 8. Estrutura da 1,3,5-tris(2-hidroxietil)-1,3,5-triazinana	9
Figura 9. Esquema reacional do efeito sequestrante da triazinana sobre o H ₂ S	9
Figura 10. Reação genérica de formação da triazinana	10
Figura 11. Reação para a obtenção da 1,3,5-trisetil-1,3,5-triazinana	10
Figura 12. Modificação da síntese para a obtenção da 1,3,5-trisbenzil-1,3,5-triazinana	10
Figura 13. Estruturas dos isômeros da triazina	11
Figura 14. Estruturas da melamina e da benzoguanamina	11
Figura 15. Forma estrutural da atriazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino- <i>s</i> -triazina)	12

Figura 16. Reação de fixação das cloro-triazinas ao tecido	12
Figura 17. Forma estrutural do Blankophor B	12
Figura 18. Estrutura do Procion Green HE-4BD (RG19)	13
Figura 19. Estrutura genérica de derivados 1,2,4-triazolo[1,5-a]-1,3,5-triazina	13
Figura 20. Estrutura de um derivado triazínico com atividade antitumoral	14
Figura 21. Etapas propostas para síntese de 1,3,5-triazinas via trimerização de nitrilas	14
Figura 22. Síntese da 1,3,5-trifeniltriazina via trimerização de nitrila.	14
Figura 23. Síntese de um derivado triazínico via substituição nucleofílica do cloreto cianúrico	15
Figura 24. Exemplificação genérica da síntese de 1,3,5-triazinas através de reação de cicloadição [2 + 3].	15
Figura 25. Exemplificação da síntese de 1,3,5-triazinas utilizando peneira molecular.	16
Figura 26. Representação genérica de uma sidnona	16
Figura 27. Estruturas de sidnonas que mostraram atividade bactericida, anti-inflamatória, analgésica e antitumoral.	17
Figura 28. Rota sintética utilizada na preparação do sistema 1,2,3-oxazólio-5-olato	18
Figura 29. Esquema para ensaio de toxidez geral frente à <i>Artemia salina</i>	52
Figura 30. Gráfico de porcentagem de artemias mortas <i>versus</i> concentração para o composto 5	57
Figura 31. Gráfico da porcentagem de artemias mortas versus concentração, após aplicação do tratamento matemático para determinação do valor de DL50 para o composto 5	57
Figura 32. Foto do papel de acetato de chumbo após contato com a solução de sulfeto de sódio 0,01 mol L ⁻¹	66
Figura 33. Fotos do papel indicador de sulfeto acompanhando uma reação entre a triazinana (composto 3) e o sulfeto de sódio em uma relação de 1:1 em pH 9	66
Figura 34. Fotos do papel indicador de sulfeto acompanhando uma reação entre a triazinana (composto 3) e o sulfeto de sódio em uma relação de 2:1 em pH 9	67
Figura 35. Fotos do papel indicador de sulfeto acompanhando uma reação entre a triazinana (composto 3) e o sulfeto de sódio em uma relação de 3:1 em pH 9	67
Figura 36. Fotos dos papeis indicadores de sulfeto sendo comparados após acompanhamento da reação entre a triazinana (composto 3) e o sulfeto de sódio em	67

diversas relações (1:1, 2:1 e 3:1) em pH 9	
Figura 37. Rota sintética de uma triazinana genérica	68
Figura 38. Mecanismo de reação simplificado proposto para a formação das triazinana	69
Figura 39. Possibilidade de ligação hidrogênio da estrutura do composto 5 .	69
Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C da triazinana 3 obtido em 13 de julho de 2009	70
Figura 41. Espectro de RMN ^{13}C da triazinana 3 obtido em 23 de setembro de 2009	71
Figura 42. Foto do composto 3 com duas colorações distintas	71
Figura 43. Solução salina contendo o composto 3 (solução incolor) + xileno:etanol (1:1) com 10 minutos a 100°C	72
Figura 44. Solução salina contendo o composto 3 (solução incolor) + xileno:etanol (1:1) com 30 minutos a 100°C	72
Figura 45. Solução salina contendo o composto 3 (solução incolor) + xileno:etanol (1:1) com 60 minutos a 100°C	72
Figura 46. Esquema proposto para a formação da 3-oxazolidina etanol pela degradação térmica do composto 3	73
Figura 47. Proposta de mecanismo para a síntese das 1,3,5-triazinas	74
Figura 48. Possibilidade de ligação hidrogênio da cadeia exocíclica para as estruturas dos compostos 21 e 22 .	75
Figura 49. Rota sintética da modificação de uma triazinana genérica para a obtenção de seus respectivos produtos sulfatados e sais de sódio	75
Figura 50. Mecanismo de reação proposto para a formação das triazinanas sulfatadas e da obtenção dos respectivos sais	76
Figura 51. Esquema de reação simplificado para a fosfatação.	77
Figura 52. Mecanismo simplificado e genérico para a fosfatação com POCl_3 .	77
Figura 53. Retrossíntese para a obtenção da sidnona 3-nitro-4-cloro substituída	79
Figura 54. Mecanismo de reação proposto para formação das glicinas substituídas	79
Figura 55. Mecanismo de reação proposto para formação das nitroso-glicinas substituídas	80
Figura 56. Mecanismo de reação proposto para formação das sidnonas substituídas	80
Figura 57. Mecanismo de reação proposto para a reação de substituição nucleofílica aromática para a sidnona	81
Figura 58. Mecanismo de sequestro de H_2S por triazinanas	82

Figura 59. Mecanismo proposto para a reação de sequestro do composto 3 .	84
Figura 60. Espectro de RMN ¹ H de uma solução do composto 3 em água e pH 7.	85
Figura 61. Espectro de RMN ¹ H de uma alíquota da mistura reacional entre o composto 3 e o sulfeto de sódio (2:1) em água em pH 7.	86
Figura 62. Regiões do espectro relativas aos sinais do padrão (círculo azul) utilizado e dos produtos de sequestro (círculo vermelho).	86
Figura 63. Espectros de RMN ¹ H para a triazinana 3 na presença do íon sulfeto e na presença do padrão benzoato de sódio. Sinais integrados associados aos respectivos hidrogênios sendo circulados em verde para o padrão, vermelho para a amina liberada após o sequestro e azul para o produto do sequestro	87
Figura 64. Espectros de RMN de ¹ H sobrepostos do composto 15 na presença do íon sulfeto em pH 7.	88
Figura 65. Foto da reação do composto 5 com sulfeto (1:3) em pH 7 antes da adição de sulfeto.	89
Figura 66. Fotos da reação do composto 5 com sulfeto (1:3) em pH 7 depois da adição de sulfeto.	89
Figura 67. Espectros de RMN de ¹ H e ¹³ C do sólido obtidos após a reação entre a triazinana 5 e o íon sulfeto em CDCl ₃ .	90
Figura 68. Fotos dos papeis indicadores de sulfeto após terem sido embebidos com a mistura reacional resultante entre as reações do composto 3 e o sulfeto de sódio nas proporções de 1:1, 2:1 e 3:1, em pH 9, 7 e 5	91
Figura 69. Fotos dos papeis indicadores de sulfeto após terem sido embebidos com a mistura reacional resultante entre as reações do composto 14 e o sulfeto de sódio nas proporções de 1:1, 2:1 e 3:1, em pH 9, 7 e 5	92
Figura 70. Fotos dos papeis indicadores de sulfeto após terem sido embebidos com a mistura reacional resultante entre as reações do composto 5 e o sulfeto de sódio nas proporções de 1:1, 2:1 e 3:1, em pH 9, 7 e 5	93
Figura 71. Fotos dos papeis indicadores de sulfeto após terem sido embebidos com a mistura reacional resultante entre as reações do composto 15 e o sulfeto de sódio nas proporções de 1:1, 2:1 e 3:1, em pH 9, 7 e 5	94
Figura 72. Fotos dos papeis indicadores de sulfeto após terem sido embebidos com a mistura reacional resultante entre as reações do composto 15 e 19 e o sulfeto de sódio, respectivamente, nas proporções de 1:1, 2:1 e 3:1, em pH 7	95

Figura 73. Fotos dos papeis indicadores de sulfeto após terem sido embebidos com a mistura reacional resultante entre as reações do composto **21** e o sulfeto de sódio **96** nas proporções de 1:1, 2:1 e 3:1, em pH 9, 7 e 5.

Figura 74. Fotos dos papeis indicadores de sulfeto após terem sido embebidos com a mistura reacional resultante entre as reações do composto **22** e o sulfeto de sódio **97** nas proporções de 1:1, 2:1 e 3:1, em pH 9, 7 e 5.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Heterocíclicos	1
1.2 O H₂S na Indústria Petrolífera: Origem, Propriedades e Toxicidade	1
1.3 Corrosão ocasionada pelo sulfeto de hidrogênio	3
1.3.1 Corrosão química causada pelo sulfeto de hidrogênio	3
1.3.2 Corrosão eletroquímica associada ao sulfeto de hidrogênio	4
1.3.2.1 - Corrosão por pite em presença de H₂S	4
1.3.3 - Corrosão microbiológica por bactérias redutoras de sulfato	5
1.3.4 - Corrosão sob tensão na presença de H₂S	6
1.3.5 - Corrosão sob fadiga na presença de H₂S	7
1.4 Classificação e utilização de agentes sequestrantes de H₂S	7
1.5 Triazinanas	8
1.5.1 A ação da triazinana como sequestrante de H₂S	9
1.5.2 Síntese de 1,3,5-triazinanas	10
1.6 Triazinas	11
1.6.1 Aplicações de 1,3,5-triazinas	11
1.6.2 Síntese de 1,3,5-triazinas	14
1.7 Sidnonas	16
1.7.1 Aplicações de Sidnonas	16
1.7.2 Síntese de Sidnonas	18
2 OBJETIVOS	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Equipamentos	21
3.2 Solventes e reagentes	21
3.3 Sínteses e caracterizações	22
3.3.1 Síntese e caracterização das triazinana	22
3.3.1.1 Síntese e caracterização da 1,3,5-tris(2-hidroxietil)-1,3,5-triazinana	22
3.3.1.2 Síntese e caracterização da 1,3,5-tris(3-hidroxipropil)-1,3,5-triazinana	23
3.3.1.3 Síntese e caracterização da 1,3,5-tris-benzil-1,3,5-triazinana	24
3.3.1.4 Síntese e caracterização da 1,3,5-tris-fenetil-1,3,5-triazinana	25

3.3.2 Síntese e caracterização dos derivados sulfatados das triazinana	26
3.3.2.1 Síntese e caracterização da 1,3,5-N,N',N"- (etyl-hidrogenosulfato)-triazinana	26
3.3.2.2 Síntese e caracterização do 1,3,5-N,N',N"- (propil-hidrogenosulfato)-triazinana	27
3.3.3 Síntese e caracterização dos sais dos derivados sulfatados das triazinanas	28
3.3.3.1 Síntese e caracterização do sal sódico da 1,3,5-N,N',N"- (etyl-sulfato)-triazinana	28
3.3.3.2 Síntese e caracterização do sal sódico da 1,3,5-N,N',N"- (propil-sulfato)-triazinana	29
3.3.4 Síntese e caracterização dos derivados fosfatados das triazinanas	30
3.3.4.1 Síntese e caracterização da 1,3,5-N,N',N"- (etyl-di-hidrogenofosfato)-triazinana	30
3.3.4.2 Síntese e caracterização da 1,3,5-N,N',N"- (propil-di-hidrogenofosfato)-triazinana	32
3.3.5 Síntese e caracterização dos sais de sódio dos derivados fosfatados das triazinana	34
3.3.5.1 Síntese e caracterização do sal sódico da 1,3,5-N,N',N"- (etyl-fosfato)-triazinana	34
3.3.5.2 Síntese e caracterização do sal sódico da 1,3,5-N,N',N"- (propil-fosfato)-triazinana	35
3.3.6 Síntese e caracterização das triazinas	36
3.3.6.1 Síntese e caracterização da 2,4,6-triamino-(2,2',2"- trietanol)-1,3,5-triazina	36
3.3.6.2 Síntese e caracterização da 2,4,6-triamino-(3,3',3"- tripropanol)-1,3,5-triazina	37
3.3.6.3 Síntese e caracterização da 2,4,6-triamino-N,N',N"-tribenzil-1,3,5-triazina	38
3.3.6.4 Síntese e caracterização da 2,4,6-triamino-N,N',N"-trifenetil-1,3,5-triazina	39
3.3.7 Síntese e caracterização dos derivados sulfatados das triazinas	40
3.3.7.1 Síntese e caracterização da 2,4,6-triamino-(trietil-hidrogenosulfato)-1,3,5-triazina	40
3.3.7.2 Síntese e caracterização da 2,4,6-triamino-(tripropil-hidrogenosulfato)-	41

1,3,5-triazina	
3.3.8 Síntese e caracterização dos sais de sódio dos derivados sulfatados das triazinas	42
3.3.8.1 Síntese e caracterização do sal de sódio da 2,4,6-triamino-(trietyl-sulfato)-1,3,5-triazina	42
3.3.8.2 Síntese e caracterização do sal de sódio da 2,4,6-triamino-(tripripil-sulfato)-1,3,5-triazina	43
3.3.9 Síntese dos derivados da classe dos 1,2,3-oxadiazólio-5-olato (sidnonas)	44
3.3.9.1 Preparação da N-(3'-nitro-4'-cloro-fenil)-glicina	44
3.3.9.2 Preparação da N-(3'-nitro-4'-cloro-fenil)-N-nitroso-glicina	44
3.3.9.3 Síntese do mesoônico 3-(4'-cloro-3'-nitrofenil)-1,2,3-oxadiazólio-5-olato	45
3.3.9.4 Síntese e caracterização do derivado da sidnona através da reação de substituição nucleofílica com a etano-1,2-diamina	45
3.3.9.5 Síntese e caracterização da triazinana substituída com a sidnona	35
3.4 Determinação do pKa das triazinanas	48
3.4.1 Metodologia	48
3.4.2 Soluções	48
3.4.3 Procedimento	48
3.4.4 Cálculos	48
3.5 pKa(s)	49
3.6 Avaliação de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	51
3.6.1 Procedimento para o Ensaio de Toxidez	51
3.6.2 Cálculos	52
3.7 Determinação da atividade sequestrante de H₂S das triazinanas	58
3.7.1 Determinação por titulação potenciométrica	58
3.7.1.1 Metodologia	58
3.7.1.2 Soluções	58
3.7.1.3 Procedimento	58
3.7.1.4 Cálculos	59
3.7.2 Determinação por titulação iodimétrica	60
3.7.2.1 Metodologia	60
3.7.2.2 Soluções	60
3.7.2.3 Procedimento	60

3.7.2.4 Cálculos	60
3.7.3 Determinação por monitoração de RMN	62
3.7.3.1 Metodologia	62
3.7.4 Avaliação qualitativa por monitoramento com fita indicadora de acetato de chumbo	66
3.7.4.1 Metodologia	66
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1. Síntese das Triazinanas	68
4.2 Estudo da estabilidade da triazinana (3)	70
4.3 Síntese das Triazinas	74
4.4 Síntese das Triazinanas e Triazinas Sulfato e Fosfato-substituídas	75
4.5 Síntese dos derivados mesoiônicos da classe oxadiazólio-olato	79
4.6 Determinação dos valores de pKa para as triazinanas	82
4.7 Toxicidade frente a <i>Artemia Salina</i>	83
4.8 Determinação da atividade sequestrante de H₂S das triazinanas	84
4.8.1 Determinação por titulação potenciométrica	84
4.8.2 Determinação por titulação iodimétrica	84
4.8.3 Determinação por RMN	85
4.8.4 Determinação qualitativa do sequestro de H₂S com papel indicador de acetato de chumbo	90
5 CONCLUSÃO	98
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
7 ANEXOS	102
8 TRABALHOS E ARTIGOS PUBLICADOS	184

RESUMO

Os compostos heterocíclicos constituem uma ampla classe de grande importância e aplicabilidade, e dentre todas as classes, os que apresentam um maior interesse, atualmente, são os compostos heterocíclicos nitrogenados, pois estes estão envolvidos em uma gama de atividades, tais como: atividade antitumoral, herbicida, anticorrosiva, anti-inflamatória, analgésica, como corantes, entre outras.

Neste trabalho de tese foram estudadas três classes de compostos heterocíclicos nitrogenados, sendo 12 triazinanas com 8 estruturas inéditas na literatura, 8 triazinas inéditas e 2 sidnonas, sendo uma também inédita. A principal temática deste trabalho envolveu a obtenção e determinação de parâmetros físico-químicos de novos agentes sequestrantes de H₂S para aplicação na indústria de petróleo, e também, a atividade biológica. Os compostos sintetizados e estudados foram da classe 1,3,5-triazinanas e 1,3,5-triazinas sendo sintetizados a partir de formaldeído e aminas para a primeira classe e, do ácido cianúrico e aminas para as 1,3,5-triazinas, conforme procedimentos da literatura, em rendimentos que variaram de 47 a 98 % e 38 a 90 %, respectivamente. Foram também preparados os derivados sulfonados e fosfonados, bem como os sais sódicos correspondentes para as 1,3,5-triazinanas e 1,3,5-triazinas em bons rendimentos. O derivado mesoionico foi obtido com 75 % de rendimento e triazinana correspondente com 47 %.

Os valores de pKa(s) foram determinados para as 1,3,5-triazinanas e seus derivados utilizando-se o método potenciométrico tendo sido obtidos valores na faixa de 11,46 a 15,30 para as triazinana e 7,9 e 10,44 para os sais sódicos correspondentes, indicando o caráter básico das triazinas, conforme esperado.

O monitoramento e a quantificação da reação de sequestro de H₂S foram realizados através de diversas metodologias, sendo a mais adequada a espectroscopia de RMN de ¹H, de forma inédita para este fim. Os resultados observados mostraram que a reação ocorre muito rapidamente a 20 °C em pH 7 e 10, e que o método foi eficiente quando os compostos apresentam sinais bem resolvidos na temperatura de trabalho, podendo assim os produtos resultantes da reação de sequestro serem claramente observados e quantificados.

Outro método utilizado para o monitoramento da reação de sequestro, embora de forma qualitativa, foi o acompanhamento da reação através de papel indicador embebido em acetato de chumbo. Através desse método foi possível verificar a atividade sequestrante das 1,3,5-triazinanas e 1,3,5-triazinas.

Foi sintetizado, também, o composto mesoionico da classe das sidnonas 4'-cloro-3'-nitro-fenil-1,2,3-oxadiazólio-2-olato sendo posteriormente convertido à triazinana correspondente em rendimento regular. O composto 4'-cloro-3'-nitro-fenil-1,2,3-oxadiazólio-2-olato foi avaliado quanto a atividade antiinflamatória e imunossupressora, apresentando bons resultados.

Palavras-chave: heterocíclicos; 1,3,5-triazinana; agente sequestrante de H₂S; 1,3,5-triazina; compostos mesoionicos; sidnona.

ABSTRACT

Heterocyclic compounds are an important applicable and wide class. Nitrogen-heterocyclic compounds are the most interesting in the class because they are involved in a variety of activities, including: anti-tumour, herbicide, anti-corrosion, anti-inflammatory, analgesic, as colorants, among others.

Three classes of nitrogen-heterocyclic compounds were studied in this work: 12 triazinanes, 8 of which are unprecedented in literature; 8 new triazines; and 2 sydnone, one is also unprecedented. The central theme of this work falls within the gain and determination of physicochemical parameters of new H_2S scavenging agents, thereby implementing them in petrol industry, and also biological activity. Compounds from 1,3,5-triazinane and 1,3,5-triazine classes were synthesised and studied. The first class was synthesised from formaldehyde and amines, while the second, from cyanuric acid and amines, in accordance to proceedings described in literature, with yields that range from 47 to 98 % and 38 to 90 %, respectively. Sulphonate and phosphonate derivatives were also prepared, as well as the corresponding sodium salts for 1,3,5-triazinanes and 1,3,5-triazines in good yields. Mesoionic derivative was obtained with 75 % yield, and the corresponding triazinane with 47 %.

Potentiometric method was used to determine $pK_a(s)$ values for 1,3,5-triazinanes and their derivatives. 11.46 to 15.30 values were obtained for triazinanes and 7.9 and 10.44 for the corresponding sodium salts, which confirms the basic character of the triazines.

Reaction monitoring and quantification of H_2S scavenging agents was performed through several methodologies. 1H NMR spectroscopy was not only the most adequate, but also unprecedentedly used for this purpose. Results indicated that the reaction is faster at 20°C, in pH 7 and 10. In addition, the method was efficient when the compounds show peaks unequivocally attributed at working temperature; therefore, the reaction products were clearly observed and quantified.

The scavenging reaction was also monitored qualitatively through indicator paper soaked in lead acetate, which enabled the verification of 1,3,5-triazinane and 1,3,5-triazine scavenging activity.

A mesoionic compound from the 4'-chloro-3'-nitro-phenyl-1,2,3-oxadiazole-2-olato sydnone class was also synthesised, and subsequently converted to the corresponding triazinane in regular yield. 4'-chloro-3'-nitro-phenyl-1,2,3-oxadiazole-2-olato showed good results when evaluated for anti-inflammatory and immunosuppressive activity.

Key words: heterocyclics; 1,3,5-triazinane; H_2S scavenging agents; 1,3,5-triazine; mesoionic compounds; sydnone.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Heterocílicos

Os compostos heterocílicos são compostos orgânicos cíclicos que contém ao menos um heteroátomo na sua cadeia cíclica, apresentando átomos de nitrogênio, oxigênio e enxofre como os heteroátomos mais comuns. Esses compostos podem ser classificados conforme a quantidade de insaturações da sua estrutura cíclica, podendo ser saturados ou insaturados, e este último ainda pode ser aromático ou não aromático.

Os compostos heterocílicos constituem uma classe de grande importância e aplicabilidade e, dentre todas as classes existentes de heterocílicos. Os que apresentam maior interesse, atualmente, são os compostos heterocílicos nitrogenados, pois estes apresentam uma gama de atividades, tais como: corante, atividade antitumoral, herbicida, atividade anticorrosiva, anti-inflamatório, analgésico, etc. (OSUGI *et al.*, 2004; DUNKLEY *et al.*, 2003; KAMBLE *et al.*, 2009; DESHPANDE *et al.*, 2012)

Neste trabalho de tese foram estudadas três classes de heterocílicos nitrogenados: triazinanas, triazinas e sidnonas, tendo como principal temática a obtenção e determinação de parâmetros físico-químicos de novos agentes sequestrantes de H₂S para aplicação na indústria de petróleo e, como foco secundário, a atividade biológica.

1.2 O H₂S na Indústria Petrolífera: Origem, Propriedades e Toxicidade

Embora os processos de produção do petróleo tenham tido grandes avanços tecnológicos nos últimos anos, ainda existem diversos problemas a serem superados tais como a formação de emulsões e incrustações, corrosão, além da produção de H₂S. Dentre estes o agente de risco mais temido é o H₂S, também conhecido por gás sulfídrico, gás de ovo podre, gás de pântano, etc.

O gás sulfídrico é um gás incolor, de odor desagradável em baixas concentrações, extremamente tóxico, corrosivo e mais denso do que o ar; ele pode originar-se de diversas fontes e na maioria das vezes é resultado de processos de biodegradação.

Na indústria do petróleo o H₂S poderá estar presente nos reservatórios de petróleo e nos campos onde há injeção de água do mar, podendo estar presente naturalmente ou aparecer após a entrada da produção do campo. Pode ser resultante de mecanismos de dissolução de minerais na forma de sulfetos, da decomposição de sulfatos orgânicos, etc. Ele pode ser encontrado desde pequenas quantidades até altas concentrações, da ordem de 30 %. (TORRES *et al.*, 2006)

Dentre os mecanismos descritos na literatura para geração do H₂S nos campos de óleo e gás natural os mais evidentes são: o mecanismo bacteriano, o termoquímico associado à oxidação de hidrocarbonetos e o termoquímico relativo ao craqueamento térmico de matéria orgânica rica em compostos sulfetados. Os mecanismos de geração de H₂S necessitam de uma fonte de enxofre, tais como: sulfato solúvel (SO₄²⁻) em sedimentos marinhos, sulfato de cálcio (CaSO₄) ou sulfato de bário (BaSO₄); um mediador como as bactérias ou aumento da temperatura de sub-superfície e um agente catalisador cuja presença implicará na velocidade da reação de oxi-redução (MAINIER & RODRIGUEZ, 1994).

A ação tóxica do sulfeto de hidrogênio nos seres humanos é conhecida desde o século XVIII, e os efeitos variam dependendo da concentração e do tempo de exposição ao gás. A tabela 1 mostra alguns dos efeitos do gás sulfídrico nos seres humanos.

Tabela 1: Efeito do sulfeto de hidrogênio nos seres humanos.
(MAINIER & ROCHA, 2003)

Concentração H_2S (ppm)	Tempo de Exposição	Efeito nos Seres Humanos
0,05 - 5	1 min	Detecção do odor característico
10 - 30	6 - 8 h	Irritação dos olhos
50 – 100	30 min – 1 h	Conjuntivite, dificuldades de respiração
150 - 200	2 - 15 min	Perda de olfato
250 - 350	2 - 15 min	Irritação dos olhos
350 - 450	2 - 15 min	Inconsciência, convulsão.
500 - 600	2 - 15 min	Distúrbios respiratórios e circulatórios
700 – 1500	0 - 2 min	Colapso, morte.

Geralmente a produção de H_2S nas plataformas está associada com a água coproduzida, que é um grande problema nas atividades de exploração, perfuração e extração de petróleo. A quantidade de água produzida com óleo associado varia muito durante a extração de petróleo. Inicialmente, um campo produz pouca água, variando entre 5 a 15 % da corrente produzida. Entretanto à medida que a vida econômica dos poços vai se esgotando, o volume de água pode aumentar significativamente, correspondendo a uma faixa de 75 a 90 %. O tratamento anaeróbico desse efluente, contendo altas concentrações de sulfato, apresenta problemas relacionados principalmente à produção de sulfeto devido à presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS). (SILVA, 2007)

Este problema tende a ser agravado por condições do tipo: estagnação, anaerobiose, presença de nutrientes (fontes de enxofre, como o sulfato presente na água produzida e na água do mar) e temperatura adequada ao crescimento do grupo de bactérias presentes no meio.

A contaminação por BRS nas instalações de superfície, planta de processo e tanques, e, também, dos oleodutos por estas bactérias, aliada a condições favoráveis ao seu desenvolvimento pode acarretar em geração de H_2S , como resultado de seu metabolismo.

A composição química da água de formação apresenta salinidade que pode chegar a 200.000 mg/L e no caso de reservatórios carbonáticos, altas concentrações de cálcio em equilíbrio com CO_2 presente na fase gasosa. A diminuição da pressão, no processo de produção do petróleo favorece a liberação do CO_2 e consequentemente a precipitação do carbonato de cálcio. Precipitações de sulfato de bário e estrôncio são comuns e resultam da incompatibilidade entre a água de formação contendo bário e estrôncio e a água do mar, rica em sulfato, utilizada para manter a pressão dos reservatórios favorecendo a incrustação inorgânica. (OLIVEIRA, 2000)

Os efeitos de incrustação e corrosão estão intrinsecamente relacionados entre si, bem como com o nível da concentração de H_2S e dos íons Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} e ainda, com a faixa de pH tornando a questão bastante complexa.

Devido à ação corrosiva do H_2S sobre os materiais metálicos, que tem mostrado ser generalizada, localizada e, por muitas vezes, dependendo da ação de esforços mecânicos pode resultar, quase sempre, em deteriorações ou fraturas nos equipamentos e tubulações onde este gás se encontra. As figuras 1 e 2 mostram fotos de tubulações que sofreram corrosão devido ao H_2S . (MAINIER *et al.*, 2007)

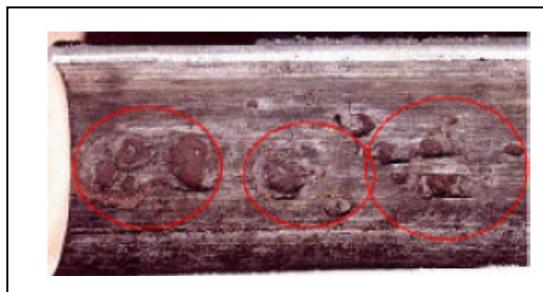


Figura 1. Corrosão por H_2S em água de formação.
(MAINIER & ROCHA, 2003)

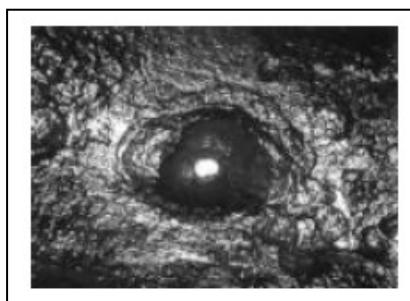


Figura 2. Corrosão microbiológica provocada por H_2S .
(MAINIER & ROCHA, 2003)

1.3 Corrosão ocasionada por sulfeto de hidrogênio

A corrosão ocasionada por H_2S pode abranger vários níveis tais como, deterioração total, parcial, superficial ou estrutural dos materiais seja por ataque químico ou eletroquímico, associado ou não aos efeitos mecânicos, sendo assim sumariamente classificada como corrosão química e corrosão eletroquímica.

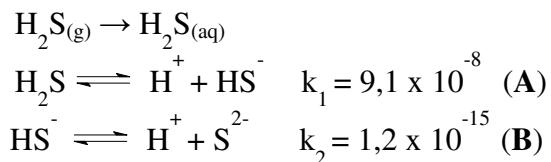
1.3.1 Corrosão química causada pelo sulfeto de hidrogênio

A corrosão química causada pelo sulfeto de hidrogênio ocorre pelo ataque do sulfeto de hidrogênio anidro diretamente sobre o material metálico, sem a presença de solventes, como a água, e sem a ocorrência de uma reação redox (transferência de elétrons de uma área para outra). Primeiramente, o gás (H_2S) é adsorvido na superfície do metal ou liga e, posteriormente, ocorre o ataque, acarretando a formação de uma película de sulfeto. A película de sulfeto formada possui várias propriedades, mas em geral elas dependem de alguns fatores tais como: da afinidade do metal com H_2S , da rugosidade, da temperatura e da pressão. O aumento da taxa de corrosão ocorrerá se houver o aumento da temperatura, da pressão ou da concentração de sulfeto de hidrogênio, gerando assim uma película porosa e não aderente na superfície do metal. Alguns aços-carbono de baixa liga podem formar uma película protetora, que acaba funcionando como uma "barreira" útil contra o intemperismo, o que torna este material mais resistente do que outros aços (GENTIL, 1996; MAINIER *et. al.*, 2007).

1.3.2 Corrosão eletroquímica associada ao sulfeto de hidrogênio

Ocorre espontaneamente, em geral, quando um eletrólito se encontra em contato direto com o metal ou liga, ocorrendo, as reações anódicas e catódicas simultaneamente. O condutor metálico é responsável pela transferência dos elétrons da região anódica para a catódica, e a difusão de ânions e cátions ocorre na solução, fechando o circuito elétrico. A intensidade do processo de corrosão é avaliada pelo número de cargas de íons que se descarregam no catodo ou, então, pelo número de elétrons que migram do anodo para o catodo (GENTIL, 1996; MAINIER *et. al*, 2007).

Neste caso, o eletrólito é uma solução de sulfeto de hidrogênio em água, dissociando-se segundo as reações:



Observando as constantes de dissociação (K_1 e K_2) que mostram a fração molar das espécies químicas: H_2S (aq), HS^- (sulfeto ácido) e S^{2-} (sulfeto) em função do pH, verifica-se, que a probabilidade do acontecimento da dissociação (A) é cerca de 10^8 vezes maior do que a dissociação (B), significando, a pouca probabilidade da existência de íons S^{2-} (sulfeto) em pH ácido. No entanto, uma relevante fração de HS^- (sulfeto ácido) ocupa uma faixa de pH entre 4,5 e 12.

A corrosão eletroquímica associada ao sulfeto de hidrogênio pode ser ainda classificada em: corrosão por pite em presença de H_2S , corrosão microbiológica por ação das bactérias redutoras de sulfato, corrosão sob tensão e corrosão sob fadiga.

1.3.2.1 - Corrosão por pite em presença de H_2S

Esta forma de corrosão eletroquímica geralmente ocorre em pontos ou em pequenas regiões localizadas na superfície metálica, formando pequenas cavidades e com profundidade maior que seu diâmetro. Ocorre em metais ou ligas que se passivam ou que formam películas de produtos de corrosão sobre a superfície metálica (GENTIL, 1996). O mecanismo representativo da corrosão do aço-carbono (Fe) em soluções aquosas contendo sulfeto de hidrogênio, em pH ácido, é apresentado na figura 3 e o aspecto da corrosão por pite na figura 4.

Pode-se afirmar, que quanto menor o pH maior será esta corrosão. A formação e/ou precipitação do sulfeto ferroso (FeS) nas proximidades das regiões com pite pode ser explicada pelo aumento da concentração dos íons OH^- que promovem, consequentemente, o aumento do valor do pH e a alcalinização da reação: $\text{HS}^- + \text{OH}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{S}^{2-}$

O produto das concentrações de Fe^{2+} e S^{2-} na solução atingem o valor do produto de solubilidade e, por conseguinte formam o sulfeto ferroso com base na reação: $\text{Fe}^{2+} + \text{S}^{2-} \rightarrow \underline{\text{FeS}}$

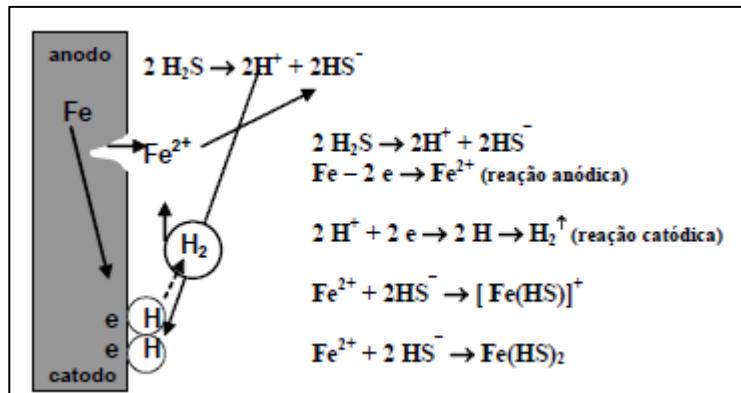


Figura 3. Mecanismo de corrosão por pite
(MAINIER *et. al*, 2007)

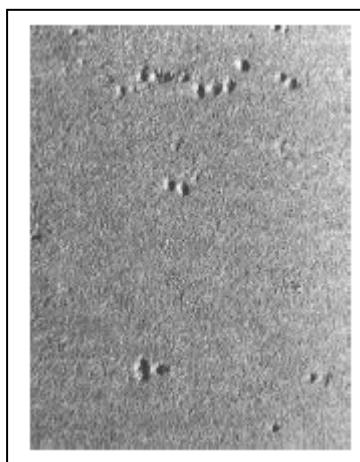


Figura 4. Corrosão por pite.
(MAINIER *et. al*, 2007)

1.3.3 - Corrosão microbiológica por bactérias redutoras de sulfato

A corrosão microbiológica é a corrosão do material metálico sob a influencia de microrganismos muito comum de ocorrer em sistemas de refrigeração, nos trocadores e dutos que utilizam água do mar, nos tanques de petróleo, na recuperação secundária de petróleo, nas unidades de tratamento de efluentes, nas linhas de incêndio, nas tubulações enterradas, etc. (GENTIL, 1996).

O mecanismo mais aceito é a formação, na superfície metálica, de um biofilme por meio de bactérias sésseis que, através da elaboração de polímeros extracelulares, envolvem e aglutinam as células protegendo-as contra as condições adversas do meio corrosivo. Após a fixação destas bactérias na superfície metálica e o meio corrosivo contendo nutrientes há o crescimento e a multiplicação da bactéria. O biofilme vai crescendo e outros microrganismos como fungos e algas podem aderir a este biofilme (MAINIER *et. al*, 2007).

No caso das bactérias redutoras de sulfato (BRS), alguns parâmetros são fundamentais no desenvolvimento do processo de geração de H_2S , entre eles destacam-se:

- a ausência de oxigênio no meio reacional facilita o desenvolvimento deste tipo de bactéria;
- a temperatura em uma faixa de 30 a 40 °C promove o crescimento do processo microbiológico;

- concentrações acima de 100 mg/L de sulfato em solução podem ser considerados como fonte de enxofre necessária ao processo;
- o pH na faixa de 5,5 a 8,5 promove o desenvolvimento do processo corrosivo, embora o valor ideal do pH seja de 7,2. Porém, em pH superior a 11 não há desenvolvimento do processo microbiológico;
- a presença de nutrientes, matéria orgânica e cloretos solúveis aumentam a probabilidade do desenvolvimento microbiológico.

A figura 5, a seguir, mostra as formas de corrosão microbiológica em tubos de aço-carbono provocada por bactéria redutora de sulfato em condições anaeróbicas.

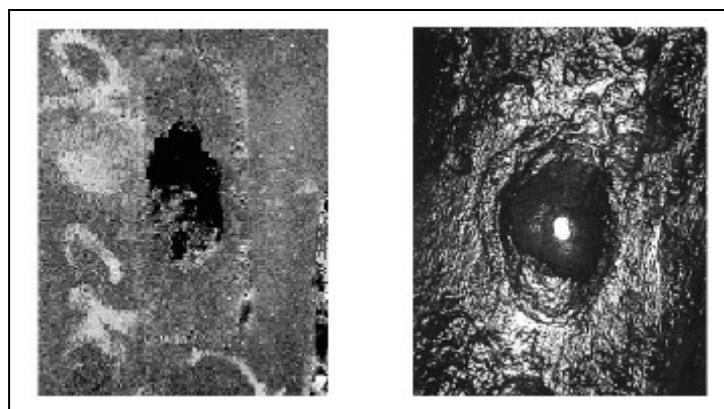


Figura 5. Aspecto de corrosão microbiológica em aço-carbono.
(MAINIER *et. al*, 2007)

1.3.4 - Corrosão sob tensão na presença de H₂S

Corrosão sob tensão é definida como fratura de certos materiais, quando tensionados em certos ambientes, sob condições tais que nem o esforço mecânico e tampouco a corrosão ambiente, isoladamente conduziriam a fratura. Este tipo de corrosão decorre principalmente da interação do metal com o meio, resultando em modificações localizadas de suas propriedades mecânicas, implicando em fraturas frágeis (GENTIL, 1996).

No caso do H₂S, quando se utiliza, por exemplo, aços-carbono de média e/ou de alta resistência mecânica, sujeitos a esforços de tração em meios contendo até pequenas quantidades de H₂S, pode ocorrer o processo conhecido como corrosão sob tensão fraturante em presença de sulfetos (SSCC - *sulfite stress corrosion cracking*). Um dos mecanismos aceitos para explicar este processo consiste na geração de hidrogênio atômico (H) produzido junto às regiões de pites e/ou trincas pela redução catódica de íons H⁺ conforme mostram as reações e a figura 6, a seguir:

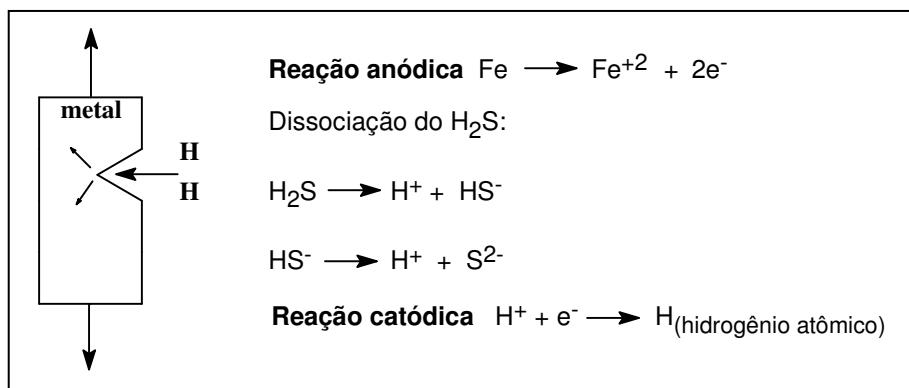


Figura 6. Mecanismo da corrosão sob tensão na presença de H_2S .

Parte do hidrogênio atômico gerado, devido à sua pequena dimensão, pode penetrar através de um pite ou de uma trinca na estrutura cristalina do aço, se alojando junto às discordâncias da estrutura atômica, microtrincas, inclusões ou vazios. A presença do hidrogênio atômico dissolvido na matriz facilita as movimentações de defeitos lineares submicroscópicos na estrutura cristalina do material.

Vários são os fatores que afetam a probabilidade de ocorrência de corrosão sob tensão em materiais metálicos, tais como, concentração de H_2S , temperatura, pressão total, pH, tempo de exposição, tensão total aplicada, propriedades do material (composição química, resistência à tração, dureza, tratamento térmico, microestruturas, etc.), além de impurezas e defeitos que podem existir (MAINIER *et. al.*, 2007).

1.3.5 - Corrosão sob fadiga na presença de H_2S

Tipo de corrosão muito comum quando o metal ou liga que é submetido às solicitações mecânicas alternadas se encontra em meio reacional contendo sulfeto de hidrogênio. Caracteristicamente, forma-se uma pequena trinca, geralmente num ponto de concentração de tensões que penetra lentamente no material metálico, numa direção perpendicular à tensão aplicada.

Após certo período de tempo, a área do elemento se reduz de tal modo que não mais pode suportar a carga aplicada e se rompe numa fratura final e repentina. A literatura tem apresentado casos de corrosão sob fadiga com fraturas drásticas e consequentes vazamentos de H_2S para o meio ambiente acarretando em poluição e até mortes. A corrosão sob fadiga de aços-carbono na presença de H_2S é função da dureza do aço, da tensão aplicada, dos movimentos cíclicos e/ou alternados, da concentração de H_2S e do pH (GENTIL, 1996; MAINIER *et. al.*, 2007).

1.4 Classificação e utilização de agentes sequestrantes de H_2S

A redução do teor e remoção de H_2S são frequentemente requeridas na produção de petróleo devido a questões de segurança, meio-ambiente e corrosão. São vários os métodos de remoção de H_2S utilizados em correntes monofásicas ou multifásicas, com inúmeros trabalhos disponíveis na literatura.

Em correntes no qual o teor de H₂S é de 55 a 140 ppm se faz necessária a adição de agentes sequestrantes. A presença dos agentes sequestrantes pode elevar o pH da água de formação favorecendo, também a incrustação.

Existem 4 (quatro) tipos principais de agentes sequestrantes de H₂S:

- i) sequestrantes líquidos,
- ii) sequestrantes sólidos,
- iii) sequestrantes líquidos que atuam em processos de oxi-redução e
- iv) sequestrantes cuja ação ocorre via formação de complexos e são utilizados para remoção de grandes quantidades de H₂S, mas com alto custo.

Os sequestrantes líquidos são usados em geral para a remoção de concentrações relativamente baixas de H₂S, menos de 50 Kg/dia, normalmente utilizados na indústria de gás natural (NAGL, 2001).

Os sequestrantes sólidos são baseados em materiais a base de ferro que absorvem H₂S, que pode ser desorvido e os sequestrantes reutilizados. São geralmente utilizados na remoção de 50-200 Kg/dia de H₂S (NAGL, 2001).

Os sequestrantes líquidos de oxi-redução atuam na oxidação do H₂S a enxofre elementar basicamente fazendo uso de metais para isso. Eles são frequentemente utilizados quando a remoção de H₂S está entre 200-2000 Kg/dia (NAGL, 2001).

Já os sequestrantes cuja ação ocorre via formação de complexos, tais como aminas como a MEA (monoetanolamina) e MDEA (metil-dietilamina), são utilizadas com subsequente tratamento destes complexos com catalisadores que tem a função de oxidar o H₂S complexado a enxofre elementar. Este processo somente é utilizado para a remoção de mais de 20 tons/dia (NAGL, 2001).

1.5 Triazinanas

As triazinanas são compostos cíclicos similares ao cicloexano sendo que em sua estrutura três dos átomos de carbono são substituídos por nitrogênio apresentando assim três isômeros possíveis, 1,2,3-triazinana, 1,2,4-triazinana e a 1,3,5-triazinana como mostra a figura 7.

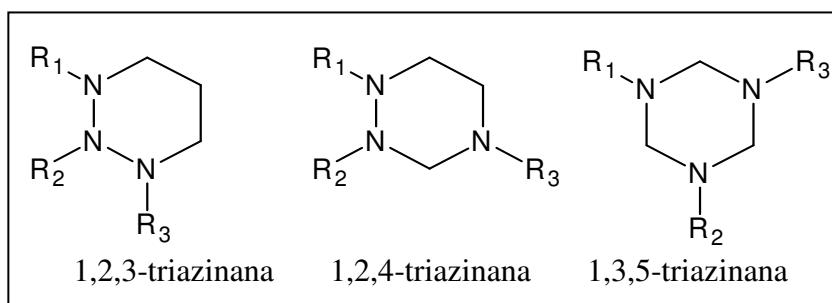


Figura 7. Estruturas genéricas dos isômeros das triazinanas.

Dentre esses compostos as 1,3,5-triazinanas são os compostos de maior interesse dentre as triazinanas, pois apresentam várias aplicações, tais como a atividade sequestrante de H₂S, relatada em vários trabalhos e patentes (BAKKE *et al.*, 2001; Patente CA 2 491 973 A1, 2005; Patente US005554349A, 1996; Patente US20100107476 A1, 2010; Patente WO 2008/027721 A1, 2008; Patente WO 2009/127604 A2, 2009; TAYLOR *et al.*, 2010), atividade inseticida (Patente US20010046994A1, 2001) e fungicida (Patente WO2009/132342 A1, 2009), além de outras, se tornando assim o foco neste trabalho de tese.

1.5.1 A ação da 1,3,5-triazinana como sequestrante de H₂S

Dentre os sequestrantes líquidos mais modernos e mais utilizados devido a sua eficiência está a amina cíclica 1,3,5-tris(2-hidroxietil)-1,3,5-triazinana, figura 8, denominada erroneamente de “triazina”, que atua em meios com baixas a médias concentrações de H₂S.

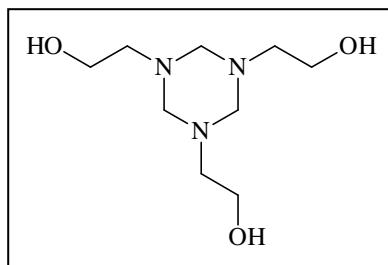


Figura 8. Estrutura da 1,3,5-tris(2-hidroxietil)-1,3,5-triazinana.

A triazinana é utilizada em solução aquosa de 50% (v/v), reage rápida e seletivamente com o H₂S removendo-o em quase 99,9 %. Sua solubilidade em água é favorecida devido aos três grupos hidroxila presentes na estrutura. No entanto, uma das desvantagens no uso da triazinana envolve a sua hidrólise à baixos valores de pH do meio. A ação da triazinana como sequestrante de H₂S leva a formação de subprodutos biodegradáveis e solúveis em água, ou seja, a etanolamina e a 5-(2-hidroxietil)-1,3,5-ditiazinana assim como mostra a figura 9.

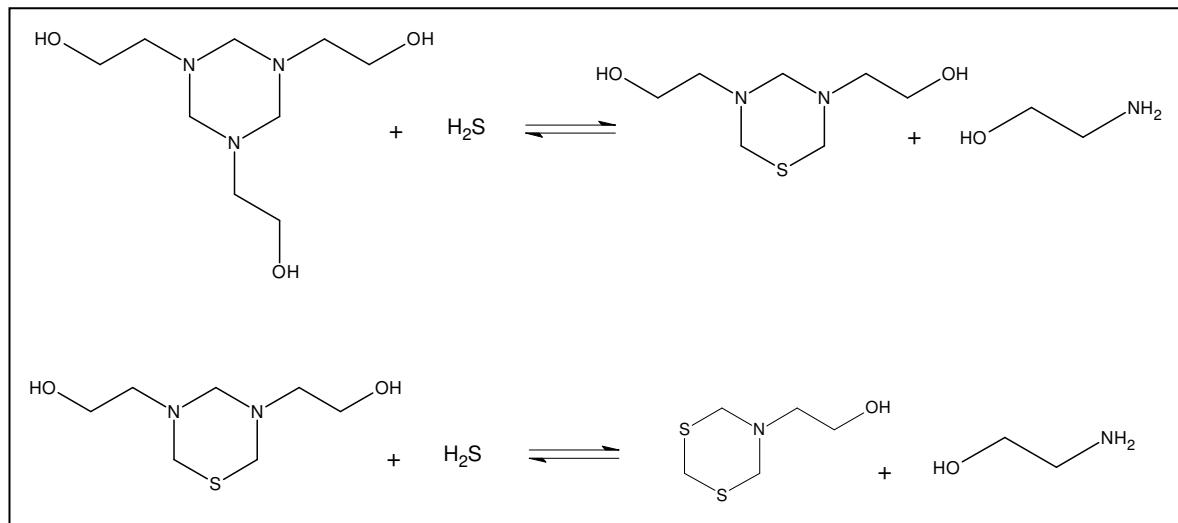


Figura 9. Esquema reacional do efeito sequestrante da triazinana sobre o H₂S.

Assim, a busca por novos agentes sequestrantes de H₂S torna-se importante estratégia para melhoria da eficiência, bem como para dotar o País de novas moléculas e tecnologias para sua utilização nas condições da produção do petróleo, especialmente no momento atual, na camada do sub-sal.

1.5.2 Síntese das 1,3,5-triazinanas

As triazinanas são sintetizadas a partir da reação de condensação entre uma amina primária e formaldeído, sendo que inicialmente é produzida uma imina (SMOLIN & RAPOPORT, 1959). Devido a instabilidade da imina formada ela imediatamente reage através de ciclização intermolecular levando a 1,3,5-triazinana correspondente, assim como mostra a figura 10.

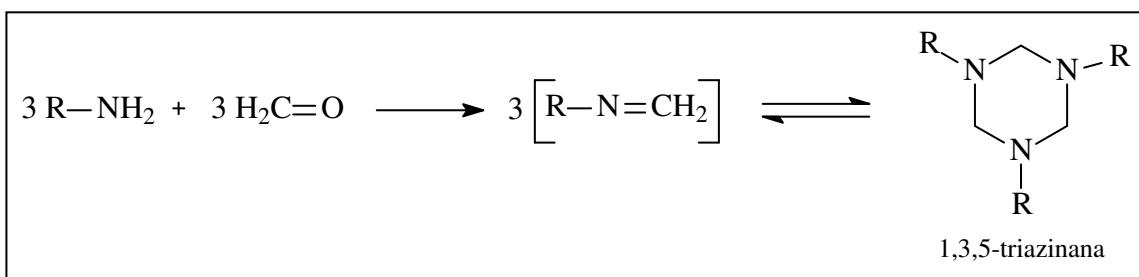


Figura 10. Reação genérica de formação da triazinana.

Poucos métodos de obtenção de triazinanas são relatados na literatura, e a maioria deles somente apresenta pequenas modificações da síntese mostrada na figura 10. A figura 11 exemplifica um caso para a reação genérica acima (GUILLEMIN *et al.*, 1985).

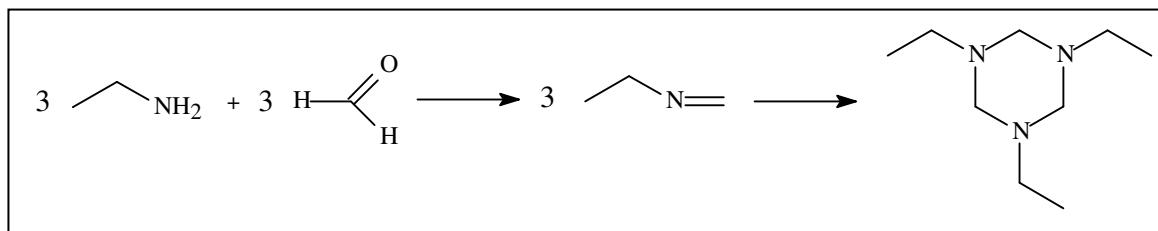


Figura 11. Reação para a obtenção da 1,3,5-trisetil-1,3,5-triazinana.

Um exemplo de modificação da síntese convencional é mostrado na figura 12 (Patente WO 2007/069685 A1, 2007).

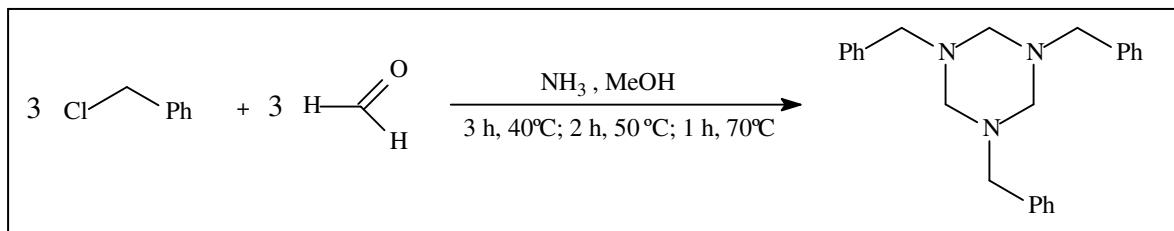


Figura 12. Modificação de síntese para a obtenção da 1,3,5-trisbenzil-1,3,5-triazinana.

1.6 Triazinas

As triazinas pertencem a uma classe de compostos aromáticos que possuem um anel heterocíclico em sua estrutura, similarmente ao benzeno, no entanto três dos átomos de carbono são substituídos por nitrogênio, havendo assim três isômeros desta classe, analogamente as triazinanas, como mostra a figura 13.

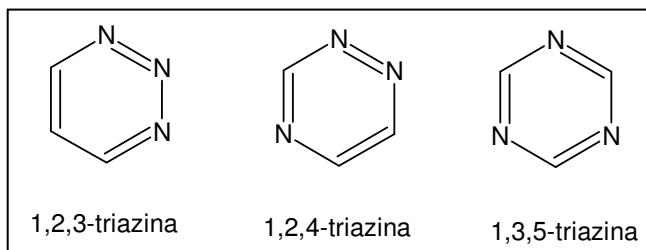


Figura 13. Estruturas dos isômeros da triazina.

Os compostos derivados da 1,3,5-triazinas são os mais extensivamente estudados por apresentarem uma maior gama de aplicações e por este motivo e pelo fato de apresentarem certa similaridade com as triazinanas utilizadas neste trabalho, também se tornaram nosso objeto de estudo.

1.6.1 Aplicações das 1,3,5-triazinas

O derivado mais conhecido de 1,3,5-triazina é a melamina com três substituintes amino nas posições 2,4,6, utilizado na fabricação de resinas, plásticos e produtos anti chama, devido a capacidade de liberação de nitrogênio quando aquecida (OECD Screening Information Data Set (SIDS): Melamina). Outra triazina amplamente utilizada em resinas é a benzoguanamina. A figura 14 mostra as estruturas da melamina e da benzoguanamina.

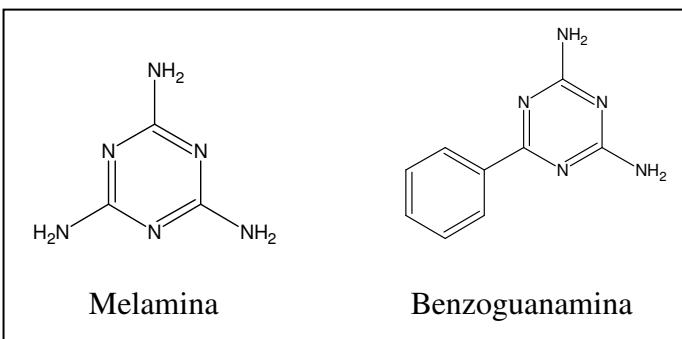


Figura 14. Estruturas da melamina e da benzoguanamina.

Compostos triazínicos são muitas vezes utilizados como base para vários herbicidas, sendo os mais comuns os da família das 1,3,5-triazinas, os quais subdividem-se em três grupos: clorotriazinas, metiltiotriazinas e metoxitriazinas. Esta classificação ocorre de acordo com o grupo substituinte da posição 2 do anel que poderá ser um átomo de cloro (Cl) (clorotriazinas), um grupo SCH_3 (metiltiotriazinas) ou OCH_3 (metoxitriazinas). Um exemplo de herbicida muito utilizado no controle pré e pós emergência de plantas infestantes de diversas culturas agrícolas, normalmente milho, sorgo e cana de açúcar é a atriazina (2-cloro-

4-etilamino-6-isopropilamino-*s*-triazina). A atrazina, à semelhança do que se verifica para outras *s*-triazinas ou 1,3,5-triazinas, atua por inibição da fotossíntese, em particular ao nível do fotossistema II, conduzindo ao bloqueio do transporte eletrônico. As plantas sensíveis à atrazina sofrem de cloroze (amarelecimento das folhas) a qual conduz à necrose dos tecidos. Nas espécies tolerantes à atrazina, como é o caso do milho, o herbicida é eficientemente metabolizado em formas não tóxicas (PRADE *et al.*, 1998). A figura 15 ilustra a forma estrutural da atriazina.

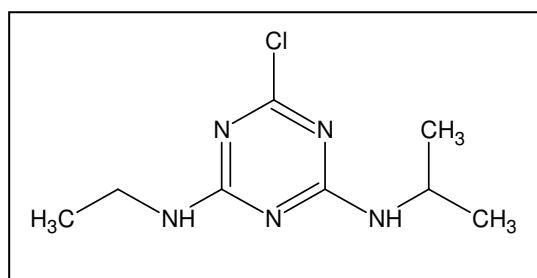


Figura 15. Forma estrutural da atriazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-*s*-triazina).

As cloro-triazinas substituídas também são utilizadas como corantes reativos. Estes compostos reagem através de um grupo de cloro com grupos hidroxilas presentes nas fibras de celulose por reação de substituição nucleofílica. A figura 16 ilustra como ocorre a fixação das cloro-triazinas ao tecido. A figura 17 mostra a forma estrutural do Blankophor B, um corante utilizado como branqueador (ESTEVES *et al.*, 2004).

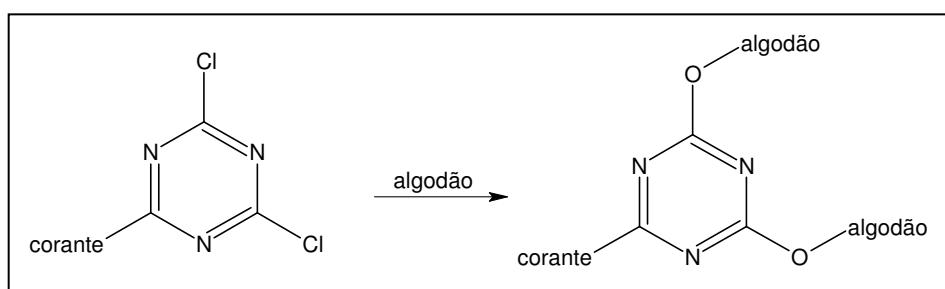


Figura 16. Reação de fixação das cloro-triazinas ao tecido.

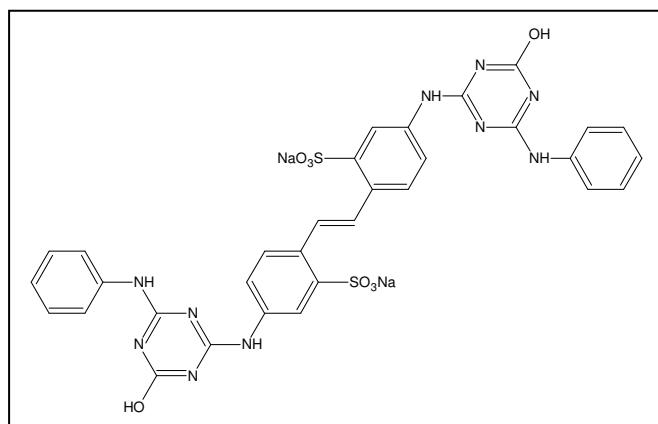


Figura 17. Forma estrutural do Blankophor B

Corantes reativos, como o derivado triazínico Procion Green HE-4BD (figura 18), também são empregados na purificação de proteínas que podem ser separadas de misturas estruturalmente complexas através da técnica de cromatografia de afinidade. Neste método se usam colunas contendo suportes, tais como agarose, celulose, poliacrilamida, sephadex, sílica e vidro, derivatizados com os corantes reativos (OSUGI *et al.*, 2004). A figura 18 mostra a estrutura do Procion Green HE-4BD.

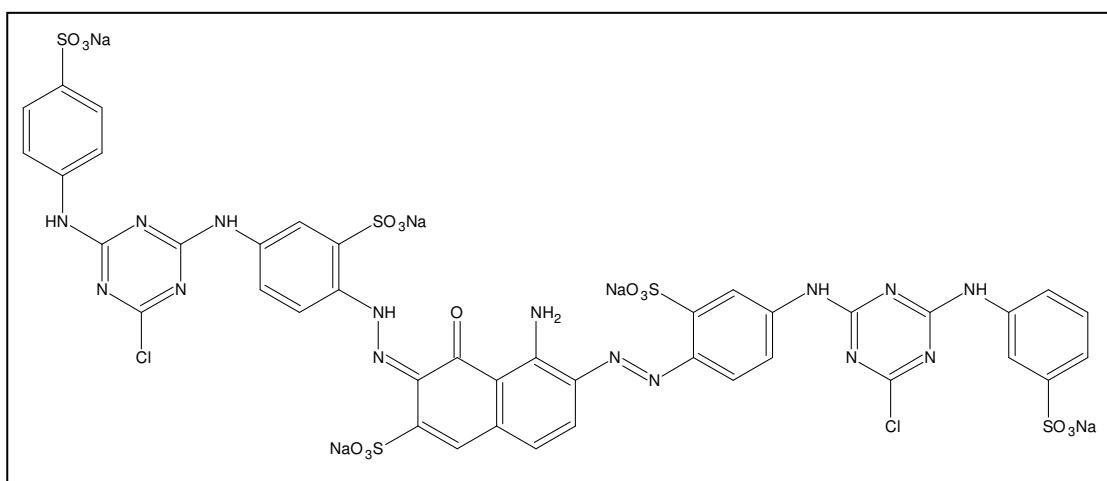


Figura 18. Estrutura do Procion Green HE-4BD (RG19).

Pastorin *et al.*, 2010, demonstrou que derivados da 1,2,4-triazolo[1,5-a]-1,3,5-triazina tem atuado como antagonistas do receptor de adenosina A_{2A}. A ativação ou bloqueio dos ARs (receptores de adenosina) são responsáveis por uma gama de efeitos em vários sistemas do nosso organismo levantando a possibilidade de que a regulação dos ARs tenha potenciais aplicações terapêuticas. Os efeitos cardioprotetores e neuroprotetores associados com a ativação AR têm sido claramente demonstrados durante os períodos de isquemia cardíaca e cerebral, respectivamente. Além disso, o uso de antagonistas do AR para os distintos subtipos poderia ser útil no tratamento da asma ou certas doenças neurológicas como o mal de Parkinson. A figura 19 mostra uma estrutura geral da 1,2,4-triazolo[1,5-a]-1,3,5-triazina.

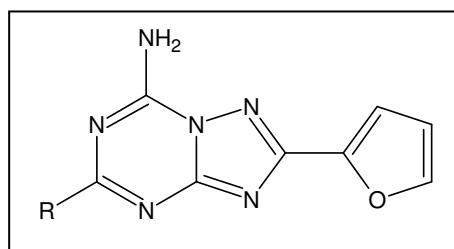


Figura 19. Estrutura genérica de derivados 1,2,4-triazolo[1,5-a]-1,3,5-triazina

Outra atividade de importância e amplamente explorada das 1,3,5-triazinas é a atividade anticancerígena, Brzozowski *et al.*, 2002 mostraram que derivados da 2-amino-4-(3,5,5-trimetil-2-pirazolino)-1,3,5-triazina possuem esse tipo de atividade. A figura 20 mostra a estrutura de um derivado triazínico que apresenta atividade antitumoral.

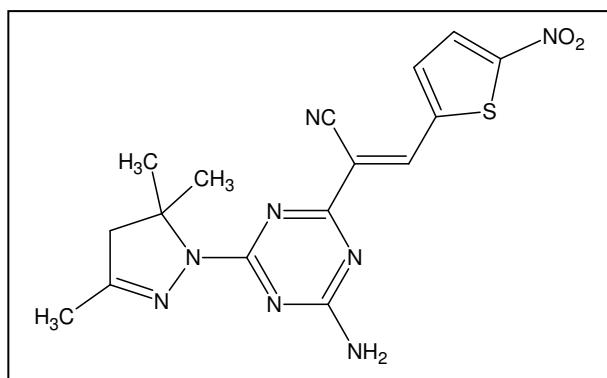


Figura 20. Estrutura de um derivado triazínico com atividade antitumoral (BRZOZOWSKI *et al.*, 2002).

1.6.2 Síntese de 1,3,5-triazinas

Vários métodos são descritos na literatura para a síntese de 1,3,5-triazinas. O método mais comum de preparação do sistema 1,3,5-triazínico envolve a trimerização de nitrilos, geralmente sob catálise ácida. As etapas propostas na literatura para esta trimerização estão mostradas na figura 21 (GRUNDMANN & KREUTZBERGER, 1954). A figura 22 mostra um exemplo de síntese de 1,3,5-triazina via trimerização de nitrila.

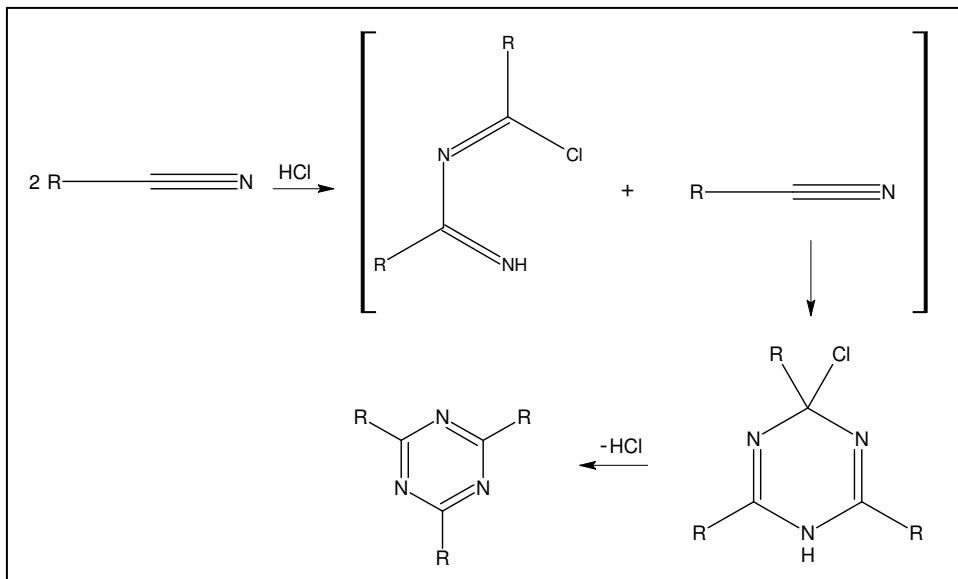


Figura 21. Etapas propostas para síntese de 1,3,5-triazinas via trimerização de nitrilas (GRUNDMANN & KREUTZBERGER, 1954).

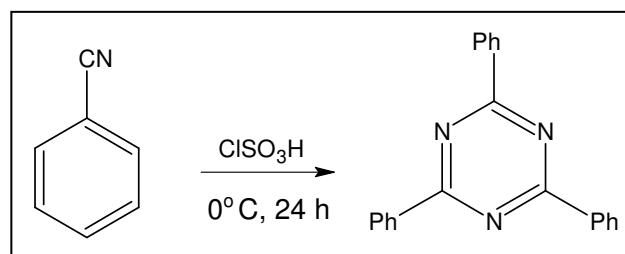


Figura 22. Síntese da 1,3,5-trifeniltriazina via trimerização de nitrila.

Outro método também muito usado utiliza a reação de substituição nucleofílica do cloreto cianúrico (2,4,6-tricloro[1,3,5]triazina), geralmente com alcoois ou aminas, podendo se obter triazinas simétricas ou não dependendo das condições do meio reacional (temperatura, solvente e excesso de reagente nucleofílico). A figura 23 demonstra uma síntese onde há a formação da 1,3,5-triazina via substituição nucleofílica do cloreto cianúrico.

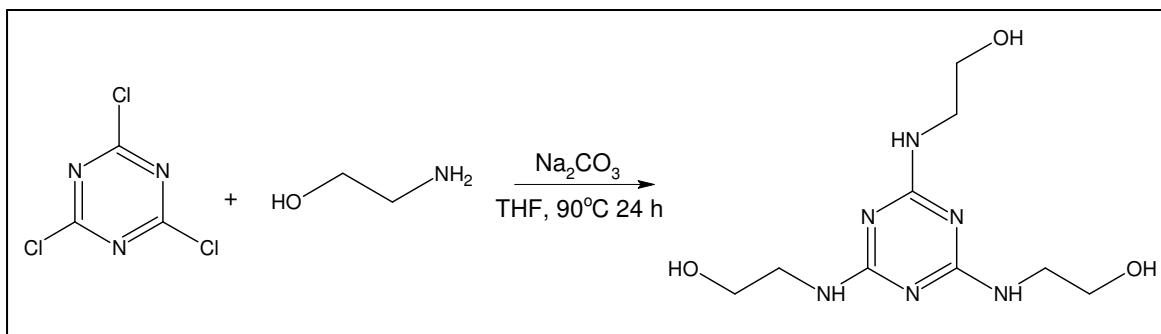


Figura 23. Síntese de um derivado triazinico via substituição nucleofílica do cloreto cianúrico.

Metodologias mais recentes demonstram que uma série de álcoois primários e aldeídos foram tratados com iodo e amônia em solução aquosa sob irradiação de microondas para originar as nitrilas intermediárias, que através de uma cicloadição [2 + 3] com dicianodiamida e azida de sódio levaram às correspondentes triazinas ou tetrazóis em altos rendimentos (SHIE & FANG 2007). A figura 24 exemplifica de maneira genérica esta metodologia.

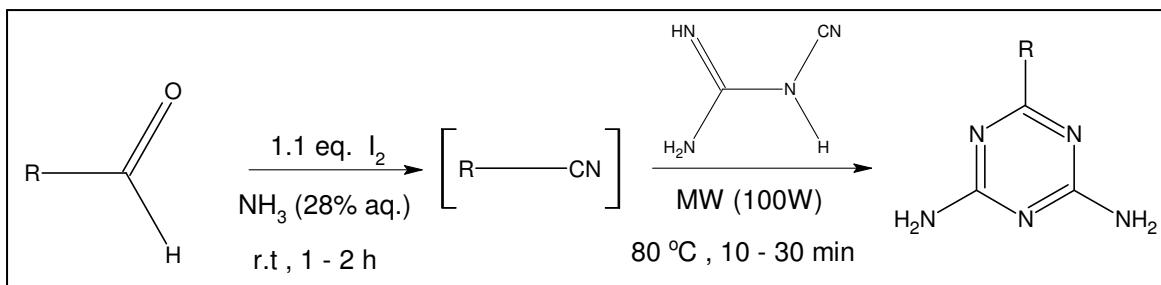


Figura 24. Exemplificação genérica da síntese de 1,3,5-triazinas através de reação de cicloadição [2 + 3].

Outra metodologia recente mostra que ácidos carboxílicos reagem, quando ativados com uma quantidade estequiométrica de dimetil-imidodicarbonimidato de zinco, em uma solução de piridina e CH_2Cl_2 na presença de peneira molecular para formar 4,6-dimetoxi-1,3,5-triazinas, em altos rendimentos (OUDIR *et al.*, 2006). A figura 25 mostra de maneira geral a metodologia de síntese de 1,3,5-triazinas com utilização de peneira molecular.

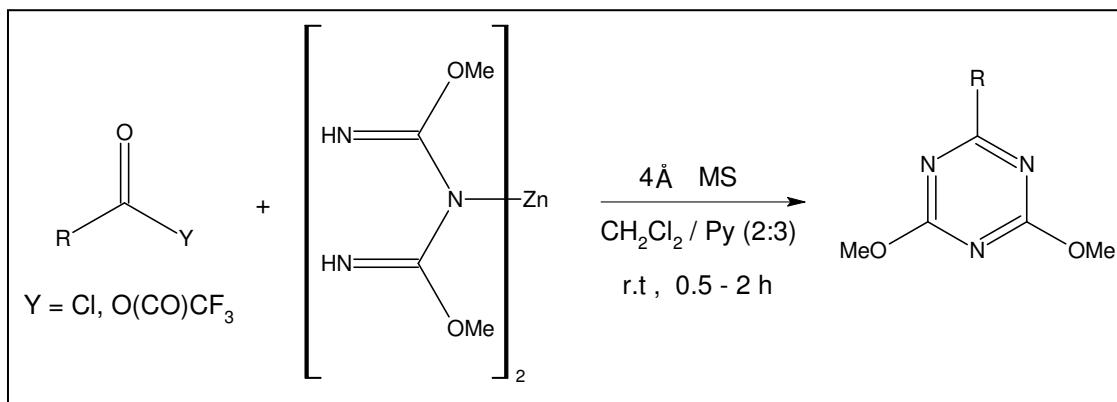


Figura 25. Exemplificação da síntese de 1,3,5-triazinas utilizando peneira molecular.

1.7 Sidnonas

As sidnonas, figura 26, são compostos heterocíclicos de caráter aromático, possuindo tamanho relativamente pequeno e alto momento dipolar devido a variação da densidade eletrônica ao redor do anel. Embora as moléculas sejam carregadas internamente elas são globalmente neutras, possuindo assim grande potencial de interação biológica (GRECO *et al.*, 1962; YEH *et al.*, 1989).

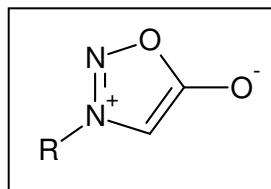


Figura 26. Representação genérica de uma sidnona.

1.7.1 Aplicação das Sidnonas

As sidnonas possuem várias atividades biológicas distintas. PATEL & MEHTA, (2010) mostraram que derivados cumarínicos de sidnonas (figura 27, A) são capazes de inibir, *in vitro*, o estabelecimento infeccioso da *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* causadores de várias patogêneses. Estes compostos mostram atividades bactericidas na faixa de 125 a 250 µg/mL sendo comparados com a penicilina e a ampicilina.

As sidnonas também possuem atividades anti-inflamatória e analgésica, como é relatado para as duas séries de derivados da 3-fenil-sidnona: série I 4-[1-oxo-3-(aril)-2-propenil]-3-fenilsidnonas e série II 3-[4-[3-(aril)-1-oxo-2-propenil]fenil]sidnonas (B e C respectivamente, figura 27) (SATYANARAYANA & RAO, 1995). Os compostos da série I foram mais eficazes, tanto em sua atividade anti-inflamatória quanto em sua ação analgésica, demonstrado pela diminuição do número de contorções induzidas por ácido acético (dose utilizada 100 mg/kg).

DUNKEY & THOMAN (2003) sintetizaram e comprovaram a atividade biológica de várias sidnonas *para*-fenil-substituídas (figura 27, D). Os compostos foram testados contra

três linhagens celulares cancerígenas: MCF7 (mama), NCI-H460 (pulmão) e SF-268 (sistema nervoso central). Os resultados indicaram que grupos retiradores de elétrons como substituintes exerciam uma importante ação antitumoral (cloro ou flúor apresentavam aproximadamente 32% de ação antitumoral).

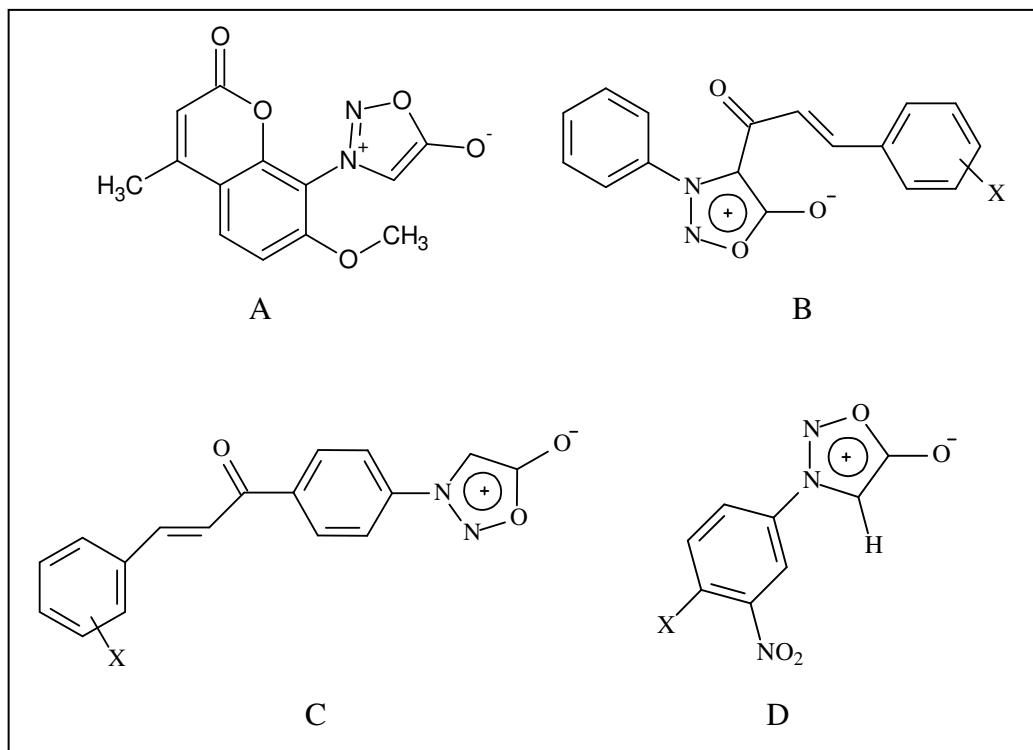


Figura 27. Estruturas de sidonas que mostraram atividade bactericida (A), anti-inflamatória, analgésica (B e C) e antitumoral (D) (PATEL *et al.*, 2010; SATYANARAYANA & RAO, 1995; DUNKEY & THOMAN, 2003; HALILA, 2005).

HALILA (2005) estudou o composto mesoionico 3-[4'-cloro-3'-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato, com substituinte *p*-Cl (figura 27, D) com o objetivo de determinar os efeitos sobre o metabolismo energético mitocondrial visando contribuir para o esclarecimento do mecanismo de ação envolvido na atividade antitumoral deste composto. Os resultados desses estudos indicaram a ação da sidnona na inibição do transporte de elétrons na cadeia respiratória, inibição da enzima glutamato desidrogenase, na redução da eficiência da fosforilação oxidativa levando aos possíveis efeitos na interação com a membrana mitocondrial interna.

1.7.2 Síntese das Sidnonas

O método clássico e amplamente utilizado para a síntese dos mesoiônicos da classe 1,2,3-oxadiazol-5-olato envolve a ciclização pela desidratação de uma nitroso-glicina conforme mostra a figura 28. (BRAZ, 1992)

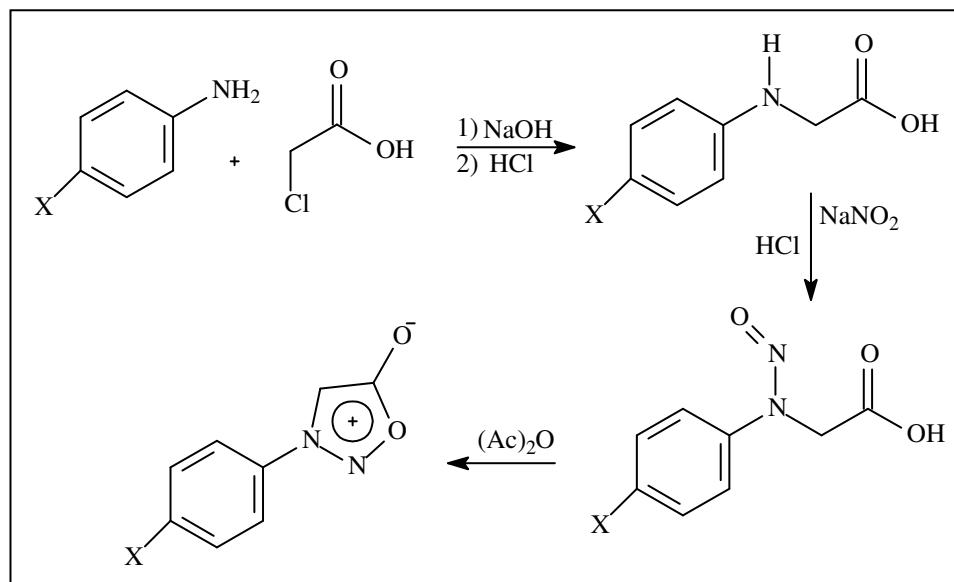


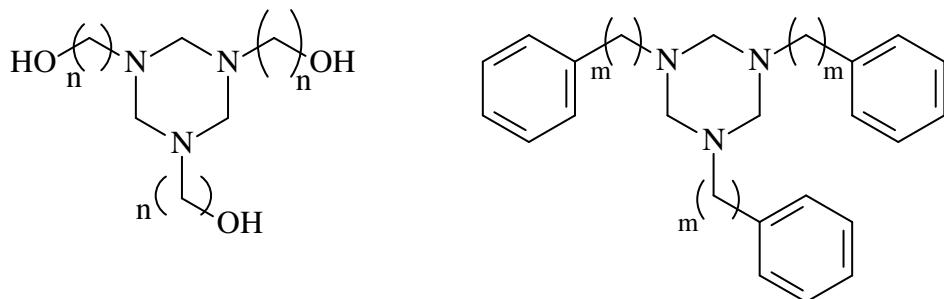
Figura 28. Rota sintética utilizada na preparação do sistema 1,2,3-oxadiazólio-5-olato (BRAZ, 1992).

2. OBJETIVOS

Os principais objetivos desta tese foram:

Parte 1

- a) Sintetizar novas séries de *N*-alquil-1,3,5-triazinanas e *N*-benzil-1,3,5-triazinanas com a seguinte estrutura geral:



Onde $n = 2$ e 3 ; $m = 1$ e 2

- b) Modificar as estruturas da série de *N*-alquil-1,3,5-triazinanas para a obtenção de moléculas mais solúveis em água através da adição de grupos sulfatos e fosfatos e, posteriormente base para obtenção dos sais correspondentes.
- c) Caracterizar por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono-13 as triazinanas obtidas.
- d) Avaliar a toxidez das triazinanas sintetizadas frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach.
- e) Determinar os valores de pKa das triazinanas sintetizadas.
- f) Avaliar a capacidade sequestrante de H_2S das moléculas sintetizadas utilizando-se as técnicas de iodimetria, potenciometria com eletrodo seletivo para HS^- (Ag/Ag_2S), por RMN de hidrogênio e por reação frente ao acetato de chumbo.

Parte 2

- a) Sintetizar novos derivados da 1,3,5-triazina utilizando metodologia tradicional a partir do cloreto cianúrico.
- b) Modificar as estruturas da série de *N*-alquil-1,3,5-triazinas para a obtenção de moléculas mais solúveis em água e menos tóxicas através da incorporação de grupos sulfatos.
- c) Caracterizar por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 as triazinas obtidas.
- d) Avaliar a atividade biológica dos derivados 1,3,5-triazínicos obtidos.
- e) Sintetizar a sidnona 3-(4'-cloro-3'-nitrofenil)-1,2,3-oxadiazólio-5-olato.
- f) Modificar a estrutura da sidnona obtida para a obtenção da triazinana respectivamente substituída.
- g) Caracterizar por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 os derivados da sidnona obtidos.
- h) Avaliar a atividade biológica dos derivados da sidnona obtidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e ^{13}C) foram obtidos em espetrômetro de marca Bruker, modelo AVANCE-200-400 MHz e BioSpin modelo Ultrashield Plus de 500 MHz (PPGQ-UFRRJ). Foi utilizado como referência interna o tetrametilsilano (TMS), e clorofórmio (CDCl_3), dimetilsulfóxido (DMSO) e água (D_2O) na solubilização das amostras. Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em unidade de partes por milhão (ppm).

Foi utilizado evaporador rotatório da marca Fisatom, modelo 550 e placas de aquecimento e agitação magnética da marca Corning.

O controle de temperatura foi feito por intermédio de termostato da marca Cole Parmer modelo 1268-14.

As medidas potenciométricas foram realizadas em potenciógrafo da marca Methrom-Herisau modelo E536 utilizando-se titulador automático da marca Metrohm, modelo 665.

3.2 Solventes e reagentes

Os solventes utilizados neste trabalho foram procedentes do Grupo Química, Merck e Vetec, sendo: metanol, etanol, diclorometano, tetraidrofurano, clorofórmio, trietilamina, piridina e cicloexilamina (todos grau P.A).

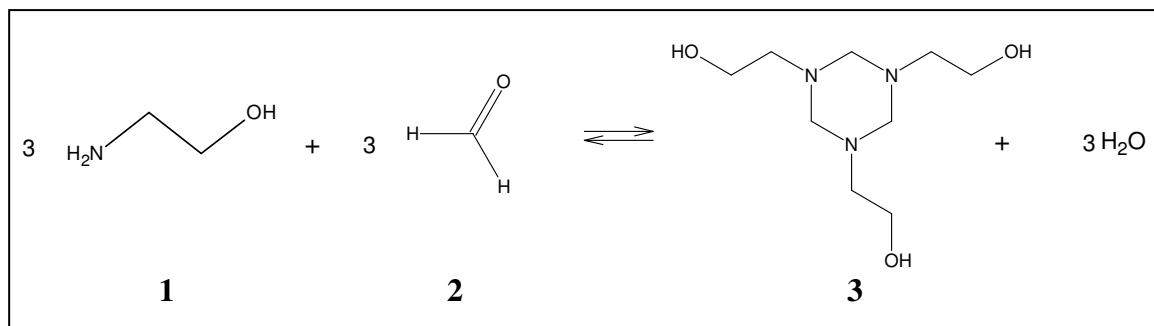
Os reagentes listados abaixo foram utilizados sem nenhum tratamento prévio.

- Etalonamina, 3-amino-1-propanol, ácido cianúrico, 4-cloro-3-nitro-anilina, benzilamina, cloreto de oxalila e fenetilamina provenientes da Aldrich.
- Ácido clorosulfônico, ácido monocloroacético, ácido fosfórico, formol 37%, carbonato de sódio, hidróxido de sódio e sulfeto de sódio nona-hidratado da Vetec.
- Papel indicador de sulfeto impregnado com acetato de chumbo da Aldrich.

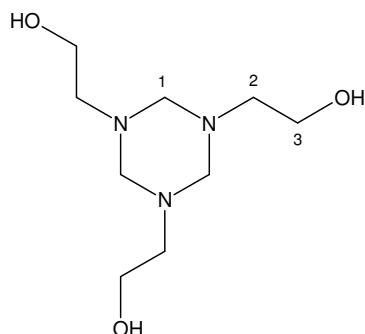
3.3 Sínteses e caracterizações

3.3.1 Síntese e caracterização das triazinanas

3.3.1.1 Síntese e caracterização da 1,3,5-tris(2-hidroxietil)-1,3,5-triazinana

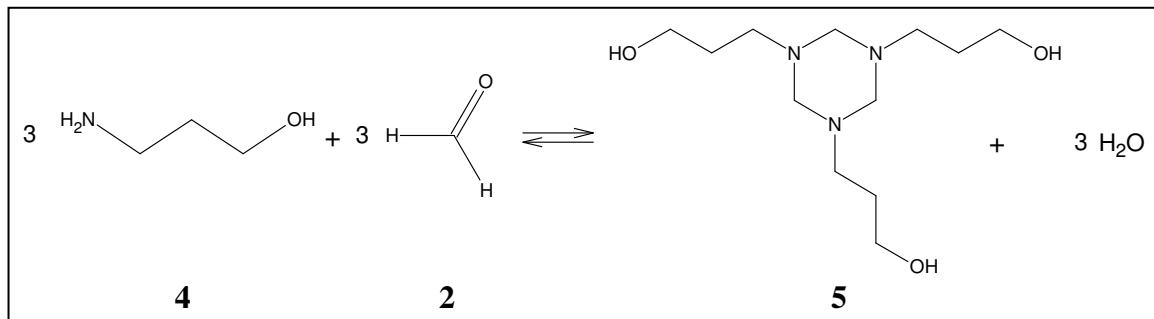


Em um balão de 100 mL de fundo redondo adicionou-se 18 mL (0,3 mol) de etanolamina (**1**) ($d = 1,012 \text{ g/mL}$) e 3 mL de etanol; a mistura foi mantida em agitação a temperatura ambiente por 10 minutos e após a homogeneização foi adicionado gota a gota 30 mL (0,4 mol) de formaldeído (**2**) ($d = 1,09 \text{ g/mL}$) em banho de gelo. Após o término da adição a mistura foi agitada a temperatura ambiente por 24 horas, e então, o produto obtido foi seco ao máximo em evaporador rotatório. O produto resultante foi obtido como um óleo amarelo claro.

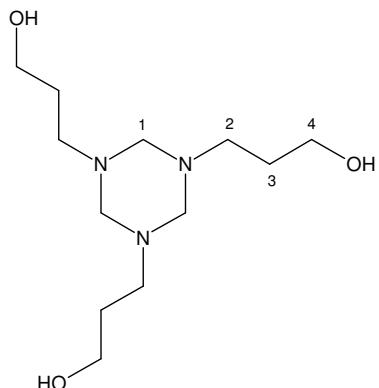


Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	¹ H	¹³ C
1	2,76 (s)	73,82
2	2,60 (t)	54,98
3	3,57 (t)	59,17

3.3.1.2 Síntese e caracterização da 1,3,5-tris(3-hidroxipropil)-1,3,5-triazinana

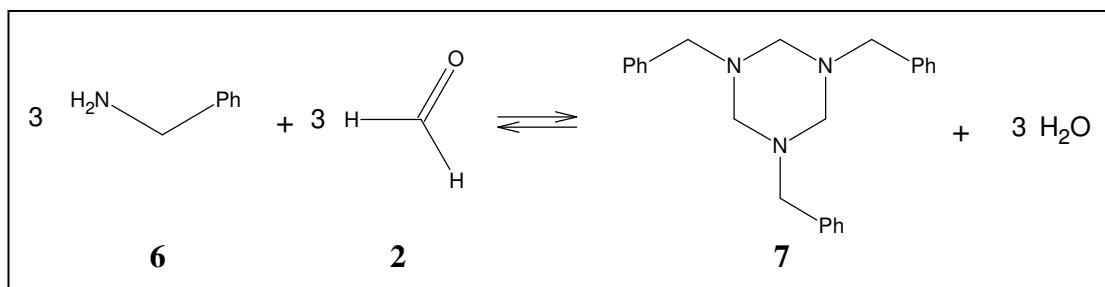


Em um balão de 100 mL de fundo redondo adicionou-se 22,40 mL (0,3 mol) de 3-amino-1-propanol (**4**) ($d = 1,09 \text{ g/mL}$) e 5 mL de etanol; a mistura foi mantida em agitação a temperatura ambiente por 10 minutos, e após a homogeneização foi adicionado gota a gota 33,90 mL (0,4 mol) de formaldeído (**2**) ($d = 1,09 \text{ g/mL}$) em banho de gelo. Após o término da adição a mistura foi agitada a temperatura ambiente por 24 horas, e então, o produto obtido foi seco ao máximo em evaporador rotatório. O produto resultante foi obtido como um óleo incolor.

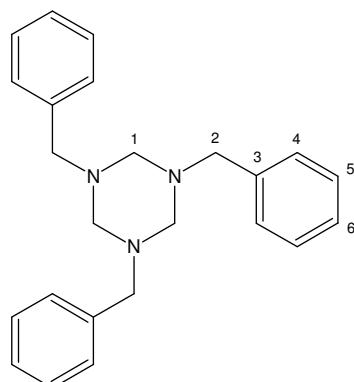


Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	^1H	^{13}C
1	3,65 (s)	82,59
2	2,86 (t)	47,56
3	1,60 (m)	21,54
4	3,78 (t)	67,65

3.3.1.3 Síntese e caracterização da 1,3,5-tris-benzil-1,3,5-triazinana

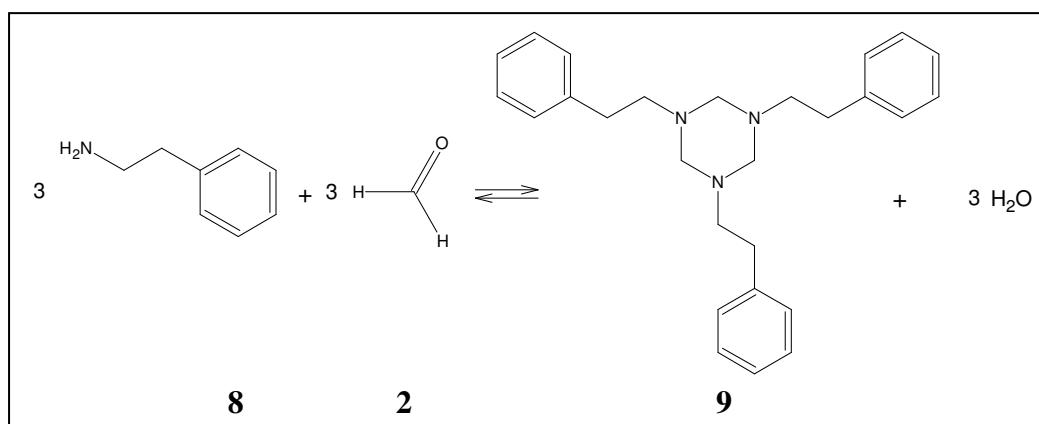


Em um balão de 100 mL de fundo redondo adicionou-se 32,80 mL (0,3 mol) de benzilamina (**6**) ($d = 0,981 \text{ g/mL}$) e 15 mL de etanol; a mistura foi mantida em agitação a temperatura ambiente por 10 minutos e após a homogeneização foi adicionado gota a gota 33,00 mL (0,4 mol) de formaldeído (**2**) ($d = 1,09 \text{ g/mL}$) em banho de gelo. Após o término da adição a mistura foi agitada a temperatura ambiente por 24 horas, e então, o produto foi extraído por uma partição de clorofórmio e água, ficando este na fase orgânica que foi seca com sulfato de sódio anidro e evaporado em rota evaporador. O produto foi obtido como um óleo incolor.

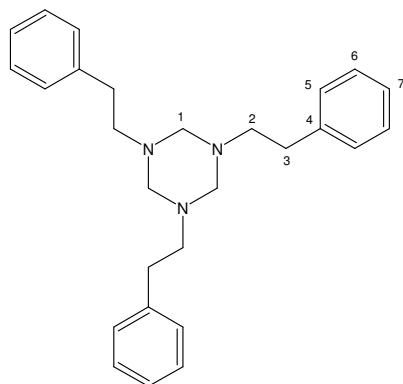


Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	^1H	^{13}C
1	3,44 (s)	73,87
2	3,84 (s)	57,15
3	-	138,54
4	7,50 (d)	128,37
5	7,45 (t)	129,03
6	7,39 (t)	121,16

3.3.1.4 Síntese e caracterização da 1,3,5-tris-fenetil-1,3,5-triazinana



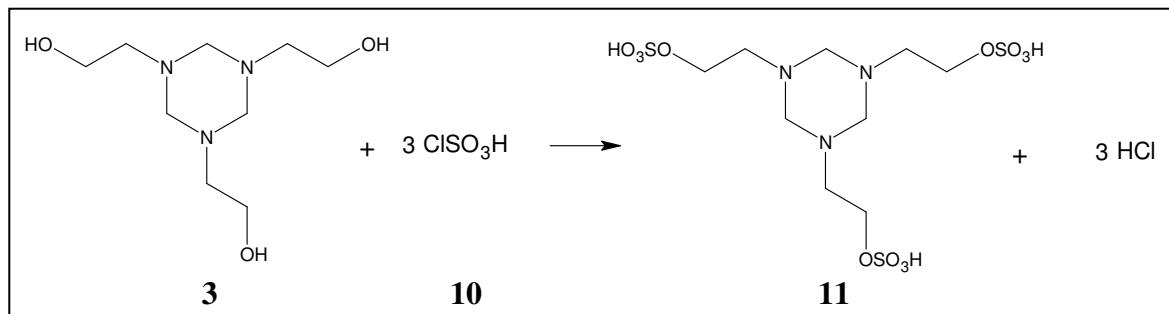
Em um balão de 100 mL de fundo redondo adicionou-se 37,60 mL (0,3 mol) de fenetilamina (**8**) ($d = 0,962 \text{ g/mL}$) e 15 mL de etanol, a mistura foi mantida em agitação a temperatura ambiente por 10 minutos e após a homogeneização foi adicionado, gota a gota, 33,60 mL (0,4 mol) de formaldeído (**2**) ($d = 1,09 \text{ g/mL}$) em banho de gelo. Após o término da adição, a mistura foi agitada a temperatura ambiente por 24 horas, e então, o produto foi extraído por uma partição de clorofórmio e água, ficando este na fase orgânica que foi seca com sulfato de sódio anidro e evaporado em rota-evaporador. O produto obtido foi como um óleo amarelo que cristaliza lentamente sob a forma de agulhas.



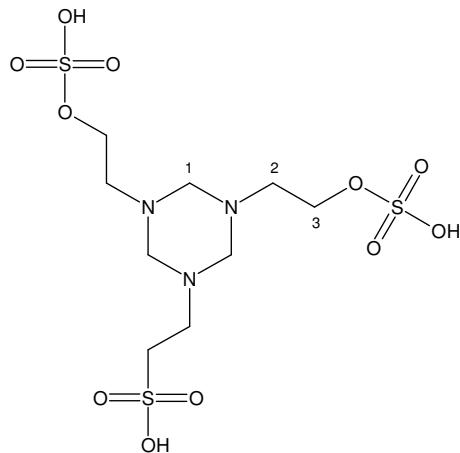
Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	^1H	^{13}C
1	3,36 (s)	74,51
2	2,87 (dt)	54,59
3	2,9 (dt)	34,65
4	-	140,43
5	7,35 (d)	128,54
6	7,37 (t)	128,96
7	7,43 (t)	126,23

3.3.2 Síntese e caracterização dos derivados sulfatados das triazinanas

3.3.2.1 Síntese e caracterização da 1,3,5-*N,N',N''*-(etil-hidrogenosulfato)-triazinana

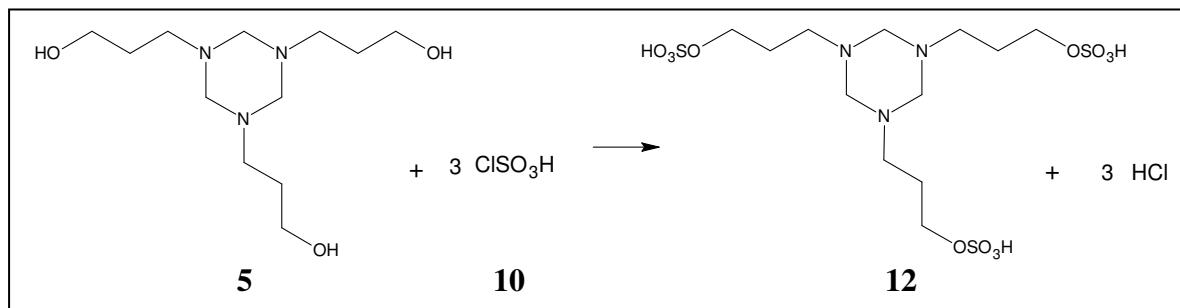


Em um balão de 50 mL de fundo redondo foi adicionado 1,5 g (0,007 mol) da triazinana (**3**) e 10 mL de clorofórmio, seco com sulfato de sódio anidro, sob agitação até completa solubilização. Em seguida, foi adicionado, sob agitação, à solução obtida, em banho de gelo, e gota a gota, 1,5 mL (0,023 mol) de ácido cloro-sulfônico (**10**) ($d = 1,75$ g/mL), e então, a mistura foi mantida em refluxo por 20 minutos, e logo em seguida, foi levada ao evaporador rotatório. O produto obtido foi um óleo viscoso de coloração amarela e foi utilizado logo em seguida sem nenhum tratamento de purificação.

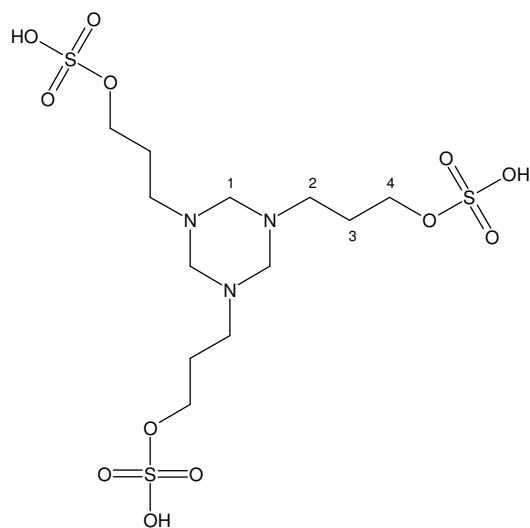


Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	^1H	^{13}C
1	4,40 (s)	81,50
2	3,07 (t)	38,72
3	3,74 (t)	64,19

3.3.2.2 Síntese e caracterização da 1,3,5-*N,N',N''*-(propil-hidrogenosulfato)-triazinana



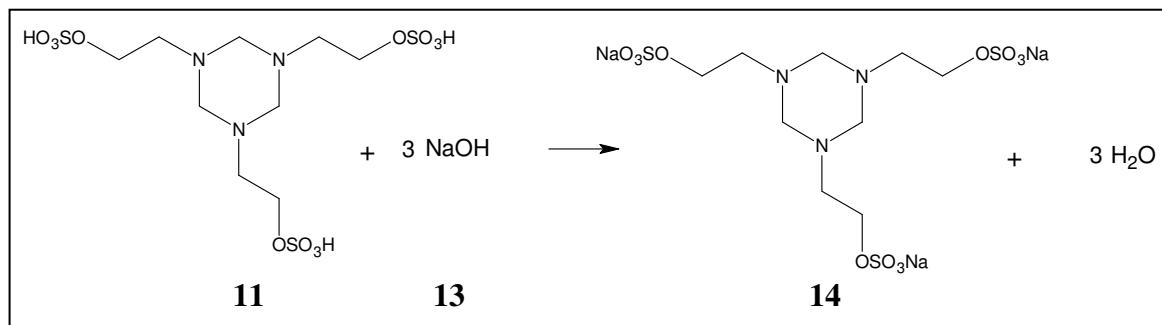
Em um balão de 50 mL de fundo redondo foi adicionado 2,5 g (0,0097 mol) da triazinana (**5**) e 10 mL de clorofórmio seco sob agitação até completa solubilização. Posteriormente, foi adicionado à solução obtida, sob agitação, banho de gelo, e gota a gota, 2,0 mL (0,030 mol) de ácido cloro-sulfônico (**10**) ($d = 1,75$ g/mL), e então, a mistura foi mantida em refluxo por 20 minutos, e logo em seguida foi levada ao evaporador rotatório. O produto obtido foi um óleo viscoso de coloração amarela, e foi utilizado logo em seguida sem nenhum tratamento de purificação.



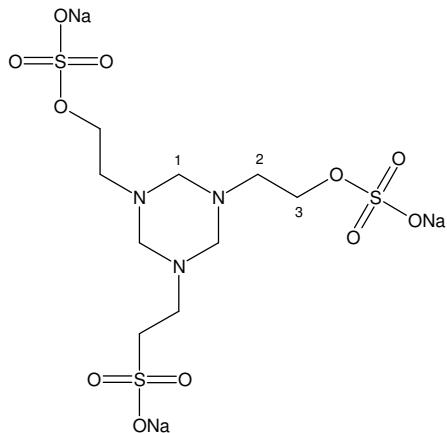
Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	^1H	^{13}C
1	4,50 (s)	76,32
2	3,17 (t)	42,35
3	2,82 (m)	21,86
4	3,68 (t)	67,00

3.3.3 Síntese e caracterização dos sais dos derivados sulfatados das triazinanas

3.3.3.1 Síntese e caracterização do sal sódico da 1,3,5-*N*,*N*',*N*''-(etil-sulfato)-triazinana

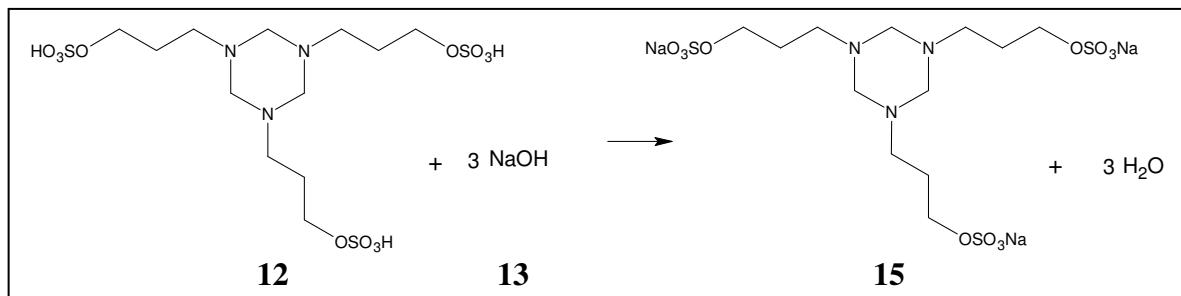


Em um balão de 50 mL de fundo redondo a triazinana sulfatada (**11**) foi dissolvida em metanol e neutralizada com uma solução 10% (m/v) de NaOH (**13**) em metanol até pH 7,0. A solução resultante foi concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se o produto sob a forma de um sólido de coloração amarela.

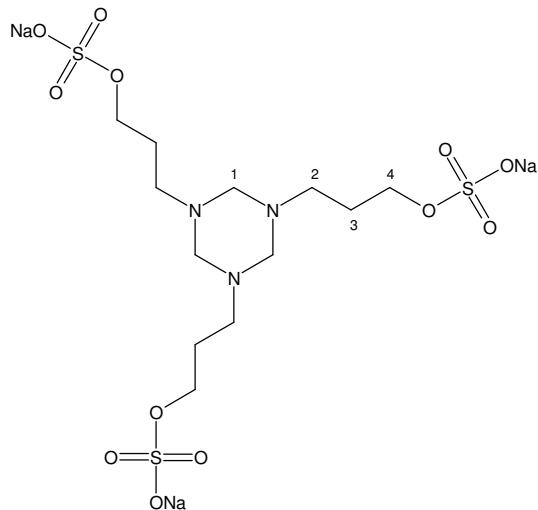


Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	^1H	^{13}C
1	3,40 (s)	64,84
2	3,21 (t)	41,96
3	3,88 (t)	58,27

3.3.3.2 Síntese e caracterização do sal sódico da 1,3,5-*N*, *N'*,*N''*-(propil-sulfato)-triazinana



Em um balão de 50 mL de fundo redondo a triazinana sulfatada (**12**) foi dissolvida em metanol e neutralizada com uma solução 10% (m/v) de NaOH (**13**) em metanol até pH 7,0. A solução resultante foi concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se o produto sob a forma de um sólido de coloração amarelo claro.

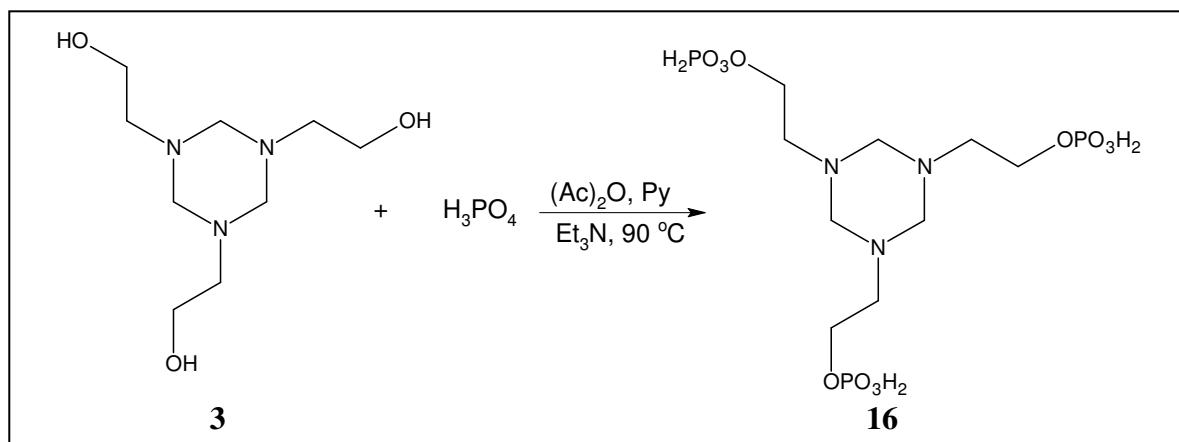


Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	^1H	^{13}C
1	3,29 (s)	66,30
2	3,05 (t)	37,35
3	1,85 (m)	29,11
4	3,65 (t)	59,00

3.3.4 Síntese e caracterização dos derivados fosfatados das triazinanas

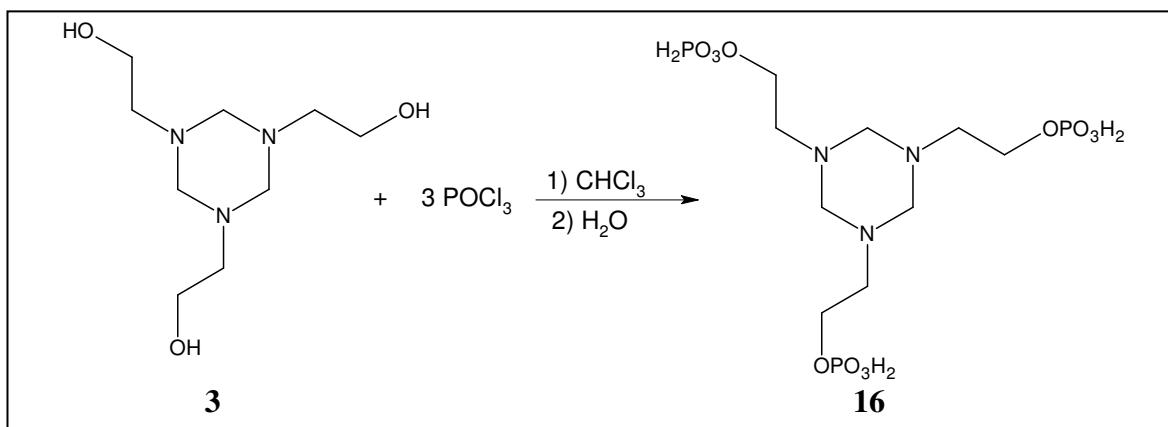
3.3.4.1 Síntese e caracterização da 1,3,5-*N*, *N'*,*N''*-(etil-di-hidrogenofosfato)-triazinana

- Metodologia A

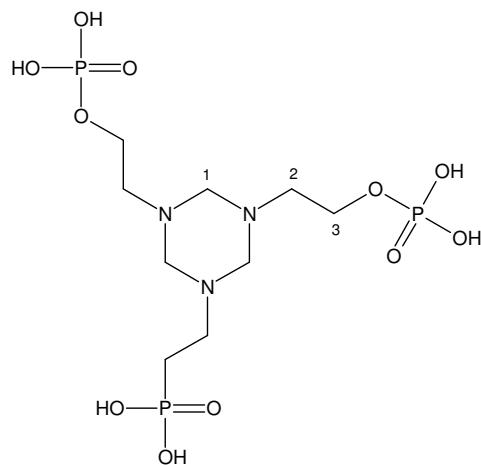


Em um balão de 125 mL de fundo redondo foi adicionado 0,744 g (3,397 mmol) da triazinana (**3**) e uma solução de 0,6 mL de ácido fosfórico ($d = 1,71 \text{ g/mL}$; 10,2 mmol), 4,15 mL de piridina, 2,8 mL de trietilamina e 1,93 mL de anidrido acético, preparada e homogeneizada previamente. Após completa solubilização a mistura reacional foi mantida em refluxo (90°C) por 2 horas, quando então foi resfriada a temperatura ambiente e, então, foram adicionados 5 mL de água. A seguir, a mistura foi mantida em refluxo por mais 1 hora. Após o refluxo foram adicionados mais 15 mL de água, e realizada uma partição da mistura reacional com 3 porções de 25 mL de éter etílico. A fase aquosa foi então evaporada em evaporador rotatório e o óleo resultante foi solubilizado em uma solução de acetona-água (9:1), sendo posteriormente adicionados 2,1 mL de ciclo-hexilamina havendo precipitação imediata. O produto foi deixado em repouso em geladeira durante 12 horas, filtrado e lavado com acetona. Posteriormente, o sólido foi dissolvido em etanol e a parte insolúvel foi descartada. O produto foi obtido a partir da evaporação do etanol sob a forma de cristais de coloração laranja.

- Metodologia B



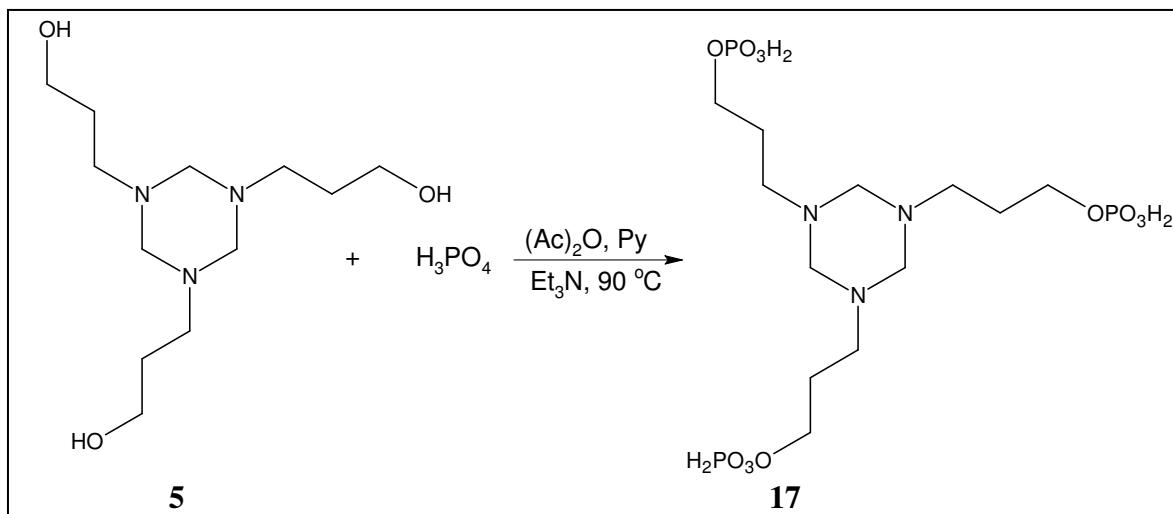
Em um balão de 125 mL de fundo redondo foi adicionado 2,696 g (12,31 mmol) da triazinana (**3**) e 20 mL de clorofórmio (CHCl_3) seco, após homogeneização e sob banho de gelo foram adicionados 3,36 mL de POCl_3 ($d = 1,675 \text{ g/mL}$). Logo em seguida a mistura reacional foi deixada em agitação por 1 hora em temperatura ambiente. Após a agitação o clorofórmio foi então evaporado em evaporador rotatório, obtendo-se, assim, um óleo amarelado que foi adicionado a 25 mL de água lentamente para o término da reação. A solução aquosa foi mantida em repouso em geladeira durante 24 horas, onde se observou a formação de cristais de coloração alaranjada.



Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	^1H	^{13}C
1	4,19 (s)	79,23
2	3,74 (t)	48,52
3	4,33 (t)	67,14

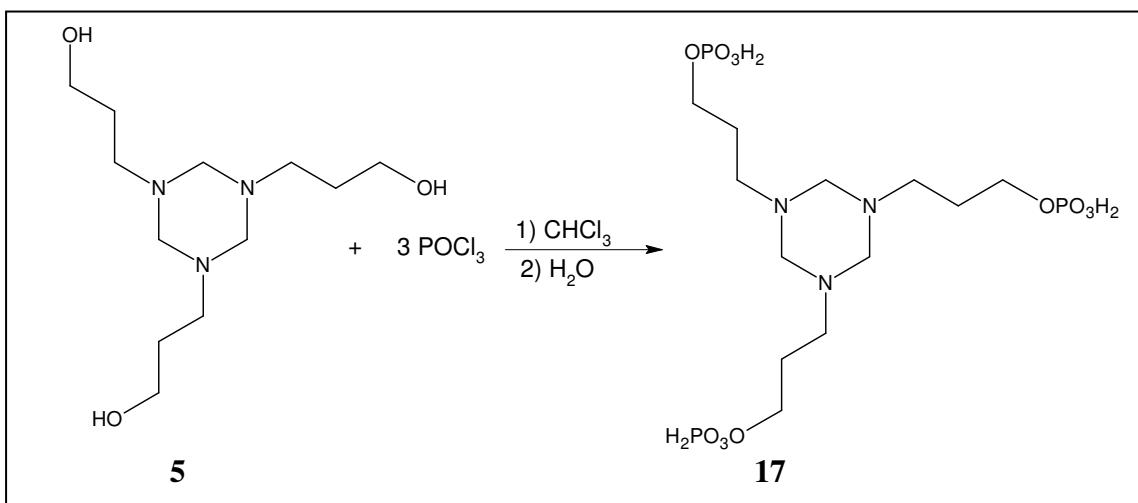
3.3.4.2 Síntese e caracterização da 1,3,5-*N*, *N'*,*N''*-(propil-di-hidrogenofosfato)-triazinana

- Metodologia A

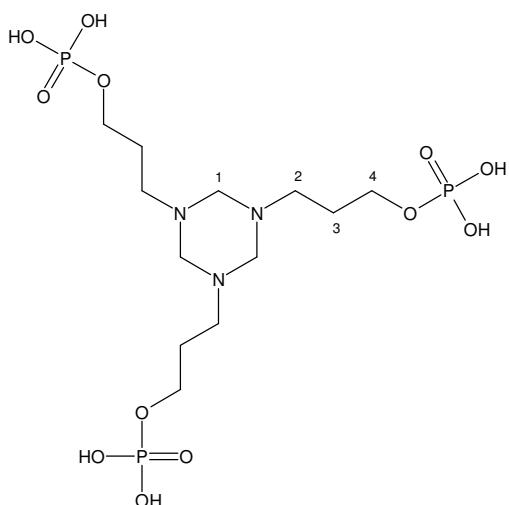


Em um balão de 125 mL de fundo redondo foi adicionado 0,887 g (3,397 mmol) da triazinana (**5**) e uma solução de 0,6 mL de ácido fosfórico ($d= 1,71 \text{ g/mL}$; 10,2 mmol), 4,15 mL de piridina, 2,8 mL de trietilamina e 1,93 mL de anidrido acético, preparada e homogeneizada previamente. Após completa solubilização a mistura reacional foi mantida em refluxo (90°C) por 2 horas, quando então foi resfriada a temperatura ambiente e, então, foram adicionados 5 mL de água. A seguir, a mistura foi mantida em refluxo por mais 1 hora. Após o refluxo foram adicionados mais 15 mL de água, e realizada uma partição da mistura reacional com 3 porções de 25 mL de éter etílico, a fase aquosa foi então evaporada em evaporador rotatório e o óleo resultante foi solubilizado em uma solução de acetona-água (9:1), sendo posteriormente adicionados 2,1 mL de ciclo-hexilamina havendo precipitação imediata. O produto foi deixado em repouso em geladeira durante 12 horas, filtrado e lavado com acetona. Posteriormente, o sólido foi dissolvido em etanol e a parte insolúvel foi descartada. O produto foi obtido a partir da evaporação do etanol sob a forma de cristais de coloração amarela.

- Metodologia B



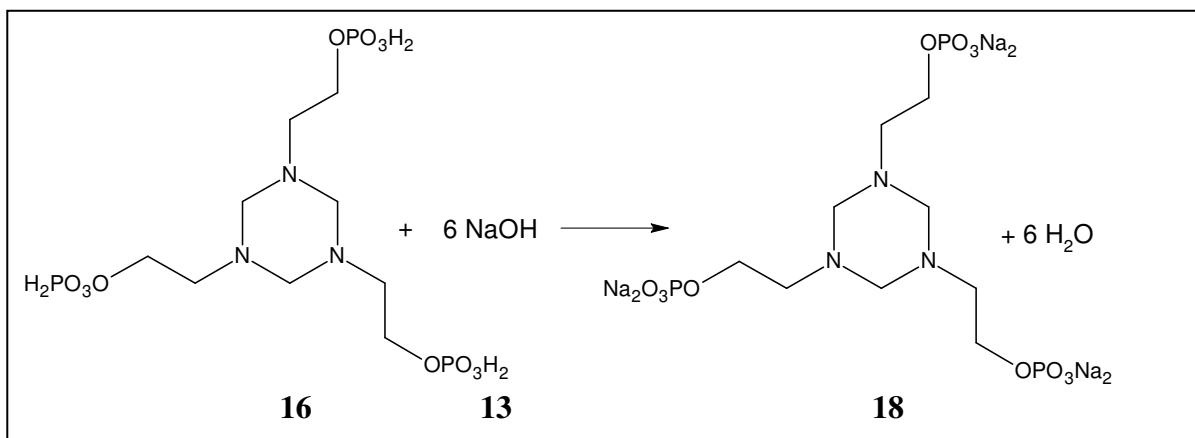
Em um balão de 125 mL de fundo redondo foi adicionado 3,21 g (12,31 mmol) da triazinana (**3**) e 20 mL de clorofórmio (CHCl_3) seco. Após homogenização e sob banho de gelo foram adicionados 3,36 mL de POCl_3 ($d = 1,675 \text{ g/mL}$). Logo em seguida a mistura reacional foi deixada em agitação por 1 hora em temperatura ambiente. Após a agitação o clorofórmio foi então evaporado em evaporador rotatório, obtendo-se assim um óleo amarelado que foi adicionado a 25 mL de água lentamente para o término da reação. A solução aquosa foi mantida em repouso em geladeira durante 24 horas, onde se observou a formação de cristais de coloração amarelada.



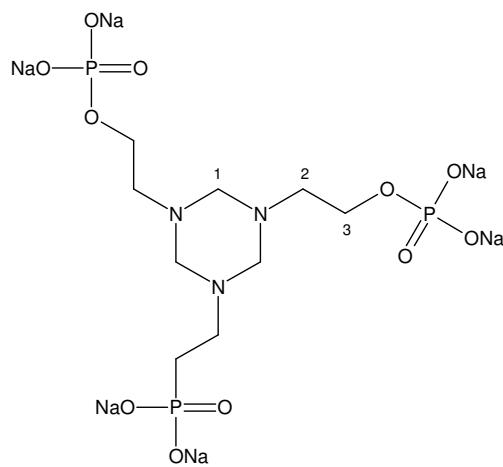
Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	^1H	^{13}C
1	4,45 (s)	79,20
2	3,48 (t)	51,72
3	2,88 (m)	28,11
4	3,74 (t)	72,01

3.3.5 Síntese e caracterização dos sais de sódio dos derivados fosfatados das triazinanas

3.3.5.1 Síntese e caracterização do sal sódico da 1,3,5-*N,N',N''*-(etil-fosfato)-triazinana

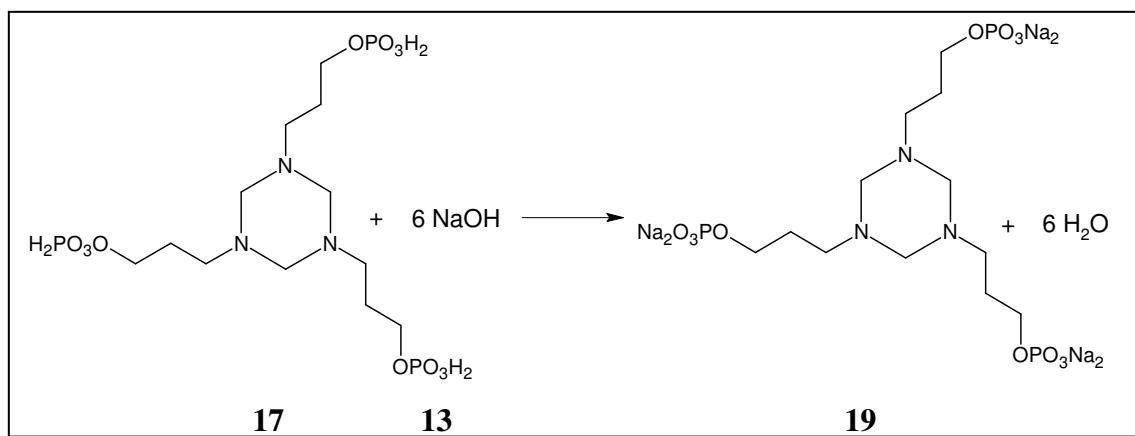


Em um balão de 50 mL de fundo redondo a triazinana fosfatada (**16**) foi dissolvida em metanol e neutralizada com uma solução 10% (m/v) de NaOH (**13**) em metanol até pH 7,0. A solução resultante foi concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se o produto sob a forma de um sólido de coloração laranja claro.

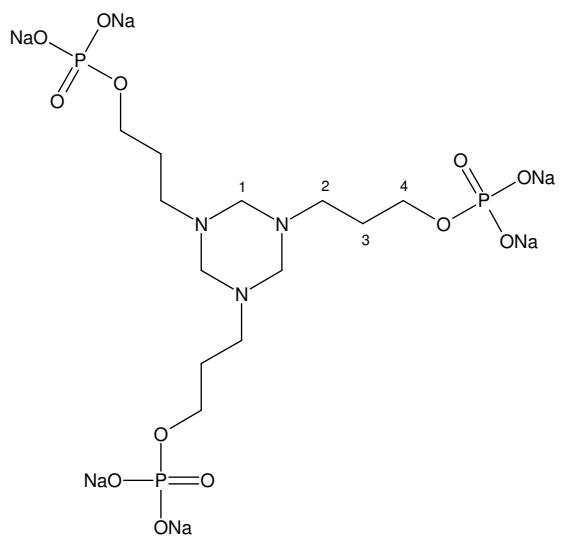


Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	^1H	^{13}C
1	2,74 (s)	61,78
2	2,93 (t)	42,11
3	3,53 (t)	59,85

3.3.5.2 Síntese e caracterização do sal sódico da 1,3,5-*N*, *N'*,*N''*-(propil-fosfato)-triazinana



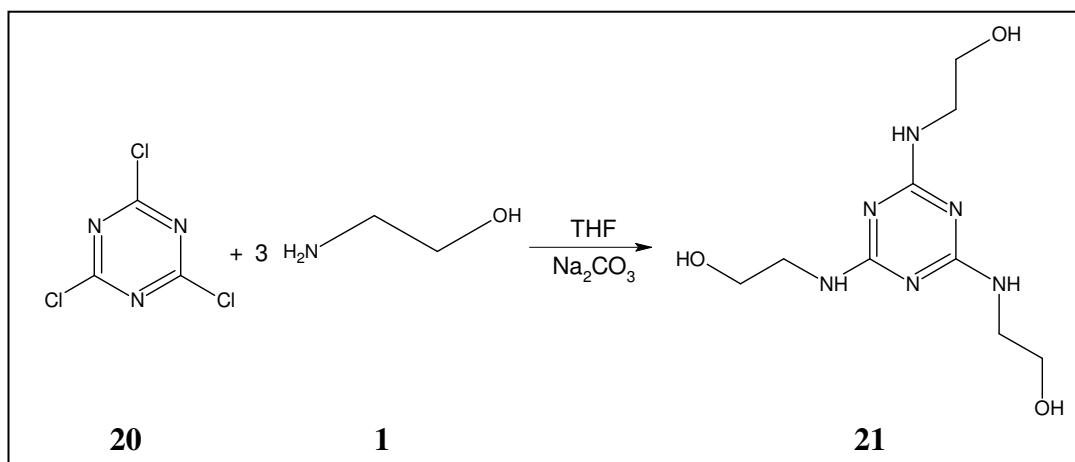
Em um balão de 50 mL de fundo redondo a triazinana fosfatada (**17**) foi dissolvida em metanol e neutralizada com uma solução 10% (m/v) de NaOH (**13**) em metanol até pH 7,0. A solução resultante foi concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se o produto sob a forma de um sólido de coloração amarela.



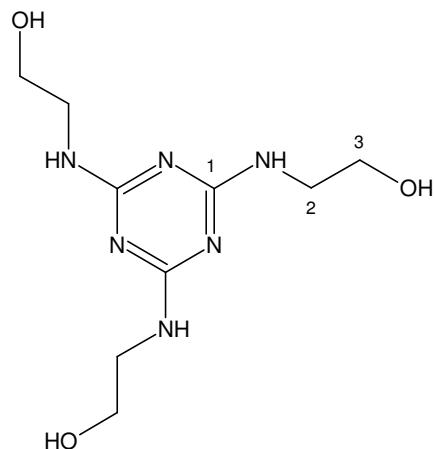
Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	^1H	^{13}C
1	3,49 (s)	58,97
2	3,25 (t)	46,96
3	2,23 (m)	27,85
4	3,86 (t)	60,01

3.3.6 Síntese e caracterização das triazinas

3.3.6.1 Síntese e caracterização da 2,4,6-triamino-(2,2',2''- trietanol)-1,3,5-triazina

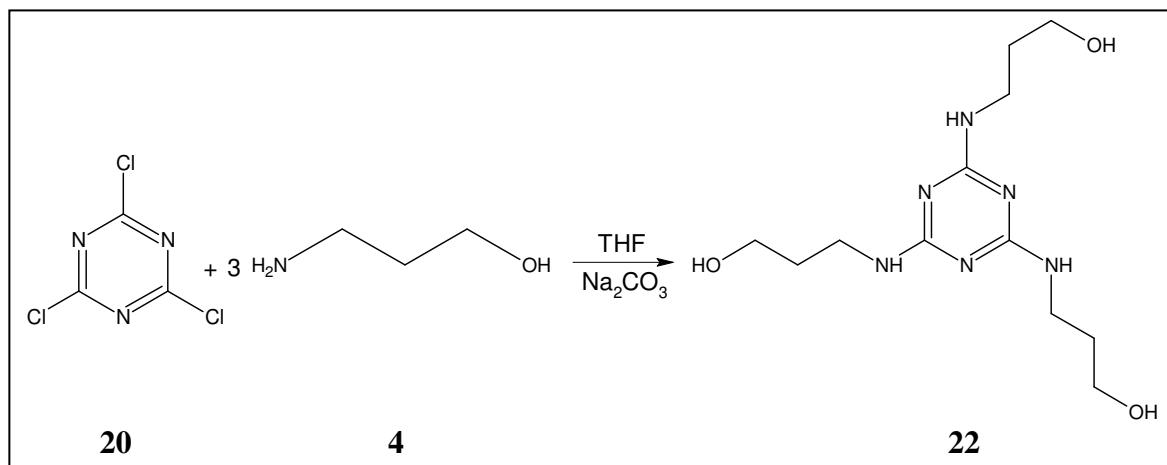


Em um balão de 125 mL de fundo redondo foram adicionados 2,5 g (13,55 mmol) de cloreto cianúrico (**20**), 8,62 g (81,27 mmol) de carbonato de sódio e 50 mL de THF, e, posteriormente, 4,1 mL (68,13 mmol) de etanolamina (**1**), lentamente, a 0°C. Após a adição a mistura reacional foi mantida a refluxo por 24 horas. A seguir filtrou-se e lavou-se com THF, e a solução resultante foi então evaporada em rota-evaporador obtendo-se um óleo castanho como produto.

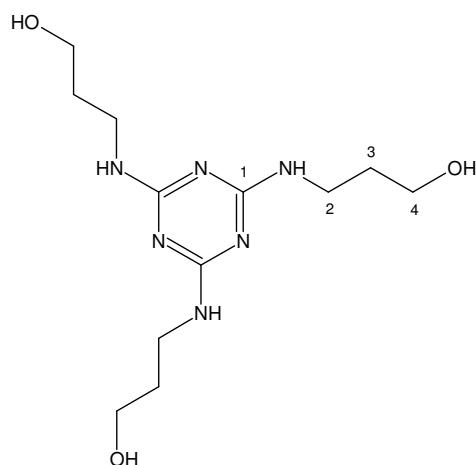


Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	^1H	^{13}C
1	-	104,49
2	2,61 (t)	42,38
3	3,47 (t)	62,88

3.3.6.2 Síntese e caracterização da 2,4,6-triamino-(3,3',3''- tripropanol)-1,3,5-triazina

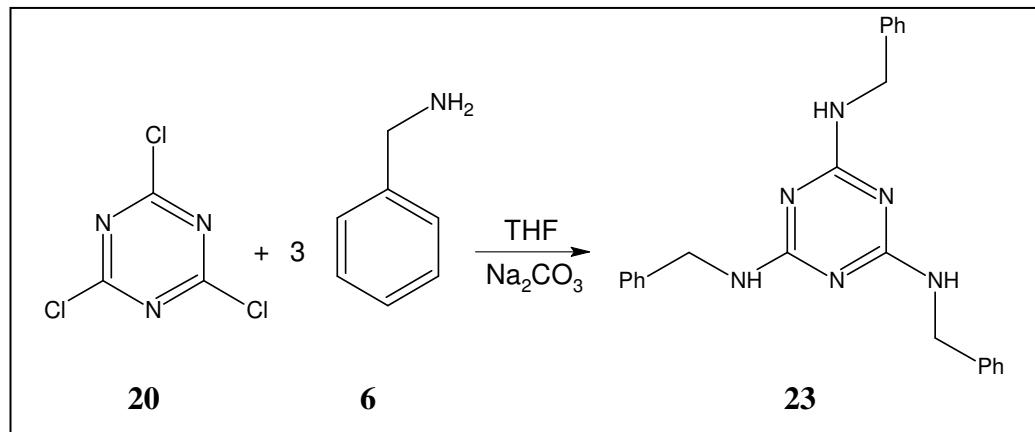


Em um balão de 125 mL de fundo redondo foram adicionados 2,5 g (13,55 mmol) de cloreto cianúrico (**20**), 8,62 g (81,27 mmol) de carbonato de sódio e 50 mL de THF, e acrescentado, lentamente, a 0 °C 5,17 mL (68,13 mmol) de 3-amino-1-propanol (**4**). Após a adição, a mistura reacional foi mantida em refluxo por 24 horas. Após o refluxo a mistura reacional foi filtrada e lavada com THF, e, a solução resultante evaporada em rota-evaporador, obtendo-se um óleo amarelo como produto.

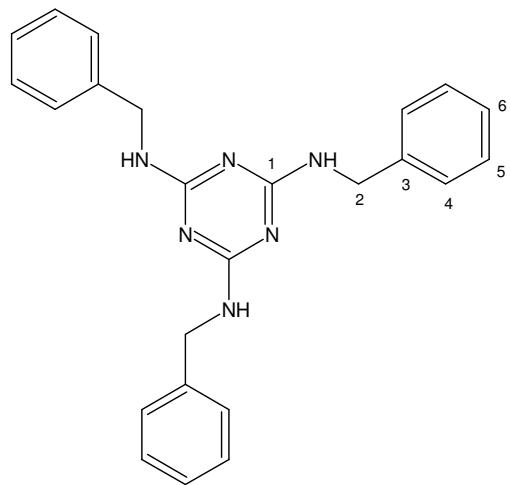


Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	¹ H	¹³ C
1	-	104,40
2	2,55 (t)	37,68
3	1,55 (m)	34,42
4	3,52 (t)	59,57

3.3.6.3 Síntese e caracterização da 2,4,6-triamino-*N,N',N''*-tribenzil-1,3,5-triazina

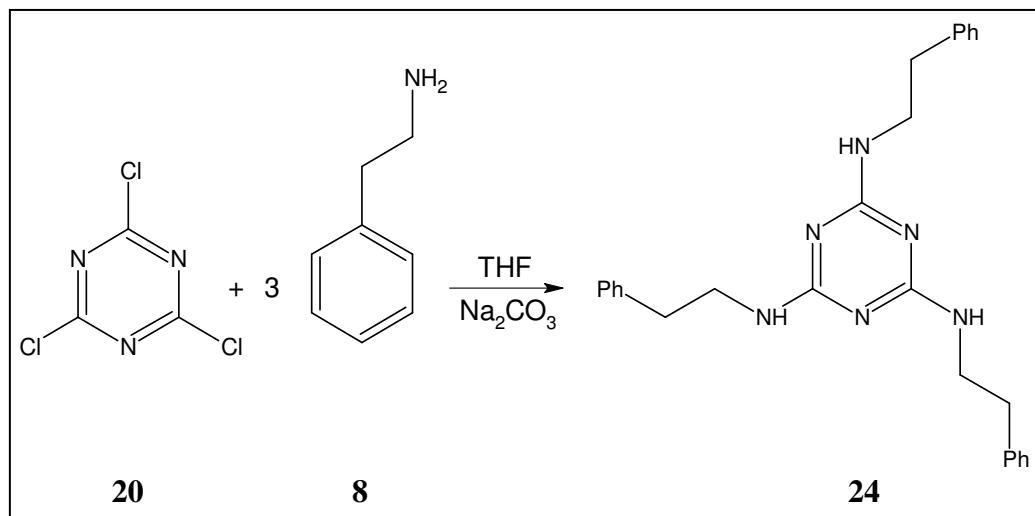


Em um balão de 125 mL de fundo redondo foram adicionados 2,5 g (13,55 mmol) de cloreto cianúrico (20), 8,62 g (81,27 mmol) de carbonato de sódio e 50 mL de THF, e acrescentado, lentamente, a 0 °C, 7,41 mL (68,13 mmol) de benzilamina (6). Após a adição a mistura reacional foi mantida em refluxo por 24 horas. Após o refluxo a mistura reacional foi então evaporada em rota-evaporador, e o sólido resultante lavado exaustivamente com água e filtrado obtendo-se um sólido branco como produto.

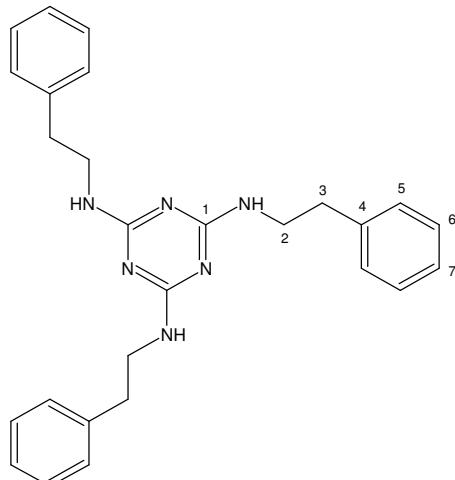


Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	¹ H	¹³ C
1	-	165,98
2	4,49 (s)	44,12
3	-	139,81
4	7,28-7,39 (m)	128,84
5	7,28-7,39 (m)	127,90
6	7,28-7,39 (m)	128,77

3.3.6.4 Síntese e caracterização da 2,4,6-triamino-*N,N',N''*-trifenetil-1,3,5-triazina



Em um balão de 125 mL de fundo redondo foram adicionados 2,5 g (13,55 mmol) de cloreto cianúrico (**20**), 8,62 g (81,27 mmol) de carbonato de sódio e 50 mL de THF, e acrescentado, lentamente, a 0 °C, 8,55 mL (68,13 mmol) de fenetilamina (**8**). Após a adição a mistura reacional foi mantida em refluxo por 24 horas. Após o refluxo a mistura reacional foi então evaporada em rota-evaporador e o sólido resultante lavado exaustivamente com água e filtrado obtendo-se um sólido branco como produto.

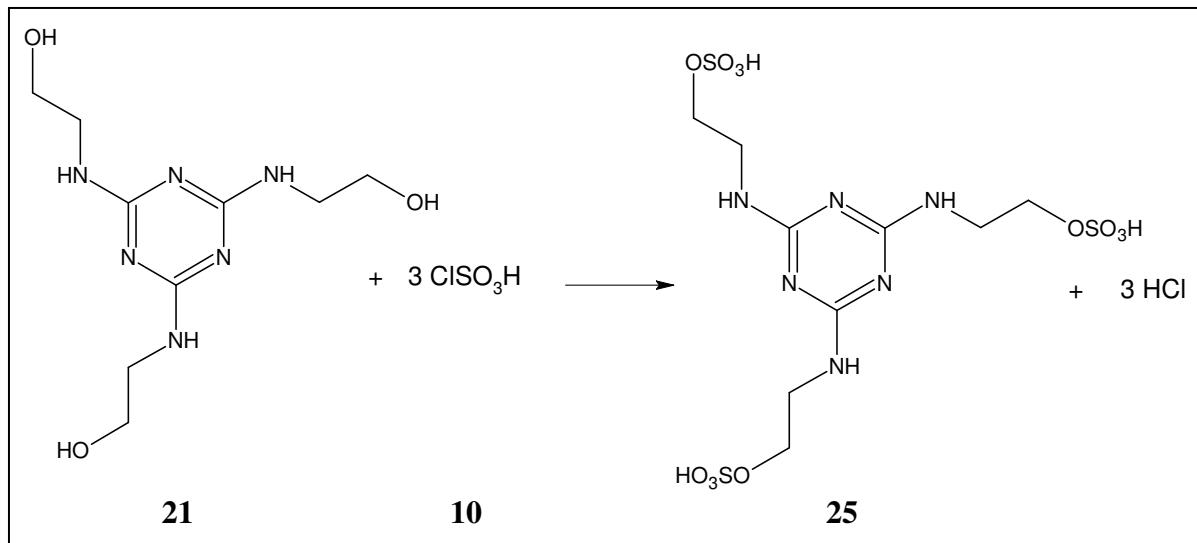


Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	¹ H	¹³ C
1	-	166,78
2	*	42,52
3	2,89 (t)	35,37
4	-	138,75
5	7,28-7,38 (m)	128,91
6	7,28-7,38 (m)	128,87
7	7,28-7,38 (m)	128,07

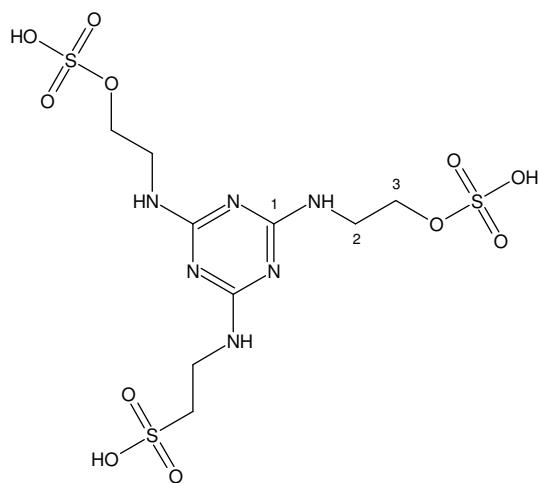
* o sinal da água encobre o sinal da amostra.

3.3.7 Síntese e caracterização dos derivados sulfatados das triazinas

3.3.7.1 Síntese e caracterização da 2,4,6-triamino-(trietyl-hidrogenosulfato)-1,3,5-triazina

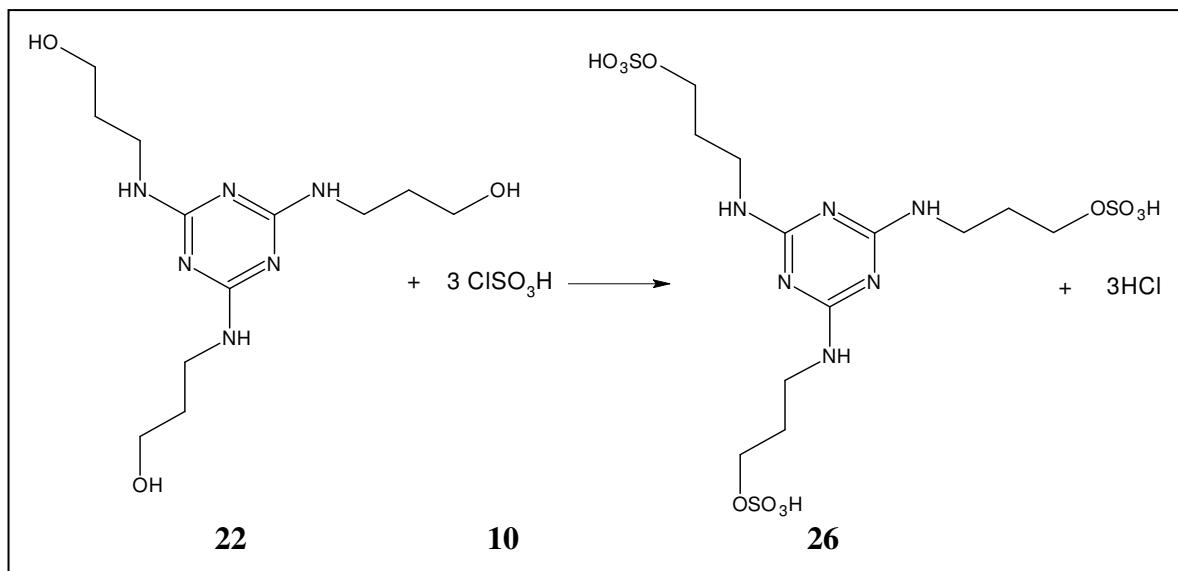


Em um balão de 50 mL de fundo redondo foi adicionado 2,14 g (8,298 mmol) de triazina (**21**) e 12 mL de clorofórmio seco sob agitação até completa solubilização. Posteriormente, foi adicionado à solução obtida, sob agitação, banho de gelo, e gota a gota, 1,65 mL (24,78 mmol) de ácido cloro-sulfônico (**10**) ($d = 1,75$ g/mL), e então, a mistura foi mantida em refluxo por 20 minutos, e logo em seguida, levada ao evaporador rotatório. O produto obtido, na forma de uma pasta de coloração vermelha, foi utilizado logo em seguida sem nenhum tratamento de purificação.

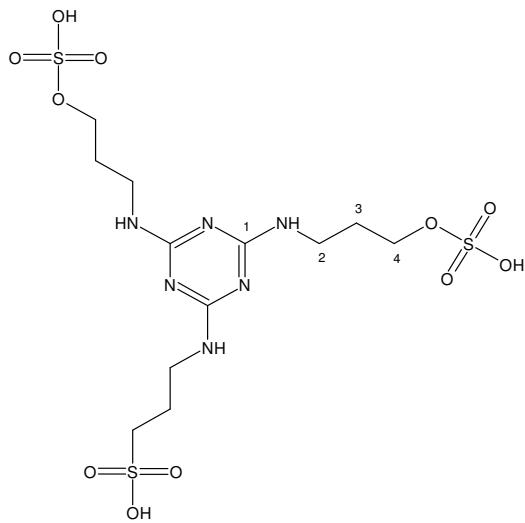


Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	^1H	^{13}C
1	-	166,32
2	3,32 (t)	39,05
3	4,25 (t)	64,61

3.3.7.2 Síntese e caracterização da 2,4,6-triamino-(tripripil-hidrogenosulfato)-1,3,5-triazina



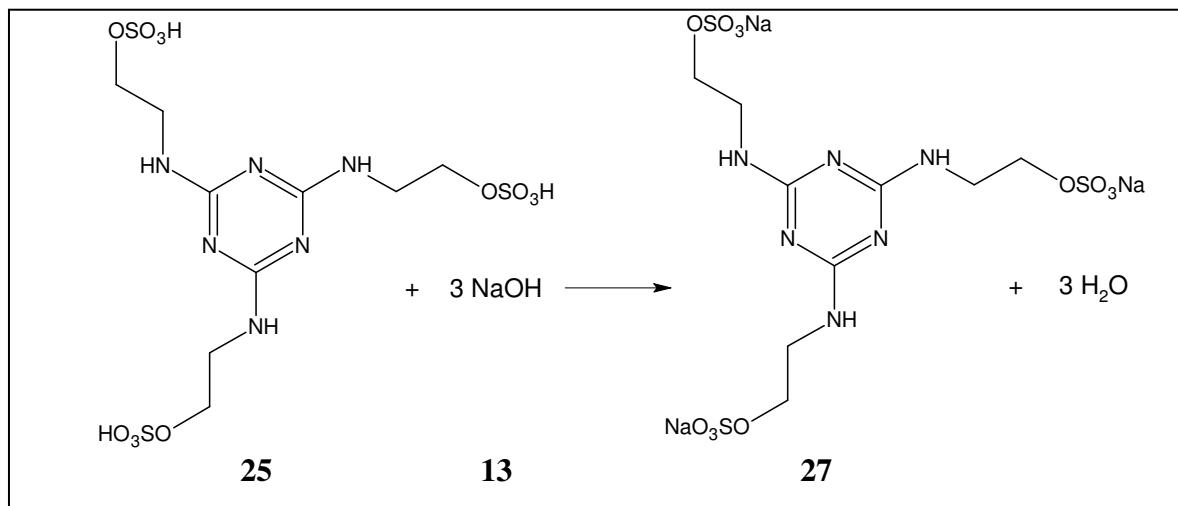
Em um balão de 50 mL de fundo redondo foi adicionado 2,5 g (8,33 mmol) de triazina (22) e 10 mL de clorofórmio seco, sob agitação, até completa solubilização. Posteriormente, foi adicionado à solução obtida, sob agitação, banho de gelo, e gota a gota, 1,66 mL (25 mmol) de ácido cloro-sulfônico (10) ($d = 1,75$ g/mL), e então, a mistura foi mantida em refluxo por 20 minutos, e logo em seguida foi levada ao evaporador rotatório. O produto obtido, na forma de uma pasta coloração amarela, foi utilizado logo em seguida sem nenhum tratamento de purificação.



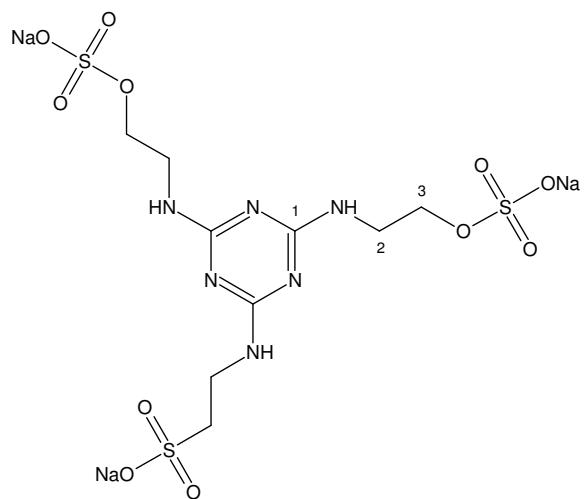
Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	^1H	^{13}C
1	-	165,76
2	3,10 (t)	36,98
3	2,03 (m)	26,56
4	4,12 (t)	66,25

3.3.8 Síntese e caracterização dos sais de sódio dos derivados sulfatados das triazinas

3.3.8.1 Síntese e caracterização do sal de sódio da 2,4,6-triamino-(triethylsulfato)-1,3,5-triazina

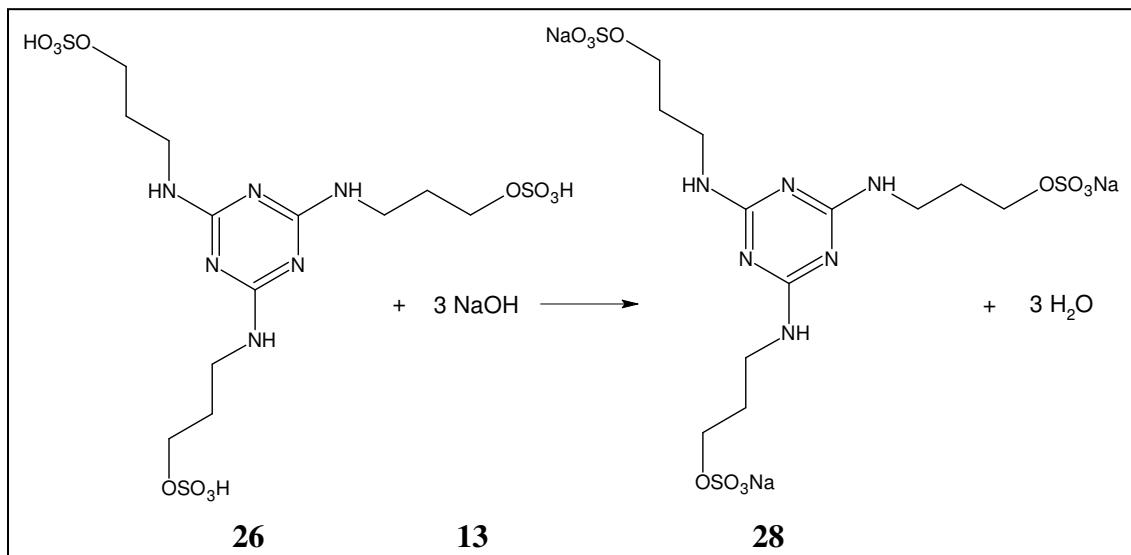


Em um balão de 50 mL de fundo redondo a triazina sulfatada (**25**) foi dissolvida em metanol e neutralizada com uma solução 10% (m/v) de NaOH (**13**) em metanol até pH 7,0. A solução resultante foi concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se o produto sob a forma de um sólido de coloração laranja escuro.

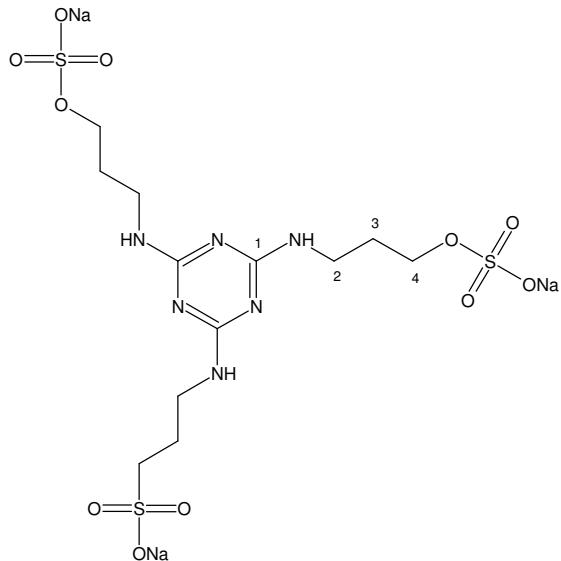


Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	¹ H	¹³ C
1	-	164,85
2	3,24 (t)	39,17
3	4,20 (t)	65,06

3.3.8.2 Síntese e caracterização do sal de sódio da 2,4,6-triamino-(tripropilsulfato)-1,3,5-triazina



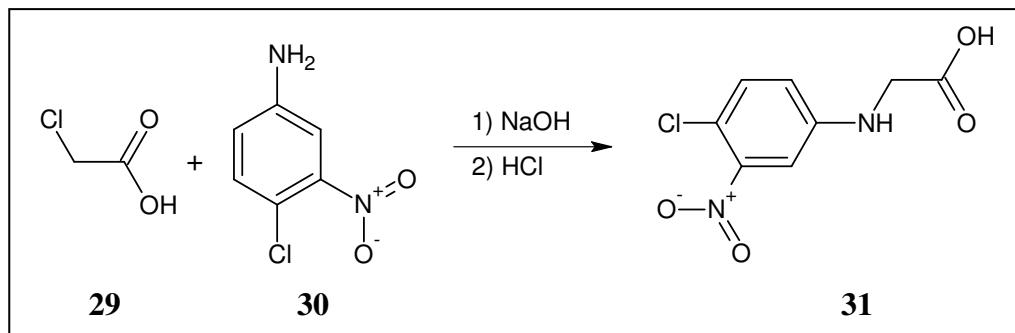
Em um balão de 50 mL de fundo redondo a triazina sulfatada (**26**) foi dissolvida em metanol e neutralizada com uma solução 10% (m/v) de NaOH (**13**) em metanol até pH 7,0. A solução resultante foi concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se o produto sob a forma de um sólido de coloração laranja escuro.



Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	¹ H	¹³ C
1	-	164,53
2	3,03 (t)	37,12
3	1,96 (m)	27,03
4	4,06 (t)	66,42

3.3.9 Síntese dos derivados da classe dos 1,2,3-oxadiazólio-5-olato (sidnonas)

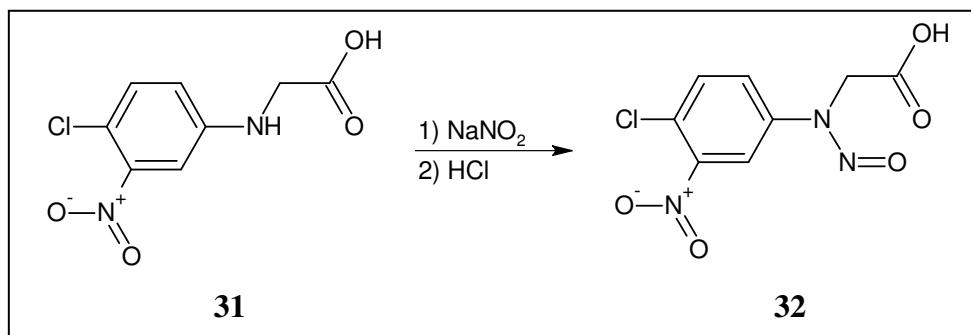
3.3.9.1 Preparação da *N*-(3'-nitro-4'-cloro-fenil)-glicina



A um balão de fundo redondo de 125 mL adicionou-se 50 mmol de ácido 2-cloroacético (**29**) e 10 mL de água. Adicionou-se lentamente, com agitação e resfriamento externo, pouco mais de 20 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 10% (m/v) à mistura até a neutralização. Adicionou-se 50 mmol da 3-nitro-4-cloroanilina (**30**) e adaptou-se um condensador para refluxo. A mistura reacional foi então aquecida até ebulição por 168 horas.

Após resfriamento adicionou-se 2,5 g de hidróxido de sódio, agitando em banho de gelo até que todo sólido estivesse dissolvido. Lavou-se em funil de separação com duas porções de 30 mL de diclorometano, desprezando a camada orgânica inferior, para remoção da anilina que não reagiu. A camada aquosa foi então acidificada, adicionando-se lentamente ácido clorídrico concentrado até pH entre 3-4, filtrou-se em Buchner e lavou-se o precipitado com água gelada. O produto se apresentou como um sólido amarelo amorfo com ponto de fusão de 171 °C.

3.3.9.2 Preparação da *N*-(3'-nitro-4'-cloro-fenil)-*N*-nitroso-glicina

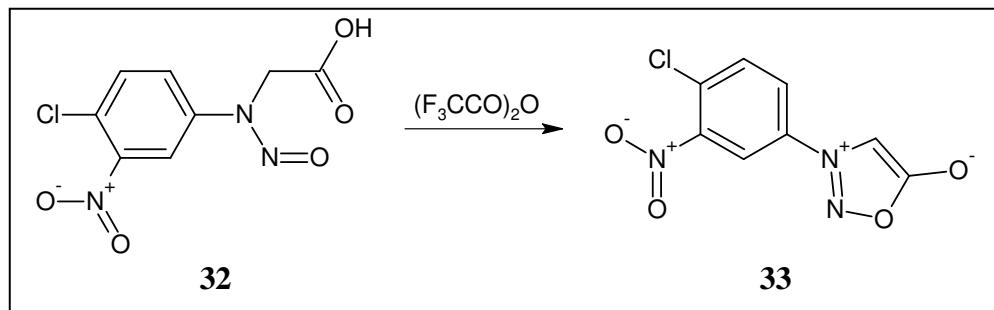


Em um Erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se 16 mmol da respectiva glicina (**31**) finamente pulverizada e 25 mL de água. Resfriou-se em banho de gelo e sal, com agitação, até a temperatura de 0 °C.

Paralelamente, resfriou-se, em becher, 10 mL de água até 0 °C e em seguida adicionou-se 16 mmol de nitrito de sódio. Esta solução foi adicionada lentamente e com agitação constante ao Erlenmeyer. Agitou-se o mesmo durante 10 minutos. Filtrou-se em funil e desprezou-se o precipitado. Ao filtrado adicionou-se cerca de 2,3 mL de ácido clorídrico

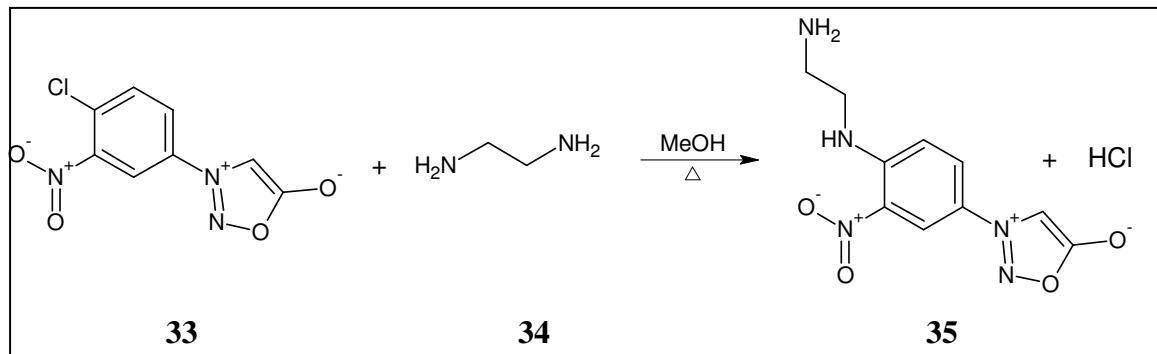
concentrado com agitação vigorosa por alguns minutos até que os cristais se formassem. Filtraram-se os cristais, lavou-se com água gelada, e secou-se ao ar. O produto se apresentou na forma de cristais amarelos com ponto de fusão entre 125-127 °C.

3.3.9.3 Síntese do mesoionico 3-[4'-cloro-3'-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato

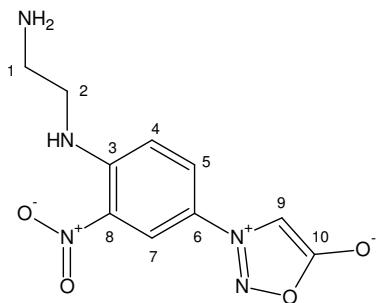


Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 2 mmol da respectiva nitroso-glicina (32) e 4 mL de anidrido trifluoracético. Após resfriamento, a mistura reacional foi vertida em 15 mL de água e agitou-se para hidrolisar o excesso de anidrido. Filtrou-se em funil de Buchner, lavando-se os cristais com água gelada e secou-se ao ar. O produto se apresentou como cristais amarelos com ponto de fusão entre 176-178 °C.

3.3.9.4 Síntese e caracterização do derivado da sidnona através da reação de substituição nucleofílica com a etano-1,2-diamina

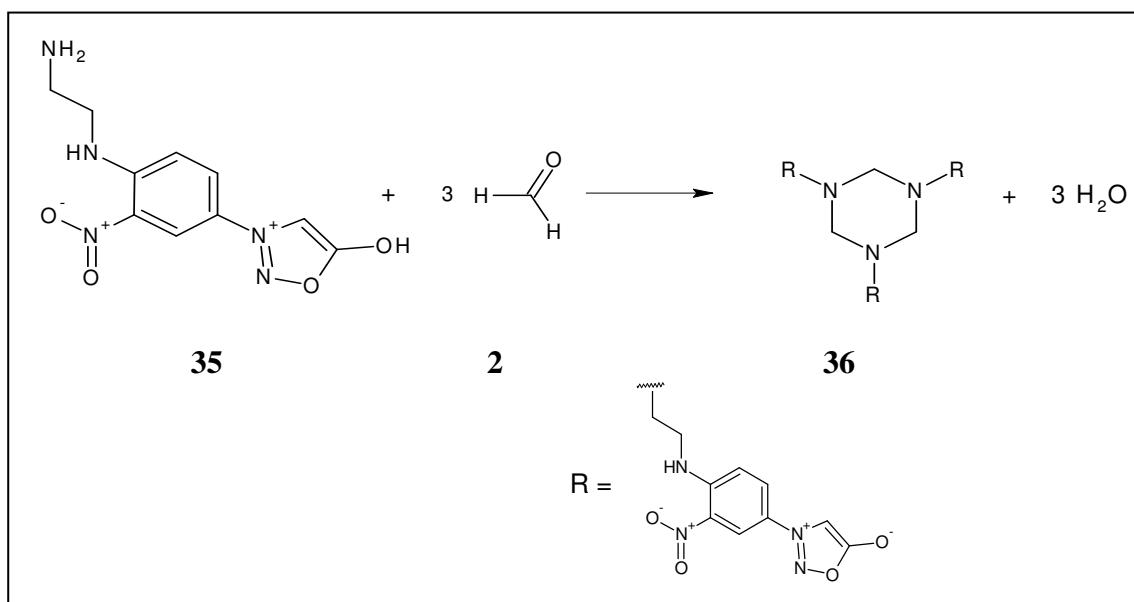


Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 4 mmol da sidnona (33) e 20 mL de metanol, adicionou-se então 1,4 mL de etano-1,2-diamina ($d = 0,897$ g/mL, 20 mmol) (34) e, a mistura foi refluxada por 3 horas. Após resfriamento obteve-se um sólido alaranjado.

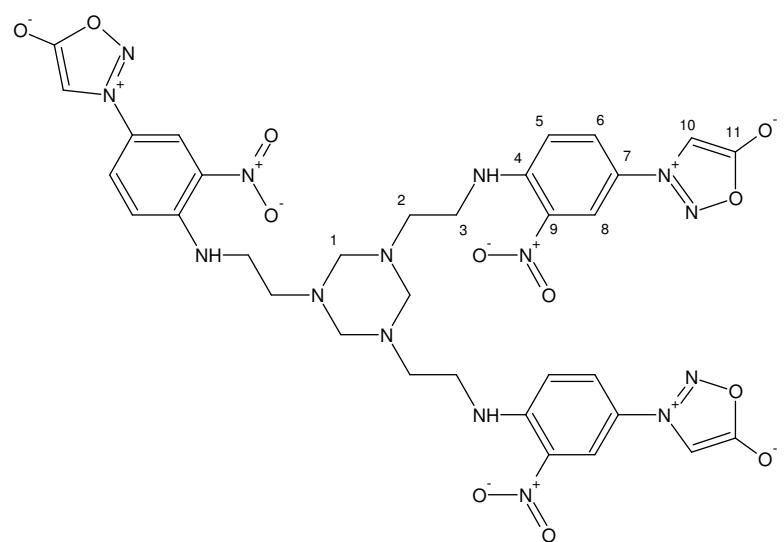


Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	¹ H	¹³ C
1	2,85 (t)	40,50
2	3,43 (t)	45,61
3	-	130,33
4	8,62 (d)	94,81
5	8,02 e 8,00 (dd)	117,00
6	-	122,07
7	7,35 (d)	120,35
8	-	147,17
9	7,83 (s)	128,82
10	-	168,96

3.3.9.5 Síntese e caracterização da triazinana substituída com a sidnona 35



Em um balão de 100 mL de fundo redondo adicionou-se 2 mmol de sidnona substituída (**35**) e 10 mL de água; a mistura foi mantida em agitação a temperatura ambiente por 10 minutos, e após a homogeneização foi adicionado gota a gota 0,4 mmol de formaldeído (**2**) ($d = 1,09 \text{ g/mL}$) em banho de gelo. Após o término da adição a mistura foi agitada a temperatura ambiente por 24 horas, e então, o produto obtido foi seco ao máximo em evaporador rotatório. O produto resultante foi obtido como um sólido de coloração laranja.



Numeração	Deslocamento químico (ppm)	
	¹ H	¹³ C
1	4,48 (s)	84,29
2	3,00 (t)	50,35
3	2,93 (t)	49,14
4	-	130,22
5	8,54-8,58 (dd)	94,57
6	7,93-7,95 (dd)	117,07
7	-	122,14
8	7,30-7,32 (d)	120,00
9	-	146,81
10	7,78 (s)	128,55
11	-	168,87

3.4 Determinação do pKa das triazinanas

3.4.1 Metodologia

O método utilizado para determinação da constante de dissociação foi o potenciométrico. As soluções preparadas com as triazinanas, foram tituladas potenciométricamente, utilizando-se como titulante uma solução padronizada de HCl ou de NaOH.

3.4.2 Soluções

Foram preparadas soluções das triazinanas em água Milli-Q para os compostos **3**, **5**, **11**, **12**, **14** e **15** ou em metanol para os compostos **7** e **9**, com concentração na ordem de 3×10^{-2} mol L⁻¹, utilizando-se balões volumétricos de 5,00 mL.

A solução de HCl, utilizada como titulante, foi padronizada potenciométricamente contra tetraborato de sódio decaidratado, como padrão primário. A concentração molar obtida para o HCl foi de $(0,04401 \pm 0,0017)$ mol L⁻¹. Já para o NaOH, foi utilizado o biftalato de potássio como padrão primário, obtendo-se uma concentração de $(0,04785 \pm 0,00015)$ mol L⁻¹ para a mesma.

3.4.3 Procedimento

Foram transferidos 2,00 mL das soluções estoques das triazinanas com concentração na ordem de 3×10^{-2} mol L⁻¹ para os respectivos bêcheres, aos quais foram adicionados mais 30 mL de água Milli-Q (utilizando-se pipetas previamente calibradas).

Estas novas soluções foram tituladas potenciométricamente com HCl e as curvas registradas em potenciógrafo. Este procedimento foi repetido no mínimo três vezes para cada solução inicial das triazinanas.

Através dos gráficos foram obtidos os valores dos pH(s) nos pontos de inflexão das curvas de titulação. Foram, também, lidos os volumes de titulante gastos nos pontos de equivalência para cada solução de triazinana. Com esses valores foram calculados os valores de pKa(s).

3.4.4 Cálculos

Considerando a reação esquemática



No ponto de equivalência, tem-se:

$$[\text{TRI}] = [\text{TRIH}^+]$$

Onde,

$[\text{TRI}]$ = Concentração de triazinana livre

$[\text{TRIH}^+]$ = Concentração de triazinana protonada

E a concentração de triazinana protonada foi calculada a partir de,

$$[\text{TRIH}^+] = \frac{n[\text{TRI}]_0}{V_t} \quad \text{ou seja,} \quad [\text{TRIH}^+] = \frac{n[\text{TRI}]_0}{V_i + V_{\text{HCl}}}$$

Onde,

$n[\text{TRI}]_0$ = numero de mol inicial de triazinana

V_T = Volume total

V_i = Volume inicial

V_{HCl} = Volume gasto de HCl no ponto de equivalência

O mesmo raciocínio foi aplicado quando se utiliza NaOH como titulante. O cálculo do pK_a foi realizado utilizando-se as equações 1 e 2 para os compostos titulados com HCl ou pelas equações 3 e 4 para os compostos titulados com NaOH.

$$\text{pH} = 7 - \frac{1}{2} (\text{pK}_b + \log [\text{TRI}\text{H}^+]) \quad (\text{eq. 1})$$

$$\text{pK}_a = 14 - \text{pK}_b \quad (\text{eq. 2})$$

$$\text{pH} + \text{pOH} = 14 \quad (\text{eq. 3})$$

$$\text{pOH} = 7 - \frac{1}{2} (\text{pK}_a + \log [\text{ATR}^-]) \quad (\text{eq. 4})$$

$\text{pH} = \text{pH}$ no ponto de equivalência

3.5 $\text{pK}_a(\text{s})$

A tabela 2 mostra os valores das concentrações do HCl (mol L^{-1}) obtidos e os volumes correspondentes utilizados na padronização com o tetraborato de sódio.

Tabela 2: Volumes utilizados e valores das concentrações na padronização do HCl pelo tetraborato de sódio.

Titulação	Volume gasto de HCl (mL)	Molaridade do HCl (mol L^{-1})	Média (mol L^{-1})
1º	12,00	0,04188	
2º	11,23	0,04475	
3º	11,78	0,04266	$0,04401 \pm 0,00174$
4º	10,75	0,04675	

As tabelas de 3 a 10 indicam os resultados obtidos para os valores de $\text{pK}_a(\text{s})$ das triazinanas estudadas.

A tabela 3 mostra o volume de HCl gasto na titulação de 2,00 mL do composto 3 na concentração de $3,439 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ com adição de 30,00 mL de H_2O , o pH nos pontos de inflexão e os respectivos $\text{pK}_a(\text{s})$.

Tabela 3: Volumes gastos de titulante, pH(s) e $\text{pK}_a(\text{s})$ para o composto 3.

Titulação	Volume gasto de HCl (mL)	pH ₂	pK _{a2}	pH ₁	pK _{a1}
1º	1,10 – 4,22	9,1	15,21	5,80	8,57
2º	0,99 – 4,45	9,1	15,21	5,40	7,77
3º	0,80 – 4,42	9,1	15,43	5,25	7,47
4º	0,61 – 4,25	9,2	15,43	5,10	7,17
5º	1,00 – 4,10	9,1	15,22	5,30	7,57

A tabela 4 mostra o volume de HCl gasto na titulação de 2,00 mL do composto 5 na concentração de $3,396 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ com adição de 30,00 mL de H_2O , o pH nos pontos de inflexão e os respectivos $\text{pK}_a(\text{s})$.

Tabela 4: Volumes gastos de titulante, pH(s) e pKa(s) para o composto 5.

Titulação	Volume gasto de HCl (mL)	pH ₂	pKa ₂	pH ₁	pKa ₁
1°	0,90 – 4,21	8,70	14,41	4,70	6,37
2°	0,90 – 4,15	8,63	14,27	4,80	6,57
3°	0,89 – 4,29	8,65	14,31	4,75	6,47
4°	0,90 – 4,20	8,70	14,41	4,75	6,47
5°	0,80 – 4,35	8,70	14,41	4,65	6,27

A tabela 5 mostra o volume de HCl gasto na titulação de 2,00 mL do composto 7 na concentração de $3,34 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ com adição de 30,00 mL de Metanol, o pH nos pontos de inflexão e os respectivos pKa(s).

Tabela 5: Volumes gastos de titulante, pH(s) e pKa(s) para o composto 7.

Titulação	Volume gasto de HCl (mL)	pH ₃	pKa ₃	pH ₂	pKa ₂	pH ₁	pKa ₁
1°	0,50 – 1,00 – 3,85	7,80	12,61	5,50	8,00	3,46	3,88
2°	0,60 – 1,20 – 3,90	7,15	11,31	5,48	7,96	3,50	3,96
3°	0,49 – 1,99 – 3,79	7,45	11,91	5,42	7,83	3,46	3,88
4°	0,60 – 2,20 – 4,00	7,05	11,11	5,20	7,38	3,40	3,76
5°	0,75 – 2,29 – 4,19	7,32	11,64	5,43	7,84	3,47	3,90

A tabela 6 mostra o volume de HCl gasto na titulação de 2,00 mL do composto 9 na concentração de $3,498 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ com adição de 30,00 mL de metanol, o pH nos pontos de inflexão e os respectivos pKa(s).

Tabela 6: Volumes gastos de titulante, pH(s) e pKa(s) para o composto 9.

Titulação	Volume gasto de HCl (mL)	pH ₂	pKa ₂	pH ₁	pKa ₁
1°	0,70 – 2,50	7,10	11,22	4,47	5,94
2°	0,60 – 2,25	7,06	11,15	4,40	5,81
3°	0,80 – 2,42	7,50	12,02	4,50	6,00

A tabela 7 mostra o volume de NaOH gasto na titulação de 2,00 mL do composto 11 na concentração de $3,382 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ com adição de 30,00 mL de H₂O, o pH e o pOH no ponto de inflexão e o respectivo pKa.

Tabela 7: Volumes gastos de titulante, pH(s) e pKa(s) para o composto 11.

Titulação	Volume gasto de NaOH (mL)	pH	pOH	pKa
1°	4,49	6,30	7,70	0,07
2°	4,48	6,30	7,70	0,07
3°	4,50	6,32	7,68	0,11

A tabela 8 mostra o volume de NaOH gasto na titulação de 2,00 mL do composto 12 na concentração de $3,375 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ com adição de 30,00 mL de H₂O, o pH e o pOH no ponto de inflexão e o respectivo pKa.

Tabela 8: Volumes gastos de titulante, pH(s) e pKa(s) para o composto **12**.

Titulação	Volume gasto de NaOH (mL)	pH	pOH	pKa
1º	4,49	6,90	7,10	1,27
2º	4,48	7,25	6,75	1,97
3º	4,50	7,27	6,73	2,01

A tabela 9 mostra o volume de HCl gasto na titulação de 2,00 mL do composto **14** na concentração de $3,424 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ com adição de 30,00 mL de H₂O, o pH no ponto de inflexão e o respectivo pKa.

Tabela 9: Volumes gastos de titulante, pH(s) e pKa(s) para o composto **14**.

Titulação	Volume gasto de HCl (mL)	pH	pKa
1º	0,58	5,4	7,82
2º	0,55	5,45	7,92
3º	0,50	5,48	7,98

A tabela 10 mostra o volume de HCl gasto na titulação de 2,00 mL do composto **15** na concentração de $3,358 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ com adição de 30,00 mL de H₂O, o pH no ponto de inflexão e o respectivo pKa.

Tabela 10: Volumes gastos de titulante, pH(s) e pKa(s) para o composto **15**.

Titulação	Volume gasto de HCl (mL)	pH	pKa
1º	1,09	5,90	10,32
2º	1,10	6,00	10,52
3º	0,91	5,98	10,48

3.6 Avaliação de toxidez frente a *Artemia salina* Leach

Para realizar o ensaio de toxidez, preparou-se uma solução salina artificial, (composta por 48 g de NaCl, 3 g de CaCl₂.2H₂O, 0,20 g de KBr, 1,40 g de KCl, 8 g de Na₂SO₄, 0,4 g de NaHCO₃ e 22 g de MgCl₂.6H₂O m 2 L de solução), que foi utilizada como meio de cultura das ovas do microcrustáceo *Artemia salina*. Depois da solução pronta, colocaram-se as ovas no criadouro e a solução salina até cobrí-las totalmente. Tampou-se a parte contendo as ovas e direcionou-se a luz para a parte descoberta, onde após a eclosão, as larvas passam por fototropismo. As artemias foram utilizadas após 48 horas da eclosão.

3.6.1 Procedimento para o Ensaio de Toxidez

Foram preparadas soluções salinas tanto das triazinanas como das triazinas solúveis em água (**3, 5, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 21, 22, 27, 28**) em balões volumétricos de 10,0 mL com concentração na ordem de 10^{-1} a 10^{-2} mol L⁻¹. Destas soluções, chamadas de soluções estoque, retiraram-se 4 alíquotas de volumes diferentes para obtenção de quatro concentrações distintas que variaram de 125 a 1000 ppm. Transferiu-se alíquotas das soluções estoques a tubos de ensaio, sendo que cada dose foi preparada em quadruplicata. A cada tubo, com a suas devidas

doses, foram adicionados solução salina até o volume de 5 mL através de uma pipeta automática. Para comparação dos resultados, utilizou-se a solução salina pura como controle, também preparada em quadruplicata. Utilizando-se uma micropipeta automática, coletou-se 10 larvas que foram colocadas nos tubos de ensaio. Elas ficaram expostas às amostras e ao controle por 24 horas, e após este período realizou-se a contagem dos microcrustáceos vivos e mortos. A Figura 29 ilustra o procedimento do ensaio.

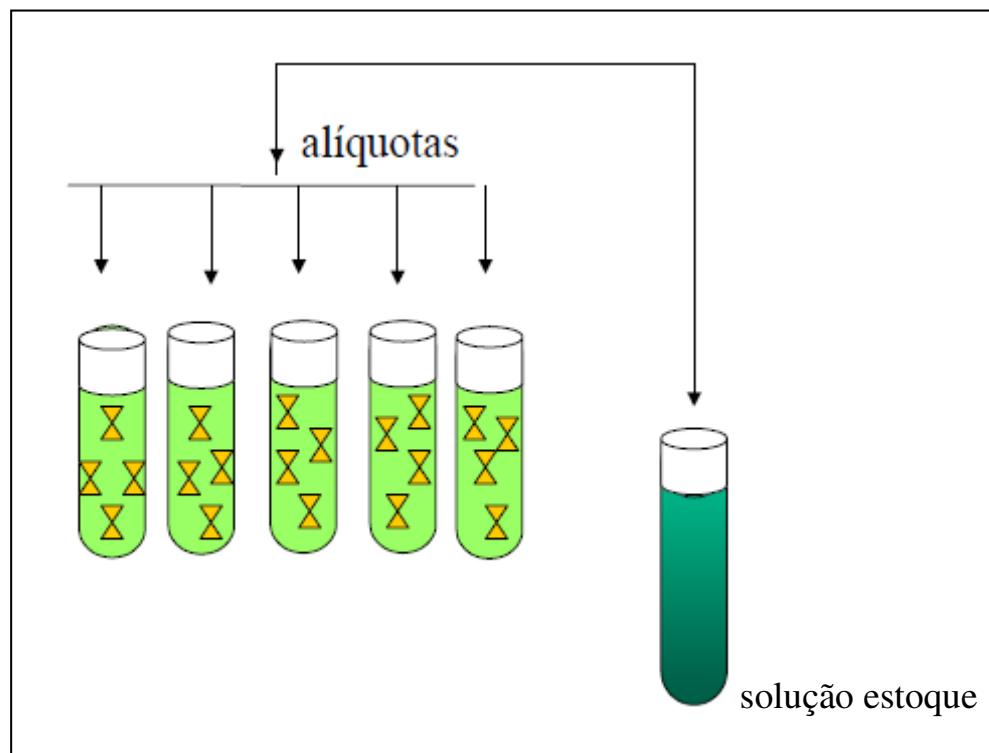


Figura 29: Esquema para o ensaio de toxicidade geral frente à *Artemia salina*.

3.6.2 Cálculos

Para o cálculo da dose letal que mata 50 % das larvas (DL_{50}), utilizou-se a concentração em função da percentagem de microcrustáceos mortos. A partir dos gráficos de concentração *versus* percentual de larvas mortas fez-se a regressão linear das curvas obtidas, com o programa Origin 6.0, e utilizou-se a equação da reta para se calcular a concentração de DL_{50} .

As tabelas 11 a 21 apresentam os valores das concentrações das doses e dos correspondentes números de larvas mortas e vivas após os experimentos para essas mesmas concentrações, os quais foram utilizados para a construção dos gráficos e posteriores cálculos das DL_{50} .

A tabela 11 mostra a quantidade de larvas vivas e mortas, a concentração do composto 3 em ppm e em mol L⁻¹ e o volume de solução estoque adicionada para cada dose no teste de toxicidade do composto 3, onde a solução estoque tinha uma concentração de 0,1025 mol L⁻¹.

Tabela 11: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto **3**.

Concentração (ppm)	V adionado da sol. Estoque (μL)	Concentração após diluição mol L ⁻¹	Larvas vivas				Larvas mortas			
1000	224	$4,566 \times 10^{-3}$	5	9	3	8	5	1	7	2
500	111	$2,283 \times 10^{-3}$	10	5	4	6	0	5	6	4
250	56	$1,141 \times 10^{-3}$	9	7	8	10	1	3	2	0
125	28	$0,571 \times 10^{-3}$	10	10	9	10	0	0	1	0
Branco	-	-	10	10	10	10	0	0	0	0

A tabela 12 mostra a quantidade de larvas vivas e mortas, a concentração do composto **5** em ppm e em mol L⁻¹ e o volume de solução estoque adicionada para cada dose no teste de toxicidade do composto **5** onde a solução estoque tinha uma concentração de 0,1004 mol L⁻¹.

Tabela 12: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto **5**.

Concentração (ppm)	V adionado da sol. Estoque (μL)	Concentração após diluição (mol L ⁻¹)	Larvas vivas				Larvas mortas			
1000	190	$3,83 \times 10^{-3}$	0	0	1	0	10	10	9	10
500	95	$1,91 \times 10^{-3}$	2	2	2	3	8	8	8	7
250	47	$0,957 \times 10^{-3}$	10	9	10	9	0	1	0	1
125	23	$0,478 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
Branco	-	-	10	10	10	10	0	0	0	0

A tabela 13 mostra a quantidade de larvas vivas e mortas, a concentração do composto **11** em ppm e em mol L⁻¹ e o volume de solução estoque adicionada para cada dose no teste de toxicidade do composto **11** onde a solução estoque tinha uma concentração de 0,1025 mol L⁻¹.

Tabela 13: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto **11**.

Concentração (ppm)	V adionado da sol. Estoque (μL)	Concentração após diluição (mol L ⁻¹)	Larvas vivas				Larvas mortas			
1000	224	$4,566 \times 10^{-3}$	0	0	0	0	10	10	10	10
500	111	$2,283 \times 10^{-3}$	3	1	3	0	7	9	7	10
250	56	$1,141 \times 10^{-3}$	9	10	8	8	1	0	2	2
125	28	$0,571 \times 10^{-3}$	10	9	10	9	0	1	0	1
Branco	-	-	10	10	10	10	0	0	0	0

A tabela 14 mostra a quantidade de larvas vivas e mortas, a concentração do composto **12** em ppm e em mol L⁻¹ e o volume de solução estoque adicionada para cada dose no teste de toxicidade do composto **12** onde a solução estoque tinha uma concentração de 0,01000 mol L⁻¹.

Tabela 14: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto **12**.

Concentração (ppm)	V adionado da sol. Estoque (μL)	Concentração após diluição (mol L ⁻¹)	Larvas vivas				Larvas mortas			
1000	224	$4,566 \times 10^{-3}$	0	0	0	0	10	10	10	10
500	111	$2,283 \times 10^{-3}$	0	0	0	0	10	10	10	10
250	56	$1,141 \times 10^{-3}$	9	10	9	10	1	0	1	0
125	28	$0,571 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
Branco	-	-	10	10	10	10	0	0	0	0

A tabela 15 mostra a quantidade de larvas vivas e mortas, a concentração do composto **14** em ppm e em mol L⁻¹ e o volume de solução estoque adicionada para cada dose no teste de toxicidade do composto **14** onde a solução estoque tinha uma concentração de 0,09981 mol L⁻¹.

Tabela 15: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto **14**.

Concentração (ppm)	V adionado da sol. Estoque (μL)	Concentração após diluição (mol L ⁻¹)	Larvas vivas				Larvas mortas			
1000	95	$1,904 \times 10^{-3}$	10	10	10	9	0	0	0	1
500	47	$0,952 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
250	24	$0,476 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
125	12	$0,238 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
Branco	-	-	10	10	10	10	0	0	0	0

A tabela 16 mostra a quantidade de larvas vivas e mortas, a concentração do composto **15** em ppm e em mol L⁻¹ e o volume de solução estoque adicionada para cada dose no teste de toxicidade do composto **15** onde a solução estoque tinha uma concentração de 0,008966 mol L⁻¹.

Tabela 16: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto **15**.

Concentração (ppm)	V adionado da sol. Estoque (μL)	Concentração após diluição (mol L ⁻¹)	Larvas vivas				Larvas mortas			
1000	981	$1,76 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
500	490 μL	$0,88 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
250	245 μL	$0,44 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
125	122 μL	$0,22 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
Branco	-	-	10	10	10	10	0	0	0	0

A tabela 17 mostra a quantidade de larvas vivas e mortas, a concentração do composto **18** em ppm e em mol L⁻¹ e o volume de solução estoque adicionada para cada dose no teste de toxicidade do composto **18** onde a solução estoque tinha uma concentração de 10^{-2} mol L⁻¹.

Tabela 17: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto **18**.

Concentração (ppm)	V adionado da sol. Estoque (μL)	Concentração após diluição (mol L ⁻¹)	Larvas vivas				Larvas mortas			
1000	1004	$2,00 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
500	502	$1,00 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
250	251	$0,50 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
125	125	$0,25 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
Branco	-	-	10	10	9	10	0	0	1	0

A tabela 18 mostra a quantidade de larvas vivas e mortas, a concentração do composto **19** em ppm e em mol L⁻¹ e o volume de solução estoque adicionada para cada dose no teste de toxicidade do composto **19** onde a solução estoque tinha uma concentração de 10^{-2} mol L⁻¹.

Tabela 18: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto **19**.

Concentração (ppm)	V adionado da sol. Estoque (μL)	Concentração após diluição (mol L ⁻¹)	Larvas vivas				Larvas mortas			
1000	882	$1,76 \times 10^{-3}$	10	10	10	9	0	0	0	1
500	441	$0,88 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
250	220	$0,44 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
125	110	$0,22 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
Branco	-	-	10	10	9	10	0	0	1	0

A tabela 19 mostra a quantidade de larvas vivas e mortas, a concentração do composto **21** em ppm e em mol L⁻¹ e o volume de solução estoque adicionada para cada dose no teste de toxicidade do composto **21** onde a solução estoque tinha uma concentração de 10^{-2} mol L⁻¹.

Tabela 19: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto **21**.

Concentração (ppm)	V adionado da sol. Estoque (μL)	Concentração após diluição (mol L ⁻¹)	Larvas vivas				Larvas mortas			
1000	1935	$3,87 \times 10^{-3}$	0	0	0	0	10	10	10	10
500	967	$1,93 \times 10^{-3}$	0	0	0	1	10	10	10	9
250	484	$0,97 \times 10^{-3}$	7	9	8	9	3	1	2	1
125	242	$0,48 \times 10^{-3}$	10	9	8	10	0	1	2	0
Branco	-	-	10	10	10	9	0	0	0	0

A tabela 20 mostra a quantidade de larvas vivas e mortas, a concentração do composto **22** em ppm e em mol L⁻¹ e o volume de solução estoque adicionada para cada dose no teste de toxicidade do composto **22** onde a solução estoque tinha uma concentração de 10^{-2} mol L⁻¹.

Tabela 20: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto **22**.

Concentração (ppm)	V adionado da sol. Estoque (μL)	Concentração após diluição (mol L ⁻¹)	Larvas vivas				Larvas mortas			
1000	1665	$1,650 \times 10^{-3}$	1	1	2	1	9	9	8	9
500	830	$0,825 \times 10^{-3}$	3	3	2	2	7	7	8	8
250	415	$0,412 \times 10^{-3}$	10	5	4	7	0	5	6	3
125	207	$0,266 \times 10^{-3}$	10	10	9	10	0	0	1	0
Branco	-	-	9	9	10	10	1	1	0	0

A tabela 21 mostra a quantidade de larvas vivas e mortas, a concentração do composto **27** em ppm e em mol L⁻¹ e o volume de solução estoque adicionada para cada dose no teste de toxicidade do composto **27** onde a solução estoque tinha uma concentração de 10^{-2} mol L⁻¹.

Tabela 21: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto **27**.

Concentração (ppm)	V adionado da sol. Estoque (μL)	Concentração após diluição (mol L ⁻¹)	Larvas vivas				Larvas mortas			
1000	887	$1,770 \times 10^{-3}$	10	9	8	10	0	1	2	0
500	443	$0,886 \times 10^{-3}$	9	10	9	10	1	0	1	0
250	222	$0,443 \times 10^{-3}$	9	10	10	10	1	0	0	0
125	111	$0,222 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
Branco	--	-	10	10	10	10	0	0	0	0

A tabela 22 mostra a quantidade de larvas vivas e mortas, a concentração do composto **28** em ppm e em mol L⁻¹ e o volume de solução estoque adicionada para cada dose no teste de toxicidade do composto **28** onde a solução estoque tinha uma concentração de 10^{-2} mol L⁻¹.

Tabela 22: Quantidade de larvas vivas e mortas, concentração da solução após diluição e volume da solução estoque adicionado para ensaio de toxicidade do composto **28**.

Concentração (ppm)	V adionado da sol. Estoque (μL)	Concentração após diluição (mol L ⁻¹)	Larvas vivas				Larvas mortas			
1000	825	$1,850 \times 10^{-3}$	9	10	10	10	1	0	0	0
500	412	$0,925 \times 10^{-3}$	10	10	7	10	0	0	3	0
250	206	$0,463 \times 10^{-3}$	10	10	9	10	0	0	1	0
125	103	$0,231 \times 10^{-3}$	10	10	10	10	0	0	0	0
Branco	-	-	10	10	10	10	0	0	0	0

Os valores de DL_{50} foram calculados como mostrado a seguir na figura 30, utilizando-se como exemplo o composto 5, onde primeiramente foi feito o gráfico de porcentagem de artemias mortas contra a concentração em ppm.

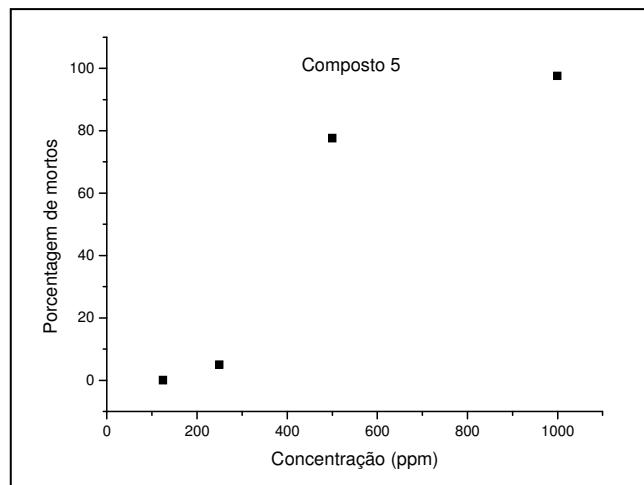


Figura 30. Gráfico da porcentagem de artemias mortas *versus* concentração (ppm) do composto 5.

Posteriormente, aplicou-se o tratamento matemático de Boltzmann, fornecendo a equação da reta, que foi utilizada para determinar a concentração em que 50% das artemias são mortas, como exemplificado na figura 31.

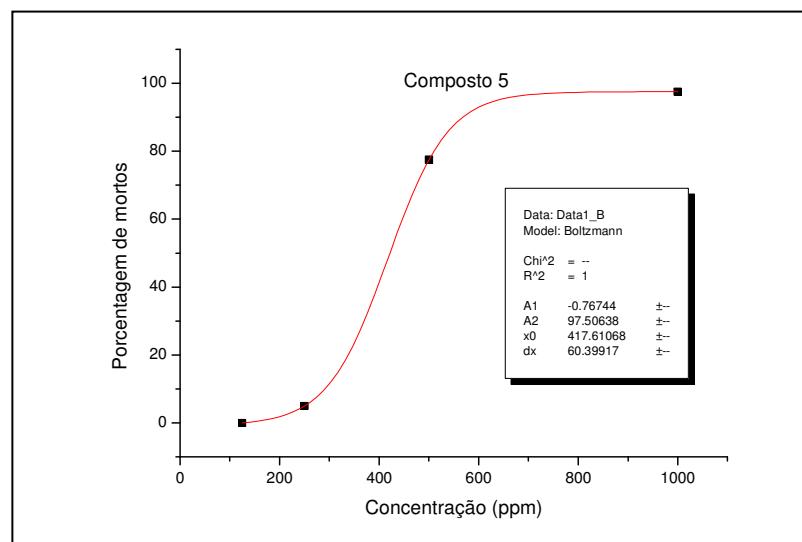


Figura 31. Gráfico da porcentagem de artemias mortas *versus* concentração, após aplicação do tratamento matemático para determinação do valor de DL_{50} para o composto 5.

3.7 Determinação da atividade sequestrante de H₂S das triazinanas

3.7.1 Determinação por titulação potenciométrica

3.7.1.1 Metodologia

O método utilizado foi o potenciométrico por ser mais preciso para determinar o ponto final de titulação. As soluções preparadas com as triazinanas foram tituladas potenciométricamente, utilizando-se como titulante uma solução padronizada de AgNO₃.

3.7.1.2 Soluções

Foram preparadas soluções das triazinanas em água Milli-Q com concentração de 1×10^{-2} mol L⁻¹, utilizando-se balões volumétricos de 25,00 mL. A solução de AgNO₃, utilizada como titulante, foi padronizada potenciométricamente contra cloreto de sódio, como padrão primário. A concentração molar obtida para a solução de AgNO₃ foi $(0,01974 \pm 0,0017)$ mol L⁻¹.

3.7.1.3 Procedimento

Foram transferidos 2,00 mL das soluções estoques das triazinanas com concentração de 1×10^{-2} mol L⁻¹ para os respectivos bêcheres, aos quais foram adicionados mais 30 mL de água Milli-Q. Em seguida, foi adicionado sulfeto de sódio a solução de maneira que se obtivesse uma proporção de 1:1, 1:2 e 1:3 em concentração molar em relação a triazinana.

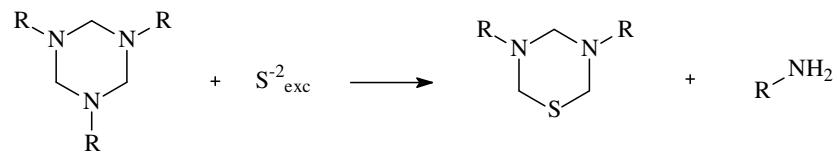
Estas novas soluções foram tituladas potenciométricamente com AgNO₃ e as curvas registradas pelo potenciógrafo. Este procedimento foi repetido no mínimo três vezes para cada solução.

Através dos gráficos foram lidos os volumes de titulante gastos nos pontos de equivalência para cada solução de triazinana. Com esses valores foram calculadas as concentrações de sulfeto residual.

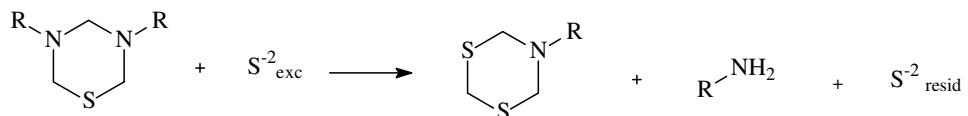
3.7.1.4 Cálculos

Considerando as reações esquemáticas:

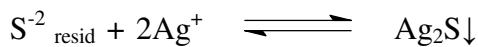
1^a Etapa



2^a Etapa



Na titulação considerando-se a reação:



No ponto de equivalência, teremos:

$$[\text{S}^{-2}] = 2[\text{Ag}^+]$$

Onde,

$[\text{S}^{-2}]$ = Concentração de sulfeto residual

$[\text{Ag}^+]$ = Concentração de prata

E a concentração de sulfeto residual foi calculada a partir de:

$$2 \text{ M}_{\text{sulf}} \times V_{\text{sulf}} = \text{M}_{\text{prat}} \times V_{\text{prata}}$$

Onde,

M_{prat} = Concentração da solução padrão de prata.

V_{prata} = Volume da solução de prata adicionado no ponto final de titulação.

V_{sulf} = Volume inicial da solução de sulfeto.

M_{sulf} = Concentração de sulfeto residual.

3.7.2 Determinação por titulação iodimétrica

3.7.2.1 Metodologia

O método utilizado foi o iodimétrico por se mostrar eficiente na determinação de sulfeto (VOGEL, 1989). As soluções preparadas com as triazinanas foram tituladas volumetricamente, utilizando-se como titulante uma solução padronizada de I_2 .

3.7.2.2 Soluções

Foram preparadas soluções das triazinanas em água Milli-Q com concentração na ordem de 1×10^{-1} mol L⁻¹, utilizando-se balões volumétricos de 25,00 mL. A solução de I_2 estabilizada com KI, utilizada como titulante, foi padronizada volumetricamente contra tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$), que foi padronizado contra iodato de potássio (KIO_3) como padrão primário. A concentração molar obtida para o KI_3 foi de $(0,05235 \pm 0,0011)$ mol L⁻¹.

3.7.2.3 Procedimento

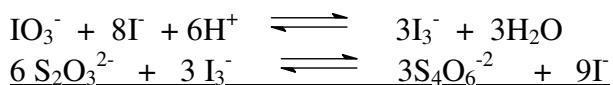
Foram pipetados 10,00 mL das soluções estoques das triazinanas de concentração 1×10^{-2} mol L⁻¹, e transferidas para os respectivos bêcheres, aos quais foram adicionados mais 40 mL de água Milli-Q (utilizando-se pipetas previamente calibradas). Em seguida, foi adicionado sulfeto de sódio a solução para que se obtivesse uma proporção de 1:1, 1:2 e 1:3 em concentração molar em relação a triazinana.

Estas novas soluções foram tituladas por volumetria com KI_3 utilizando-se amido como indicador. Este procedimento foi repetido no mínimo três vezes para cada solução.

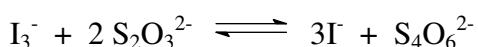
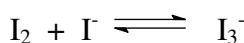
Através da mudança de coloração da solução de incolor para azul intenso foram obtidos os volumes de titulante gastos nos pontos de equivalência para cada solução de triazinana. Com esses valores foram calculadas as concentrações de sulfeto residual.

3.7.2.4 Cálculos

Na padronização do tiosulfato consideraram-se as seguintes reações:

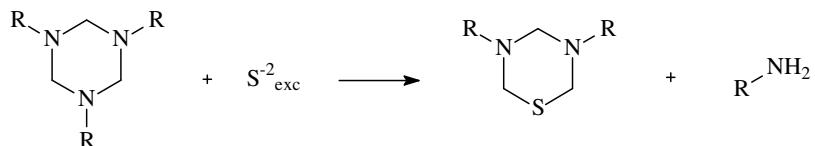


Na padronização do triodeto consideraram-se as seguintes reações:

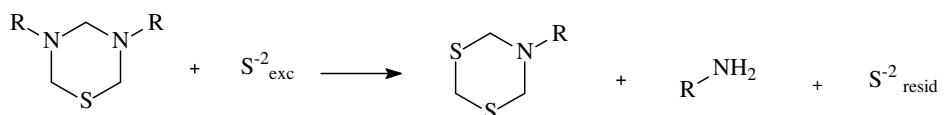


Considerando a reação esquemática:

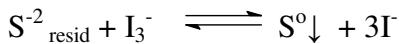
1^a Etapa



2^a Etapa



Na titulação considerou-se:



No ponto de equivalência, considerou-se:

$$[\text{S}^{2-}] = [\text{I}_3^-]$$

Onde,

$[\text{S}^{2-}]$ = Concentração de sulfeto residual

$[\text{I}_3^-]$ = Concentração de triodeto

E a concentração de sulfeto residual foi calculada a partir de:

$$M_{\text{sulf}} \times V_{\text{sulf}} = M_{\text{triodeto}} \times V_{\text{triodeto}}$$

Onde,

M_{iodo} = Concentração da solução padrão de triodeto.

V_{iodo} = Volume da solução de triodeto adicionado no ponto final de titulação.

V_{sulf} = Volume inicial da solução de sulfeto.

M_{sulf} = Concentração de sulfeto residual.

3.7.3 Determinação a partir de monitoramento por RMN ^1H

3.7.3.1 Metodologia

Para o monitoramento por RMN, foram adicionados 7 mmol de triazinana em 20 mL de água e 1,5 mmol de benzoato de sódio em um balão de fundo redondo de 125 mL. Posteriormente, a solução obtida foi separada em três porções contendo três concentrações distintas, uma para cada experimento, de sulfeto de sódio nono-hidratado ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) perfazendo 7, 14 e 21 mmol. Após adição do sulfeto de sódio o pH foi ajustado com adição de ácido clorídrico concentrado, sendo fixado em 5, 7 e 10 para cada concentração distinta de sulfeto de sódio. Logo em seguida, o balão foi vedado e deixado sob agitação magnética. Antes de se adicionar o sulfeto de sódio foi tirada uma alíquota de 0,5 mL, para a obtenção do espectro de RMN de hidrogênio inicial, logo após adição do sulfeto (tempo 0) e após 30, 60 e 90 minutos todos em triplicata. Para a obtenção dos espectros de RMN de ^1H foram adicionadas 3 gotas de água deuterada em cada alíquota para obtenção do LOCK.

Os espectros de RMN foram obtidos em espetrômetro Bruker BioSpin modelo Ultrashield Plus de 500 MHz e em água deuterada como solvente, a uma temperatura de 20 °C com a sequência de pulso zq30 sendo acumuladas 16 repetições para cada decaimento induzido livre (FID), com uma largura espectral de 10330 Hz, 32 K pontos de dados e tempo de aquisição de 3,17 s. Todos os espectros foram tratados utilizando-se o programa ACDLABS 12.0. O benzoato de sódio (BS) foi utilizado como padrão para comparação na integração dos sinais. A integração manual dos sinais selecionados e a comparação com a área do BS (padrão interno) permitiram a determinação quantitativa dos correspondentes compostos nas amostras analisadas.

A quantificação foi realizada através da integração dos sinais e aplicando os resultados na seguinte expressão:

$$\frac{N_p \times H_p}{N_a \times H_a} = \frac{I_p}{I_a}$$

Onde:

N_p = quantidade do padrão (em mol)

H_p = número de hidrogênios relativos ao sinal integrado do padrão

I_p = valor da área da integral do sinal do padrão

N_a = quantidade da amostra (em mol)

H_a = número de hidrogênios relativos ao sinal integrado da triazinana

I_a = valor da área da integral do sinal da amostra

Após o cálculo para a quantificação dos sinais o resultado obtido foi expresso em número de moles para cada uma das alíquotas retiradas durante o ensaio. As tabelas 23-27 mostram os resultados dos ensaios em pH 5, 7 e 10 para os compostos **3** e **5**.

Tabela 23: Quantidade (em mol) dos produtos da reação de sequestro de íons sulfeto pela triazinana **3** através da quantificação por RMN ^1H em pH 7 nas alíquotas de 0,5 mL.

Relação molar Composto 3 / sulfeto	Tempo (minutos)	Quantidade dos compostos (mol 10^{-5})		
		Composto 3	1º produto de sequestro	2º produto de sequestro
1:1	0	-	$4,74 \pm 0,05$	$3,82 \pm 0,09$
	30	-	$3,98 \pm 0,04$	$5,36 \pm 0,08$
	60	-	$3,63 \pm 0,04$	$5,72 \pm 0,1$
	90	-	$2,48 \pm 0,03$	$6,49 \pm 0,1$
1:2	0	-	$1,57 \pm 0,03$	$5,17 \pm 0,02$
	30	-	-	$6,53 \pm 0,07$
	60	-	-	$7,15 \pm 0,05$
	90	-	-	$6,88 \pm 0,05$
1:3	0	-	$1,03 \pm 0,07$	$5,75 \pm 0,06$
	30	-	-	$7,08 \pm 0,1$
	60	-	-	$7,18 \pm 0,08$
	90	-	-	$6,64 \pm 0,06$

Tabela 24: Quantidade (em mol) dos produtos da reação de sequestro de íons sulfeto pela triazinana **3** através da quantificação por RMN ^1H em pH 10 nas alíquotas de 0,5 mL.

Relação molar Composto 3/ sulfeto	Tempo (minutos)	Quantidade dos compostos (mol 10^{-5})		
		Composto 3	1º produto de sequestro	2º produto de sequestro
1:1	0	-	$2,9 \pm 0,07$	$1,12 \pm 0,06$
	30	-	$3,15 \pm 0,22$	$1,04 \pm 0,04$
	60	-	$3,6 \pm 0,01$	$1,02 \pm 0,02$
	90	-	$3,67 \pm 0,01$	$1,13 \pm 0,03$
1:2	0	-	$3,15 \pm 0,05$	$1,17 \pm 0,02$
	30	-	$3,45 \pm 0,05$	$1,24 \pm 0,05$
	60	-	$3,52 \pm 0,08$	$1,24 \pm 0,02$
	90	-	$3,52 \pm 0,08$	$1,31 \pm 0,05$
1:3	0	-	$3,92 \pm 0,02$	$1,42 \pm 0,07$
	30	-	$4,57 \pm 0,03$	$1,9 \pm 0,1$
	60	-	$4,69 \pm 0,08$	$1,83 \pm 0,1$
	90	-	$4,52 \pm 0,06$	$1,65 \pm 0,1$

Tabela 25: Resultados obtidos pela quantificação por RMN em pH 5 do composto **3** nas alíquotas de 0,5 mL.

Relação molar entre sequestrante e sulfeto	Tempo de reação (minutos)	Quantidade (em mol)		
		Composto 3	1º produto de sequestro	2º produto de sequestro
1:1	0	-	*	$2,46 \times 10^{-5}$
	30	-	*	$2,8 \times 10^{-5}$
	60	-	*	$2,83 \times 10^{-5}$
	90	-	*	$2,83 \times 10^{-5}$

* Os sinais se sobrepõem impedindo a quantificação.

Tabela 26: Quantidade (em mol) dos produtos da reação de sequestro de íons sulfeto pela triazinana **5** através da quantificação por RMN ^1H em pH 7 nas alíquotas de 0,5 mL.

Relação molar Composto 5/ sulfeto	Tempo de reação (minutos)	Quantidade dos compostos (mol 10^{-5})		
		Composto 5	1º produto de sequestro	2º produto de sequestro
1:1	0	-	$4,45 \pm 0,17$	$2,77 \pm 0,05$
	30	-	$5,02 \pm 0,09$	$3,39 \pm 0,07$
	60	-	$4,83 \pm 0,04$	$3,58 \pm 0,16$
	90	-	$4,58 \pm 0,03$	$4,02 \pm 0,22$
1:2	0	-	$3,57 \pm 0,37$	$4,34 \pm 0,04$
	30	-	$3,92 \pm 0,25$	$5,04 \pm 0,22$
	60	-	$3,77 \pm 0,21$	$6,35 \pm 0,21$
	90	-	$3,7 \pm 0,19$	$6,92 \pm 0,13$
1:3	0	-	$2,76 \pm 0,4$	$4,94 \pm 0,1$
	30	-	$2,42 \pm 0,36$	$5,34 \pm 0,08$
	60	-	$2,17 \pm 0,19$	$6,95 \pm 0,2$
	90	-	$2,03 \pm 0,15$	$6,82 \pm 0,18$

Tabela 27: Quantidade (em mol) dos produtos da reação de sequestro de íons sulfeto pela triazinana **5** através da quantificação por RMN ^1H em pH 10 nas alíquotas de 0,5 mL.

Relação molar Composto 5/ sulfeto	Tempo de reação (minutos)	Quantidade dos compostos (mol 10^{-5})		
		Composto 5	1º produto de sequestro	2º produto de sequestro
1:1	0	-	$1,68 \pm 0,15$	-
	30	-	$1,45 \pm 0,15$	-
	60	-	$1,31 \pm 0,09$	-
	90	-	$1,3 \pm 0,09$	-
1:2	0	-	$1,81 \pm 0,1$	$0,78 \pm 0,04$
	30	-	$1,60 \pm 0,05$	$0,38 \pm 0,07$
	60	-	$1,55 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,03$
	90	-	$1,56 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,03$
1:3	0	-	$2,31 \pm 0,15$	$0,86 \pm 0,07$
	30	-	$1,90 \pm 0,2$	$0,58 \pm 0,09$
	60	-	$1,94 \pm 0,13$	$0,54 \pm 0,05$
	90	-	$1,87 \pm 0,09$	$0,51 \pm 0,05$

3.7.4 Avaliação qualitativa por monitoramento com fita indicadora de acetato de chumbo

3.7.4.1 Metodologia

Em um balão volumétrico de 100,0 mL foram adicionados 0,240 g de sulfeto de sódio ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) e o volume completado com água destilada, obtendo-se uma solução de concentração $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Em outro balão de 100,0 mL foi preparada uma solução aquosa com concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de cada um dos agentes sequestrantes sintetizados, solúveis em água (3, 5, 14, 15, 19 e 20). Posteriormente, foram misturados, em bêcheres, volumes adequados das duas soluções para que fossem obtidas proporções de agentes sequestrante:sulfeto de 1:1, 2:1 e 3:1. Logo em seguida, foi adicionado ácido clorídrico para que o pH das soluções resultantes ficassem em 5, 7 ou 9, em cada ensaio separadamente. Após adição, o bêcher foi fechado e a solução deixada em agitação magnética, sendo que a solução foi monitorada através do papel de acetato de chumbo logo após adição do sulfeto (tempo 0) e após 30, 60 e 90 minutos.

As fotos dos papeis de acetato obtidas pelo acompanhamento das reações entre o composto 3 e o sulfeto de sódio em pH 9, para exemplificar, estão apresentadas nas figuras 32-35.

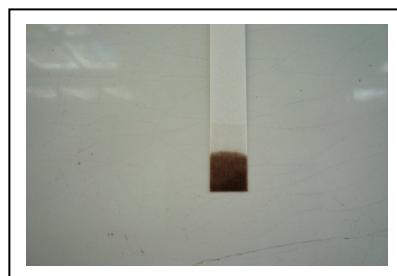


Figura 32. Foto do papel de acetato de chumbo após contato com a solução de sulfeto de sódio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$

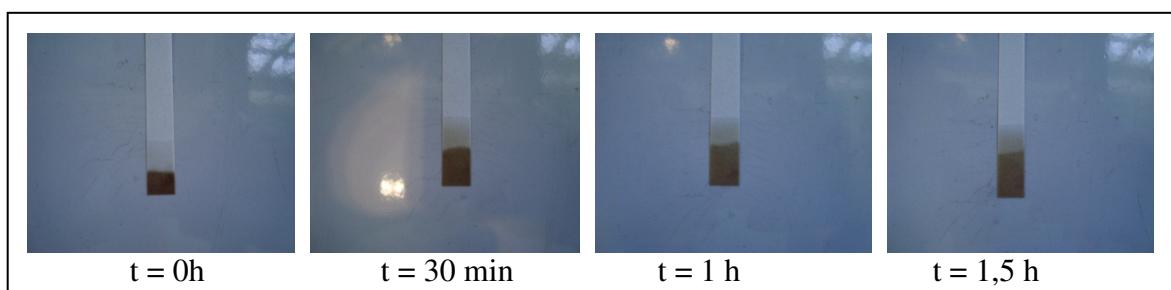


Figura 33. Fotos do papel indicador de sulfeto acompanhando uma reação entre a triazinana (composto 3) e o sulfeto de sódio em uma relação de 1:1 em pH 9.

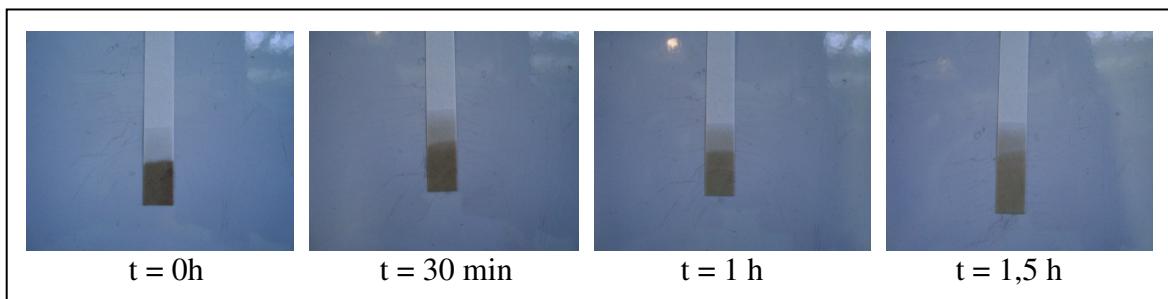


Figura 34. Fotos do papel indicador de sulfeto acompanhando uma reação entre a triazinana (composto **3**) e o sulfeto de sódio em uma relação de 2:1 em pH 9.

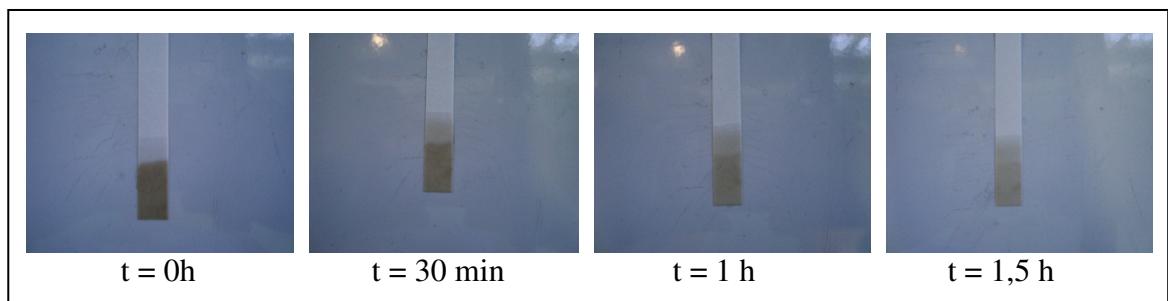


Figura 35. Fotos do papel indicador de sulfeto acompanhando uma reação entre a triazinana (composto **3**) e o sulfeto de sódio em uma relação de 3:1 em pH 9.

A figura 36 mostra a comparação da ação sequestrante do composto **3** em três concentrações, respectivamente, começando da esquerda de cada foto, o papel indicador da solução de sulfeto puro, logo após adição do sequestrante (tempo 0) e após 30, 60 e 90 minutos.

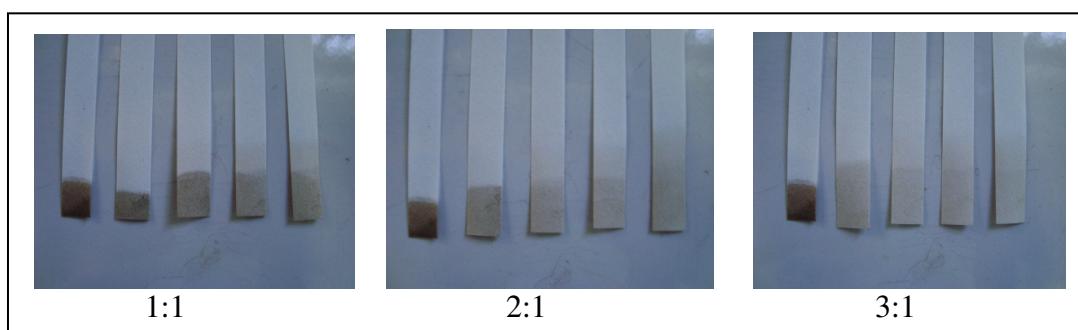


Figura 36. Fotos dos papeis indicadores de sulfeto sendo comparados após acompanhar da reação entre a triazinana (composto **3**) e o sulfeto de sódio em diversas relações (1:1, 2:1 e 3:1) em pH 9.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese das Triazinanas

A síntese das triazinanas foi realizada a partir das aminas primárias correspondentes na presença de formaldeído, de acordo com a reação mostrada na figura 37 utilizando-se metodologia descrita na literatura (SMOLIN & RAPOPORT, 1959). O interesse na obtenção desses compostos heterocíclicos foi para posterior avaliação como possíveis sequestrantes de H₂S na produção de petróleo.

Foram sintetizadas 13 (treze) 1,3,5-triazinanas, sendo, 2-hidroxietil (**3**), 3-hidroxipropil (**5**), benzil (**7**), fenantil (**9**), 2-hidrogenosulfatoetil (**11**), 3-hidrogenosulfatopropil (**12**), 2-sulfatoetil (**14**), 3-sulfatopropil (**15**), 2-dihidrogenofosfatoetil (**16**), 3-dihidrogenofosfatopropil (**17**), 2-fosfatoetil (**18**), 3-fosfatopropil (**19**) e sidnonil (**36**) substituídas, sendo os oito derivados fosfatados e sulfatados (**11**, **12**, **14**, **15**, **16**, **17**, **18** e **19**) inéditos na literatura.

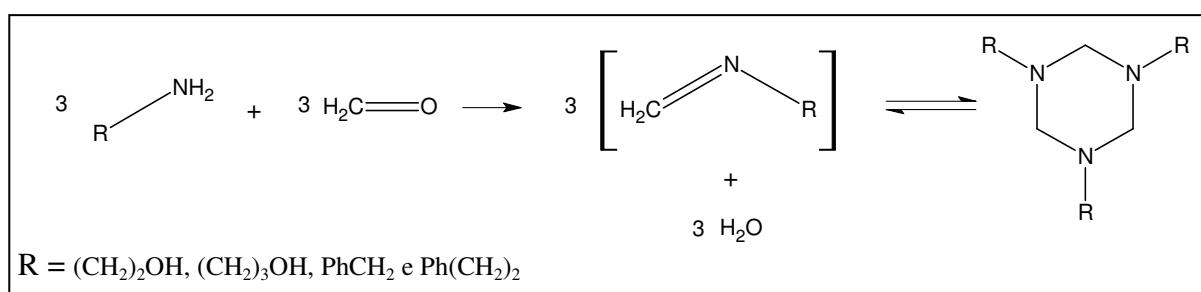


Figura 37. Rota sintética de uma triazinana genérica.

Inicialmente, a reação de obtenção das triazinanas foi conduzida com estequiometria equimolar, embora no fim da mesma o produto apresentasse traços dos reagentes utilizados por se tratar de uma reação reversível, possibilitando assim a obtenção da triazinana com pureza em torno de 70 %. Logo, em função da necessidade da obtenção da triazinana com maior grau de pureza, e pelo fato de a purificação mostrar-se relativamente difícil, a síntese foi realizada com um excesso de formol para possibilitar todo o consumo da amina. O excesso de formol foi então retirado do meio reacional através de evaporação a vácuo o que levou ao produto final puro. A destilação também foi aplicada como método de purificação quando o produto foi obtido a partir da reação equimolar dos reagentes, embora não tenha apresentado bons resultados, pois o aquecimento levou a degradação do produto.

Em geral a formação do produto foi rápida e pode ser acompanhada, algumas vezes, visualmente devido à leve mudança de coloração ou a turvação do meio reacional, embora para que a reação fosse completada era necessário um período em torno de 24 horas.

Devido a presença de grupos hidroxilas nas triazinanas **3** e **5**, estas apresentam um grau de higroscopicidade bem elevado tornando muito difícil de serem obtidas puras. Logo esses produtos foram submetidos a liofilização para a o calculo do rendimento de sua obtenção. A tabela 28 apresenta os rendimentos obtidos por esse método e, a figura 38 mostra o mecanismo simplificado proposto para a formação das triazinanas.

Tabela 28: Rendimento da síntese das triazinanas.

Triazinanas	Rendimento (%)
(3) 1,3,5-tris(2-hidroxietil)-1,3,5-triazinana	98
(5) 1,3,5-tris(2-hidroxipropil)-1,3,5-triazinana	97
(7) 1,3,5-tris-benzil-1,3,5-triazinana	92
(9) 1,3,5-tris-fenetil-1,3,5-triazinana	98
(36) 1,3,5-tris-sidnonil-1,3,5-triazinana	47

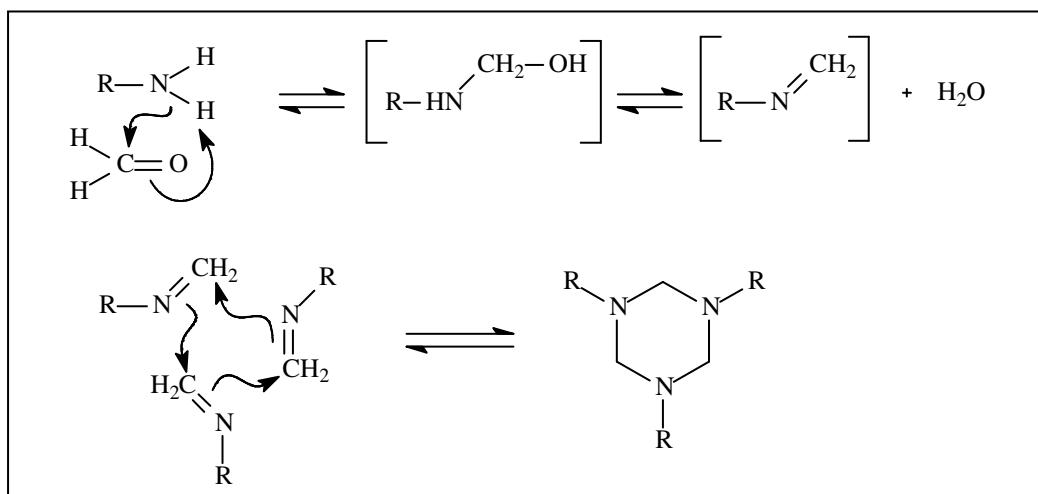


Figura 38. Mecanismo de reação simplificado proposto para a formação das triazinanas.

É importante salientar que a síntese da benzil e fenetil-triazinana (**7** e **9**) foi realizada com o intuito de aumentar a interação dessas moléculas com a fase oleosa na produção do petróleo, pois o H₂S também é solúvel nesta fase.

A caracterização espectroscópica das triazinanas sintetizadas foi realizada por RMN de ¹H e ¹³C em água deuterada (compostos **3** e **5**) e em DMSO deuterado (compostos **7** e **9**), e as atribuições de deslocamento químico estão apresentadas na parte experimental. As triazinanas se apresentaram sem muitas variações nos deslocamentos químicos quando comparadas entre si, com exceção do composto **5** que apresentou um valor para o carbono do anel heterocíclico maior que as outras triazinanas sintetizadas como mostra a tabela 29. Este fato pode estar relacionado com o tamanho da cadeia exocíclica, que possibilita a interação dos pares de elétrons dos nitrogênios do anel com a hidroxila presente na mesma, através de uma ligação hidrogênio, ocasionando, assim, um efeito de desproteção sobre os átomos de carbono do anel como ilustra a figura 39.

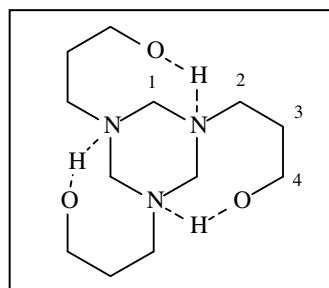


Figura 39. Possibilidade de ligação hidrogênio da estrutura do composto **5**.

Tabela 29: Deslocamentos químicos do carbono do anel das triazinanas sintetizadas.

Composto	Deslocamento químico (ppm)
	δ C-1
3	73,82
5	82,65
7	74,51
9	73,83

4.2 Estudo da Estabilidade da Triazinana (3)

A triazinana **3**, após alguns meses de sua obtenção, mesmo guardada em recipiente fechado e ao abrigo da luz, mostrou o aparecimento de sinais nos espectros de RMN de ^{13}C que indicavam sua degradação, como pode ser observado nos espectros nas figuras 40 e 41.

Este fato poderia estar relacionado com a presença de água na triazinana sintetizada devido a grande dificuldade em sua retirada e a reversibilidade da reação. As figuras 40 e 41 apresentam os espectros de RMN de ^1H com a atribuição dos deslocamentos químicos.

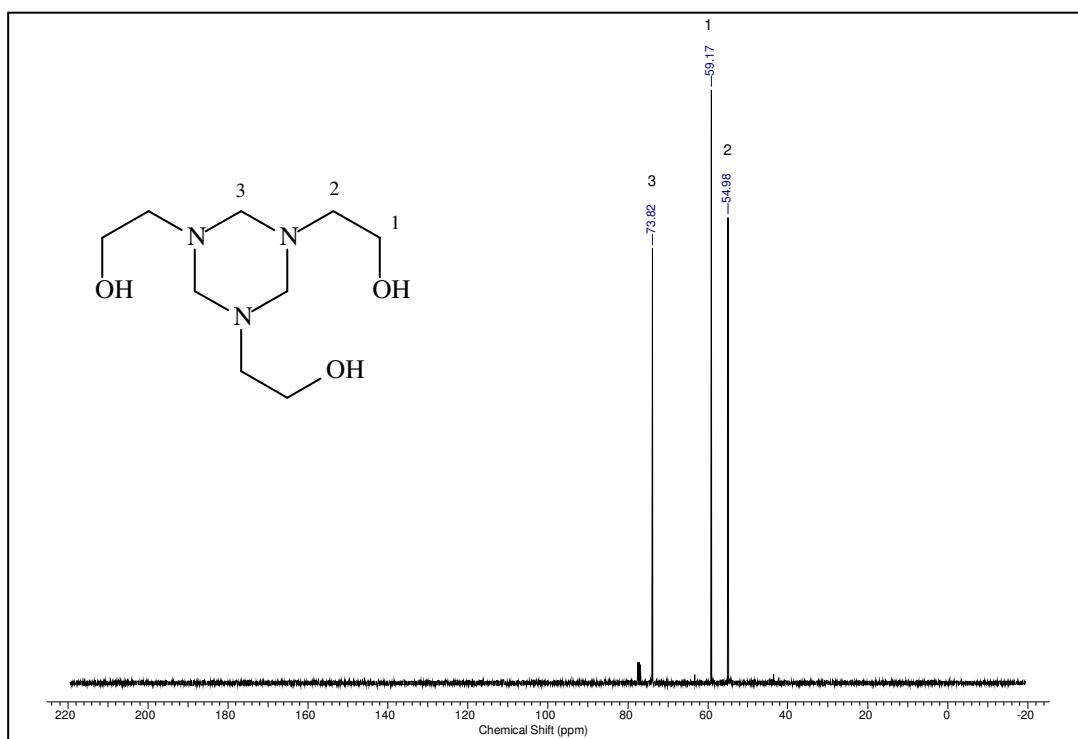


Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C da triazinana **3** obtido em 13 de julho de 2009.

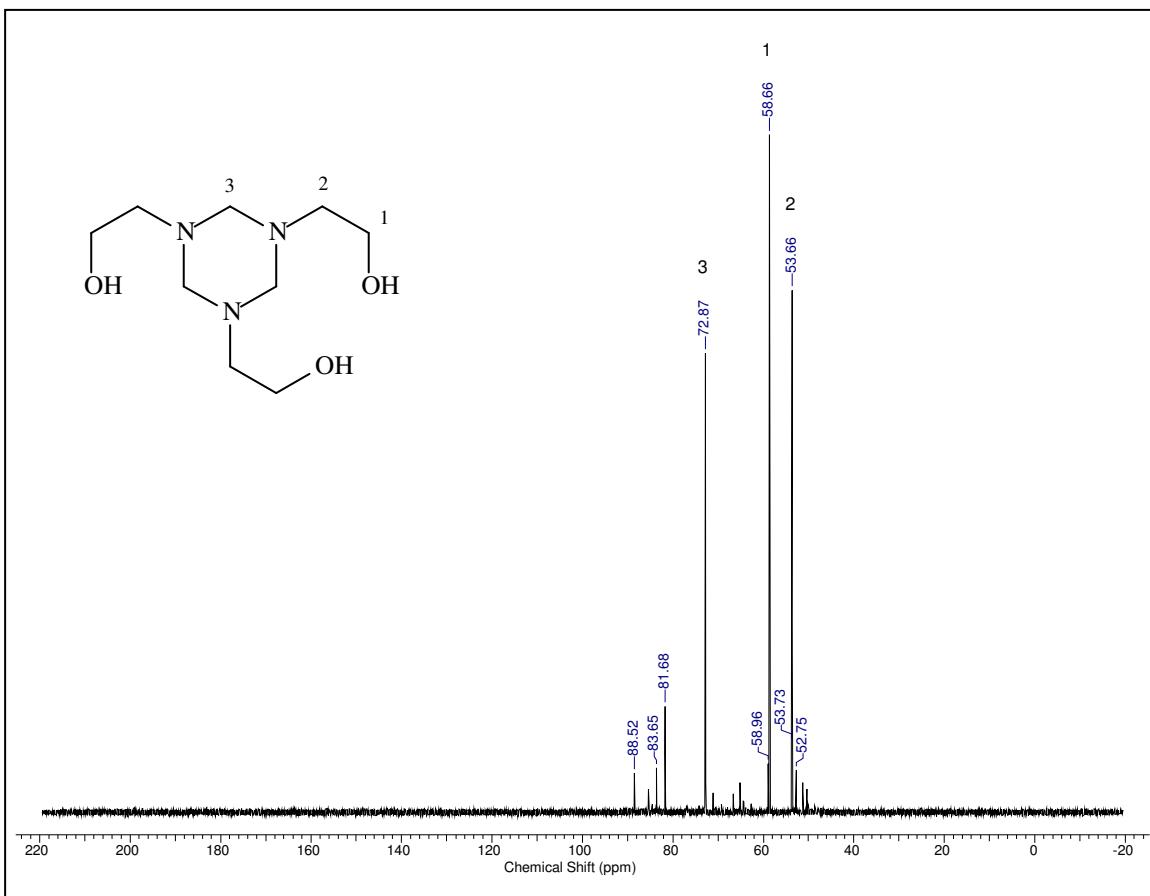


Figura 41. Espectro de RMN ^{13}C da triazinana **3** obtido em 23 de setembro de 2009.

A degradação da triazinana pode ser observada uma vez que foram obtidos para a mesma reação, realizadas com e sem banho de gelo durante a adição dos reagentes, produtos de coloração e aspecto físico levemente diferentes. Para o composto **3**, por exemplo, obteve-se como produto um óleo de viscosidade semelhante, mas com três cores distintas, incolor, amarelo e vermelho. A figura 42 mostra uma foto de dois produtos obtidos para o composto **3**.



Figura 42. Foto do composto **3** com duas colorações distintas.

Essa ocorrência foi bem interessante e inesperada, pois de acordo com a estrutura do composto sintetizado (**3**), o produto obtido deveria ser incolor e não de uma coloração intensa como o vermelho, pois não há cromóforos em conjugação na molécula que justificasse essa coloração. A única diferença na síntese destes compostos foi na temperatura de adição do formol à amina, que no caso do composto incolor, foi feita a baixa temperatura (banho de gelo), uma vez que a reação é exotérmica. Enquanto para o produto vermelho a adição foi feita em temperatura ambiente.

Também foi observado que o composto **3**, em sua forma incolor, quando em solução aquosa e submetido a 100°C por mais que 30 minutos, sofre escurecimento, tornando-se primeiramente amarelada e com o passar do tempo avermelhada. As figuras 43 - 45 mostram as fotos que ilustram a situação exposta acima, onde o composto **3** foi solubilizado com solução salina, em tubo de ensaio, nas concentrações de 80.000, 40.000, 20.000 e 10.000 ppm (nas fotos da esquerda para a direita respectivamente) adicionando-se uma solução de xileno:etanol (1:1) para mimetizar a natureza do petróleo, sendo que estes tubos foram expostos a variação de temperatura. Esse experimento foi realizado com o intuito de observar se os compostos sintetizados sofreriam alguma mudança durante o trajeto de injeção em um poço de extração no subsal, uma vez que durante o trajeto ocorrem várias mudanças bruscas de temperatura e pressão. A única alteração que ocorreu foi o escurecimento da solução aquosa sem qualquer outra alteração, e somente do composto **3**, acredita-se que não seja necessário o detalhamento e a demonstração dos outros experimentos.

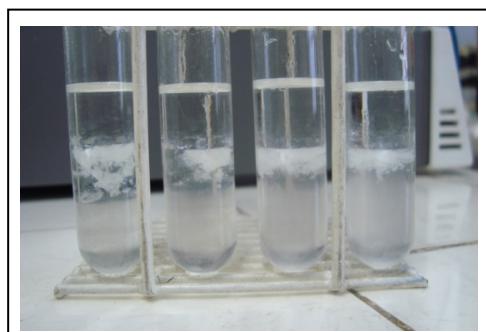


Figura 43. Solução salina contendo o composto **3** (solução incolor) + xileno:etanol (1:1) com 10 minutos a 100°C.

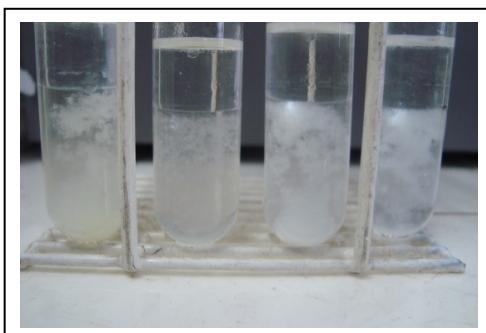


Figura 44. Solução salina contendo o composto **3** (solução incolor) + xileno:etanol (1:1) com 30 minutos a 100°C.

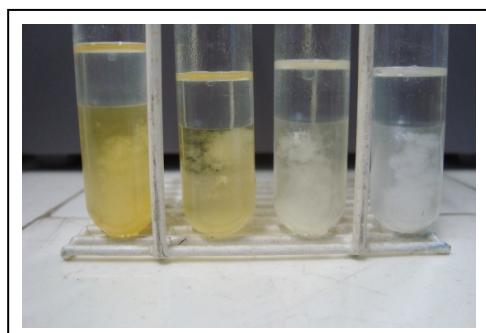


Figura 45. Solução salina contendo o composto **3** (solução incolor) + xileno:etanol (1:1) com 60 minutos a 100°C.

Conforme observado nas figuras 43-45 há uma mudança visível na coloração da solução quando está é aquecida por mais de 30 minutos, e essa variação é mais dependente da concentração da triazinana, ou seja, a intensidade da coloração aumenta com o aumento da concentração. O precipitado observado ocorre devido a evaporação da água do mar artificial em função do aumento da temperatura ocasionando a precipitação dos sais que a compõem. Esse teste também foi realizado baixando a temperatura até 5 °C, mas, não ocorreu nenhuma alteração, com nenhuma das triazinanas sintetizadas.

Devido às questões destacadas foram realizadas análises de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-MS) dos três produtos obtidos com diferentes colorações (incolor, amarela e vermelha) para o composto **3**, com a finalidade de elucidar quantos eram os produtos de degradação.

Para a análise foi utilizada uma coluna capilar DB-5 com temperatura inicial de 25 °C e uma rampa de temperatura de 1,5 °C por minuto até 250 °C. Os cromatogramas correspondentes dos espectros de massas obtidos encontram-se em anexo (página 102-111).

O resultado da análise dos cromatogramas mostrou que os três produtos são de fato o composto **3**, mas com a presença de outras substâncias. O produto de coloração vermelha apresentou uma substância mais volátil e não reconhecida e que ainda se encontra em análise. Além disso, foi possível observar a presença da substância 3-oxazolidina etanol, que não estava inicialmente presente na amostra e é formada devido à degradação gerada pela alta temperatura em que a amostra foi submetida durante o experimento na câmara de injeção do CG. A figura 46 mostra o esquema de interações proposto para a formação da 3-oxazolidina etanol, sendo que outros trabalhos na literatura também relatam esse acontecimento (TAYLOR & MATHERLY, 2010).

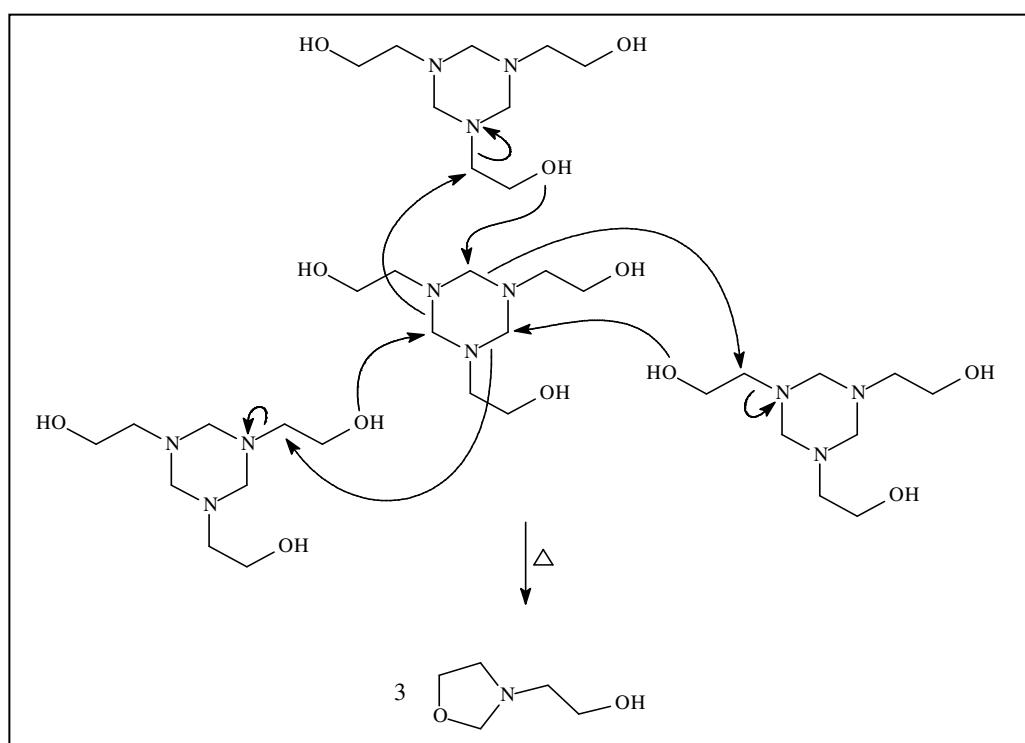


Figura 46. Esquema proposto para a formação da 3-oxazolidina etanol pela degradação térmica do composto **3**.

4.3 Síntese das Triazinas

Neste trabalho foram sintetizados oito compostos da classe das 1,3,5-triazinas, sendo todas inéditas na literatura. A síntese das 1,3,5-triazinas foi realizada através da reação entre o ácido cianúrico e a amina de interesse, ou seja, as mesmas utilizadas na síntese das triazinana, em THF sob refluxo por 24 horas na presença de carbonato de sódio. Os rendimentos estão mostrados na tabela 30, para os compostos **21-24**, e o mecanismo geral proposto na figura 47.

Tabela 30: Rendimentos das 1,3,5-triazinas obtidas

	Triazinas	Rendimento (%)
(21)	2,4,6-triamino-(2,2',2"-trietanol)-1,3,5-triazina	82
(22)	2,4,6-triamino-(3,3',3"-tripropanol)-1,3,5-triazina	90
(23)	2,4,6-triamino-(<i>N,N',N'</i> -tribenzil)-1,3,5-triazina	40
(24)	2,4,6-triamino-(<i>N,N',N'</i> -trifenetil)-1,3,5-triazina	38

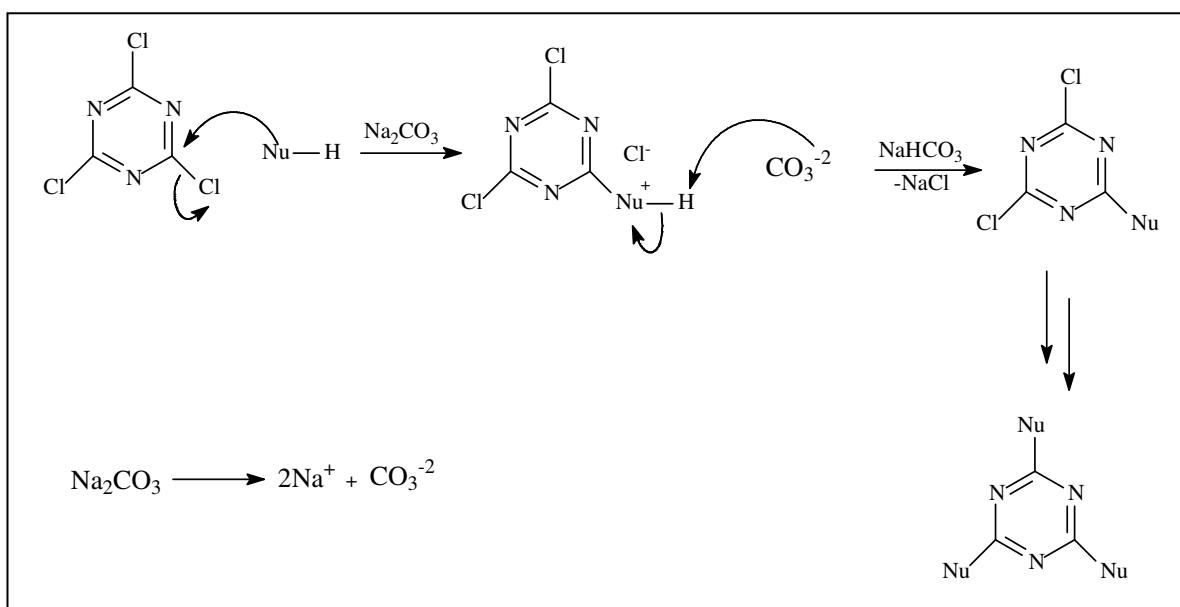


Figura 47. Proposta de mecanismo para a síntese das 1,3,5-triazinas.

As triazinas foram sintetizadas visando sua avaliação de atividade biológica, testes estes que estão sendo realizados em parceria com o pesquisador doutor Fábio Barbour Scott, professor da UFRRJ na área de Parasitologia Veterinária. Os testes biológicos em questão são para o controle de parasitos de animais domésticos, mas os testes ainda não foram concluídos.

A caracterização das triazinas foi feita por RMN de ^1H e ^{13}C em água deuterada (compostos **21** e **22**) e em DMSO deuterado (compostos **23** e **24**), suas atribuições detalhadas de deslocamento químico se encontram na parte experimental.

Os compostos apresentaram deslocamentos químicos bastante semelhantes, só havendo uma mudança expressiva no carbono do anel triazínico nos compostos hidroxilados (**21** e **22**) quando comparados aos aromáticos (**23** e **24**), pois como mostra a tabela 31 observa-se um aumento da proteção nos átomos de carbono dos compostos com grupos hidroxila fazendo com que os deslocamentos químicos ficassem mais baixos quando comparados às triazinas substituídas com os grupos benzil e fenetil. Este fato é devido, provavelmente, a ligação hidrogênio que é formada entre a hidroxila e o grupo NH da cadeia exocíclica, havendo assim maior liberdade do par eletrônico da ligação N-H, diminuindo, deste modo, o efeito de desproteção no carbono do anel heterocíclico como ilustra a figura 48.

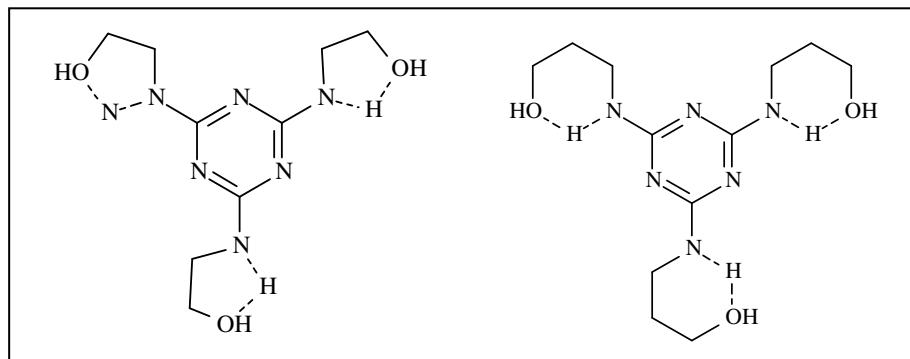


Figura 48. Possibilidade de ligação hidrogênio da cadeia exocíclica para as estruturas dos compostos **21** e **22**.

Tabela 31: Deslocamentos químicos do carbono aromático das triazinas sintetizadas.

Composto	Deslocamento químico (ppm)	
	δ C-1	δ C-2
21	104,49	104,49
22	104,40	104,40
23	165,98	165,98
24	166,78	166,78

4.4 Síntese das Triazinanas e Triazinas Sulfato e Fosfato-substituídas

A modificação estrutural com a incorporação de grupos sulfato, quando possível, nas 1,3,5-triazinanas e nas 1,3,5-triazinas, foi realizada através de reações com ácido cloro-sulfônico e, posteriormente, de base para a obtenção dos sais de sódio correspondentes, conforme ilustrado para as triazinanas na figura 49.

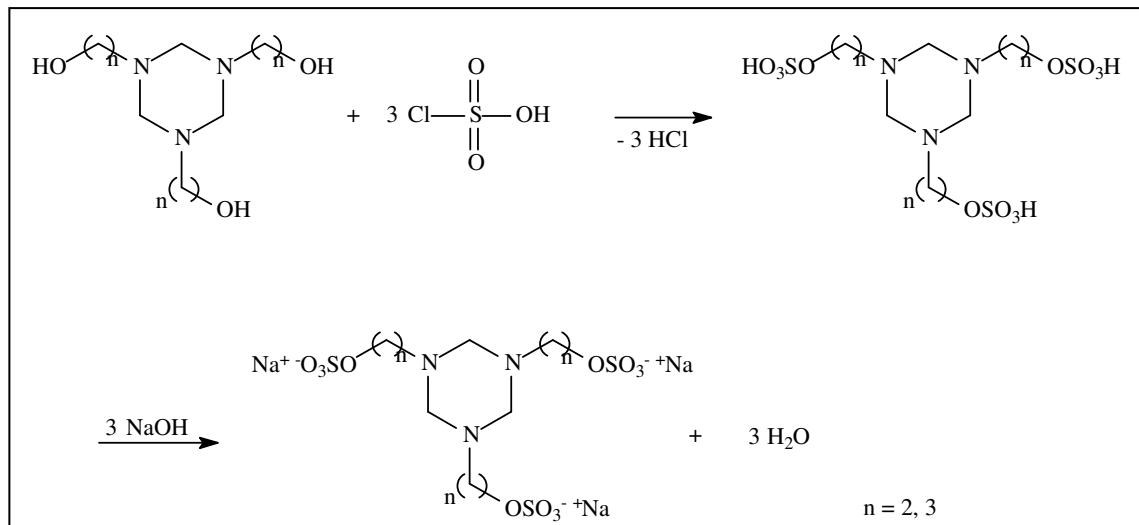


Figura 49. Rota sintética da modificação de uma triazinana genérica para a obtenção de seus respectivos produtos sulfatados e sais de sódio.

A reação entre as triazinanas ou triazinas e o ácido cloro-sulfônico é muito rápida e exotérmica, e por estas razões foi conduzida em baixas temperaturas. Ademais, como o ácido cloro-sulfônico é muito reativo, ela deve ser realizada em solvente livre de água ou de grupos que podem reagir com o mesmo.

A reação de sulfatação foi quantitativa e relativamente simples de ser realizada. Inicialmente, ao ser adicionado o ácido cloro-sulfônico formou-se uma pasta ou um sólido que impede a agitação magnética. Após a adição de todo o ácido cloro-sulfônico, foi necessário realizar um leve aquecimento da mistura reacional para que a reação se completasse.

Com relação a reação de neutralização, está também se mostrou simples de ser realizada, embora tenha apresentado dificuldades na obtenção do produto livre de água, uma vez que o mesmo é muito solúvel em água e esta é produzida na própria reação. A figura 50 mostra o mecanismo de reação proposto para a formação das triazinanas sulfatadas e para a obtenção dos sais das mesmas. O procedimento utilizado para a sulfatação, bem como para a obtenção dos sais correspondentes, para as 1,3,5-triazinas com grupos hidróxi em suas estruturas foi similar ao relatado para as triazinanas. A obtenção dos compostos sulfonados, tanto na forma ácida como na forma de sal para as triazinanas e para as triazinas foi quantitativa.

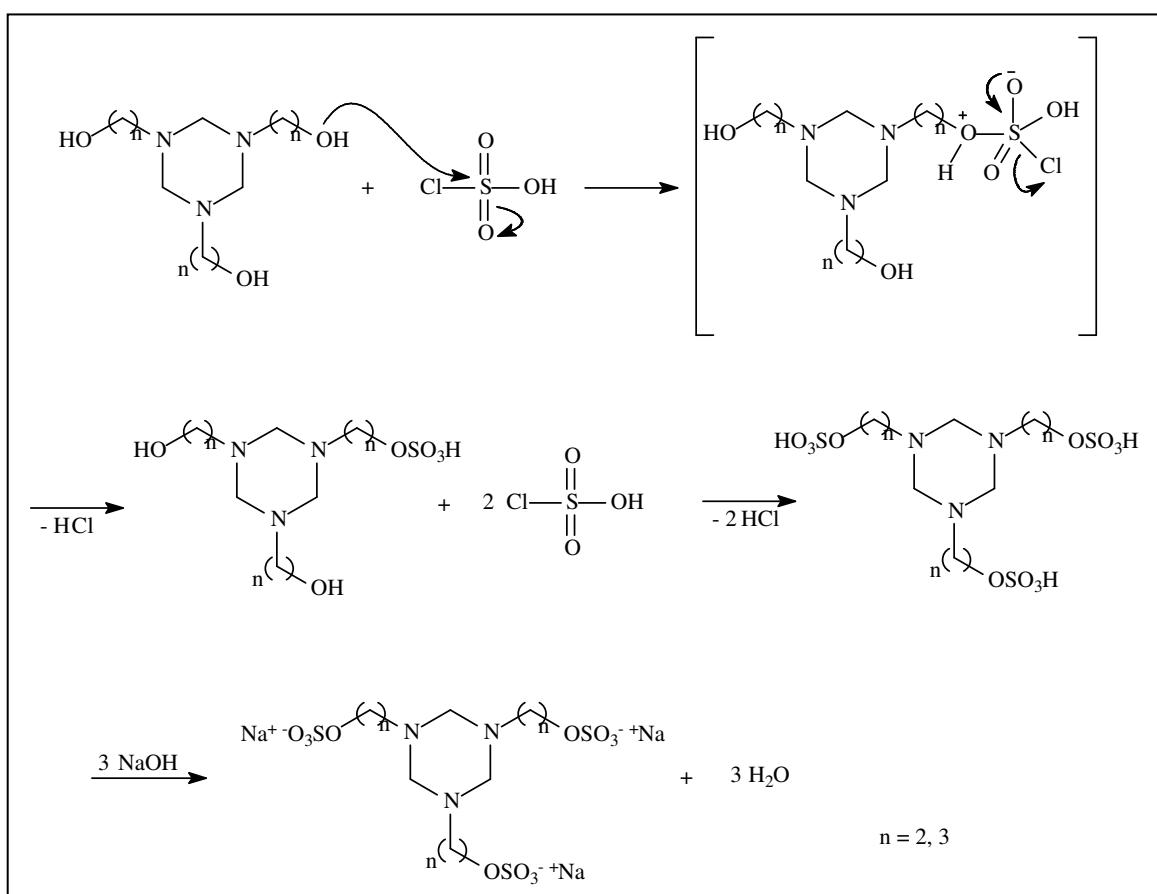


Figura 50. Mecanismo de reação proposto para a formação das triazinanas sulfatadas e da obtenção dos respectivos sais.

Os compostos fosfatados constituem um modelo simples dos constituintes da membrana celular ou de intermediários biológicos envolvidos em muitos caminhos de sinalização e regulação. Na síntese orgânica, o grupo fosfato ou o ácido fosfórico pode ser utilizado para a obtenção de fosfodiesteres ou como grupo protetor. Infelizmente, a maioria dos compostos fosfatados derivados de álcoois não são comerciais. (MACHADO & NOME, 1999)

Os derivados hidroxilados das 1,3,5-triazinanas foram fosfatados a partir de dois métodos, o primeiro por intermédio de uma reação com ácido fosfórico, piridina, anidrido acético e trietilamina sob refluxo. Este método de fosforilação envolve a formação de acetil fosfato, um intermediário de alta energia, capaz de fosforilar álcoois e outros nucleófilos. A figura 51 mostra o esquema simplificado para a reação de fosforilação através deste método.

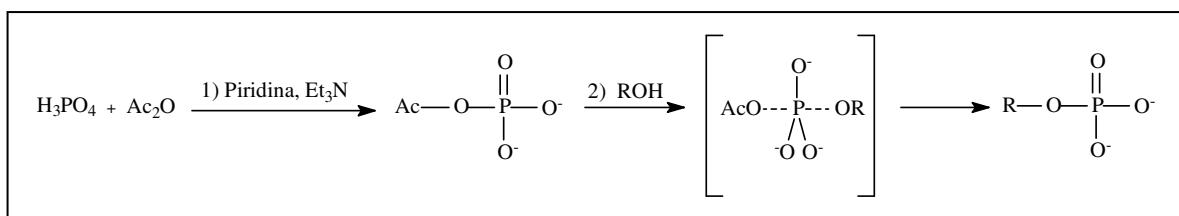


Figura 51. Esquema de reação simplificado para a fosforilação.

Já o segundo método foi a partir da reação do composto hidroxilado com POCl_3 em meio anidro e posterior adição de água para o término da reação. A figura 52 mostra o mecanismo simplificado para a reação de fosforilação através deste método.

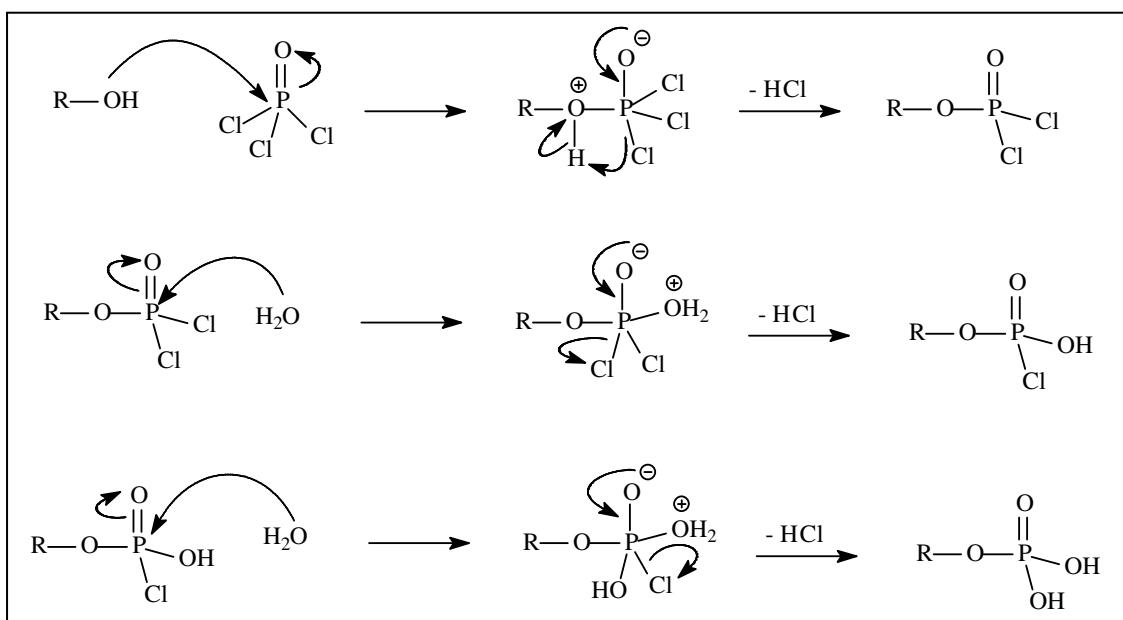


Figura 52. Mecanismo simplificado e genérico para a fosforilação com POCl_3 .

Todos os produtos fosfatados também foram neutralizados com NaOH da mesma forma que os produtos sulfonados. A tabela 32 mostra os rendimentos obtidos para os derivados fosfonados sintetizados, sendo todos eles inéditos na literatura. Todos os sais fosfatados foram obtidos em rendimento quantitativo.

Tabela 32: Rendimentos obtidos para os derivados fosfatados sintetizados.

Compostos	Rendimento (%)	
	Método 1	Método 2
(16) 1,3,5- <i>N,N',N''</i> -(trietil-dihidrofosfato)-triazinana	46	93
(17) 1,3,5- <i>N,N',N''</i> -(tripropil-dihidrofosfato)-triazinana	36	89

O objetivo de se fazer a reação de fosfatação nas triazinanas foi permitir maior solubilidade destes compostos, assim como nos compostos sulfatados, e possibilitar características anti-incrustantes, agindo assim como compostos multifuncionais (sequestrantes de H₂S e anti-incrustantes). Esses compostos foram enviados ao CENPES/PETROBRAS (Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello) para avaliação da múltipla funcionalidade, mas ainda se encontram em processo de testes.

Todos os derivados sulfatos e fosfatos das triazinanas e das triazinas, tanto na forma ácida quanto na forma de sal, foram devidamente caracterizados por RMN de ¹H e ¹³C. As atribuições dos deslocamentos químicos se encontram na parte experimental e os respectivos espectros mencionados em anexo.

Em geral, os deslocamentos químicos de todos os carbonos dos compostos derivados na forma ácida sofreram uma desproteção eletrônica, obtendo-se assim, valores mais elevados, quando comparados as respectivas triazinanas na forma hidroxilada, fato este, já esperado uma vez que foram adicionados grupos retiradores de elétrons as estruturas iniciais. Essa desproteção é bastante atenuada quando o composto derivado se encontra na forma de sal, pois a densidade eletrônica é maior sobre os grupos retiradores de elétrons nesta forma. A tabela 33 mostra os deslocamentos químicos para os átomos do anel heterocíclico e dos diretamente ligados aos grupos retiradores dos compostos mencionados.

Tabela 33: Deslocamentos químicos dos átomos do anel e os diretamente ligados aos grupos retiradores dos compostos triazínicos e triazinanicos.

Composto	Deslocamento químico (ppm)			
	δ H-1	δ C-1	δ H- <i>ipso</i>	δ C- <i>ipso</i>
3	2,76	73,82	3,57	59,17
5	3,65	82,59	3,78	67,65
11	4,40	81,50	3,74	64,19
12	4,50	76,32	3,68	67,00
14	3,40	64,84	3,88	58,27
15	3,29	66,30	3,65	59,00
16	4,19	79,23	4,33	67,14
17	4,45	79,20	3,74	72,01
18	2,74	61,78	3,53	59,85
19	3,49	58,97	3,86	60,01
21	-	104,49	3,47	62,88
22	-	104,40	3,52	59,57
25	-	166,32	4,25	64,61
26	-	165,76	4,12	66,25
27	-	164,85	4,20	65,06
28	-	164,53	4,06	66,42

4.5 Síntese dos derivados mesoiônicos da classe oxadiazólio-olato

O derivado mesoiônico da classe 1,2,3-oxadiazol-5-olato, ou seja a sidnona, foi obtido através da rota sintética clássica que envolve a reação de desidratação de nitroso-glicinas (OGATA *et al.*, 1974). A figura 53 mostra o esquema de síntese utilizado.

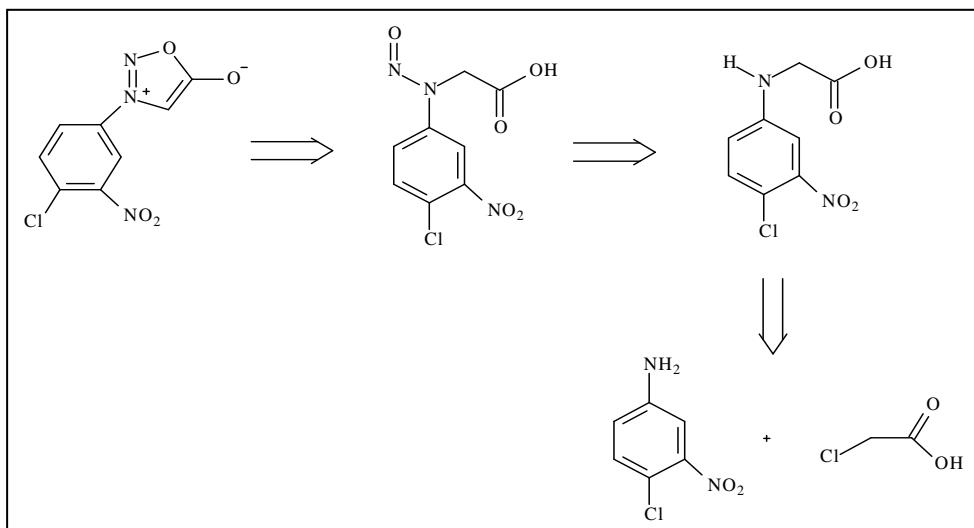


Figura 53. Retrossíntese para a obtenção da sidnona 3-nitro-4cloro substituída.

A primeira etapa dessa rota consistiu na reação entre uma amina aromática e o ácido monocloroacético originando a glicina correspondente. A reação ocorreu lentamente devido a natureza da amina, pois aminas aromáticas com grupos retiradores de elétrons dificultam a reação levando assim, à necessidade de um tempo de reação prolongado. O produto desta primeira etapa foi obtido como um sólido de coloração amarela, e o rendimento foi de 79 %. A figura 54 mostra o mecanismo proposto de reação para obtenção da glicina substituída pela metodologia indicada.

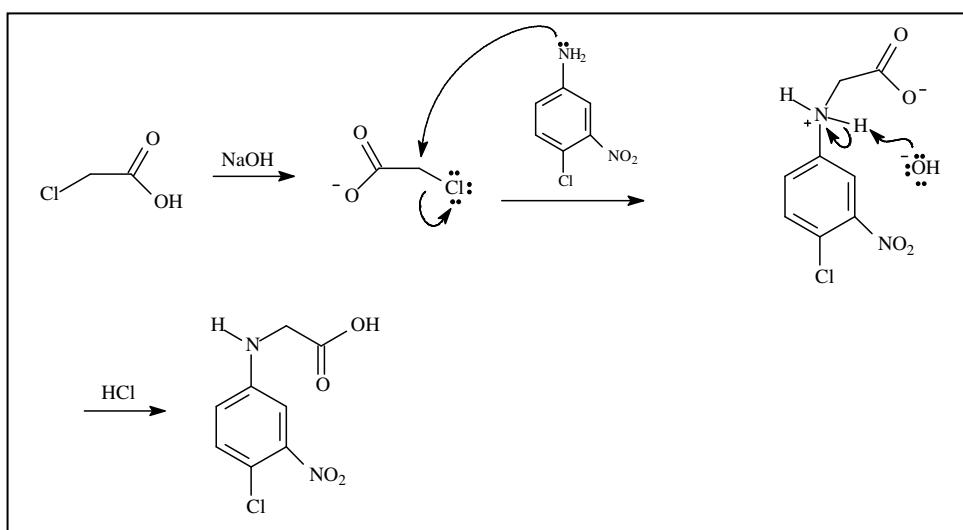


Figura 54. Mecanismo de reação proposto para a formação das glicinas substituídas.

A segunda etapa, conforme apresentado na figura 55, consistiu na nitrosação da glicina. Nessa etapa foi importante que a glicina substituída estivesse finamente pulverizada, de preferência totalmente solubilizada, e que tanto esta solução quanto a solução de nitrito de sódio estivessem a uma temperatura próxima de 0 °C, para evitar a perda do ácido nitroso formado. A reação ocorreu rapidamente e o produto obtido apresentou rendimento de 80%. A nitroso-glicina, também se apresentou na forma sólida de coloração semelhante à da glicina substituída. A figura 55 mostra o mecanismo de reação para a preparação da nitroso-glicina substituída.

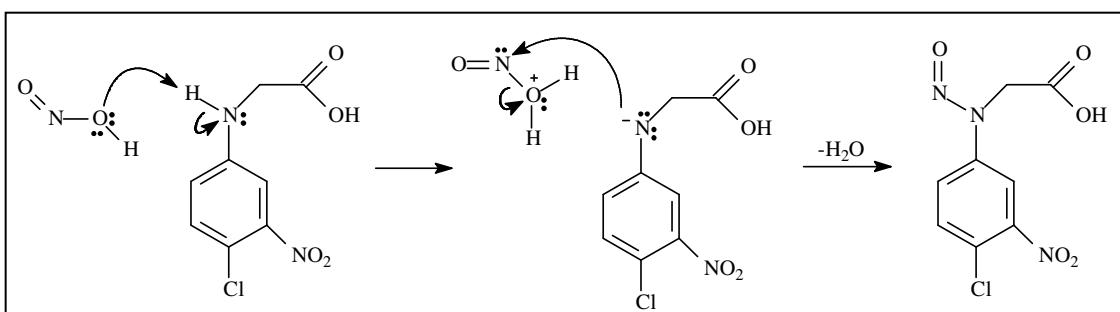


Figura 55. Mecanismo de reação proposto para a formação das nitroso-glicinas substituídas.

A última etapa da síntese da sidnona foi a desidratação da nitroso-glicina, e para esse fim foi utilizado o anidrido trifluor-acético. Após a reação ter sido finalizada foi necessário a adição de água para decompor o anidrido em excesso obtendo-se dessa maneira o composto mesoíônico. O rendimento foi de 75%. A figura 56 mostra o mecanismo de reação sugerido para obtenção da sidnona substituída por desidratação da nitroso-glicina.

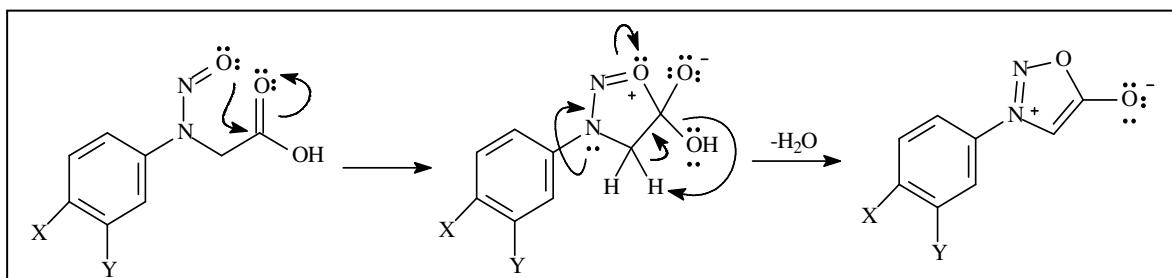


Figura 56. Mecanismo de reação proposto para a formação da sidnona substituída.

A sidnona de escolha foi a 3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazolio-5-olato, devido a mesma apresentar diversas atividades biológicas importantes, como por exemplo, a inibição do transporte de elétrons na cadeia respiratória e o desacoplamento da fosforilação oxidativa, sendo estes efeitos relacionados diretamente com a atividade anticancerígena desta substância, já relatada na literatura, contra carcinoma Ehrlich e Sarcoma 180 (HALILA *et al.*, 2007; GRYNBERG *et al.*, 1992).

Outra atividade interessante que essa substância apresentou e, que foi estudada pelo nosso grupo em colaboração com outros pesquisadores, foi a ação anti-inflamatória. Esses estudos foram realizados em macrófagos de ratos nos quais a atividade citada tem relação com a inibição da produção de óxido nítrico, e a diminuição dos níveis da citocina IL-6 que estão envolvidos no processo de inflamação. Os resultados obtidos, em anexo, demonstram que o efeito da sidnona é muito similar a fármacos anti-inflamatórios e imunossupressores, apresentando, assim, a possibilidade de um estudo mais aprofundado para esclarecimento do

mecanismo de ação e possível utilização desta substância com atividade anti-inflamatória (BIZETTO *et al.*, 2012).

Devido às atividades acima mencionadas e outras relatadas na literatura, surgiu a ideia da síntese da triazinana substituída com a sidnona, uma vez que uma estrutura deste porte comportaria três grupos envolvendo a sidnona, e essas seriam liberadas facilmente pela hidrólise da triazinana, obtendo-se assim, teoricamente, os efeitos das atividades biológicas com aplicações de doses bem menores. Para a síntese da triazinana, no entanto, foi necessário primeiramente a realização de uma reação de substituição nucleofílica.

A reação de substituição nucleofílica aromática da sidnona sintetizada frente a etilenodiamina ocorreu sem muitos problemas, pois a reação foi bastante facilitada devido ao grupo nitro na posição *ortho* ao halogênio, que cria uma grande deficiência eletrônica no carbono no qual ocorreu a substituição nucleofílica. A reação se completou com 3 horas de refluxo apresentando, também, uma mudança na coloração da solução que passou de amarelo a laranja. O produto obtido foi um sólido praticamente puro com 86% de rendimento. A triazinana substituída com grupos sidnonil obtida pela substituição nucleofílica aromática foi encaminhada para avaliação da atividade biológica.

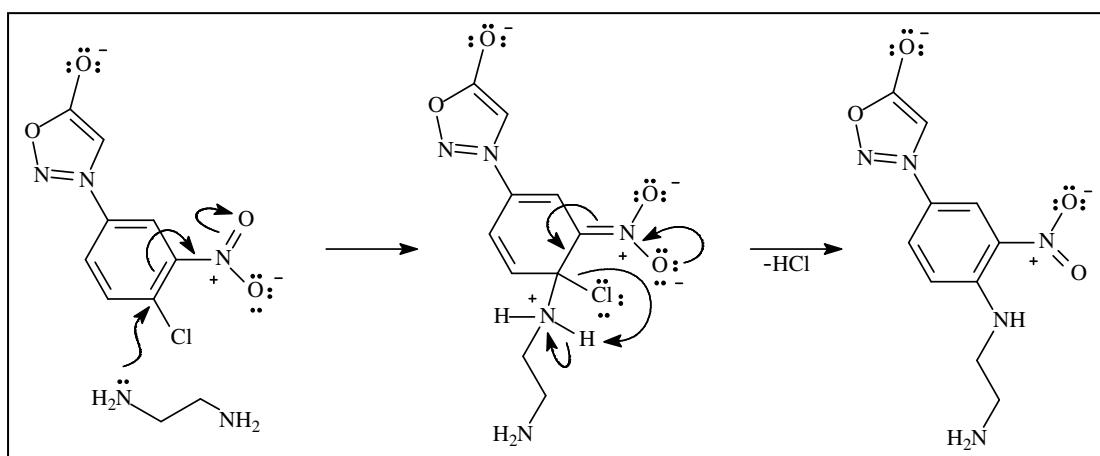


Figura 57. Mecanismo de reação proposto para a reação de substituição nucleofílica aromática para a sidnona.

Os compostos precursores da sidnona sintetizada, inclusive a própria sidnona (3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazolio-5-olato) não foram caracterizados por RMN de ^1H e ^{13}C por já serem relatados na literatura (GRYNBERG *et al.*, 1992), sendo caracterizados por comparação do ponto de fusão, conforme descrito na parte experimental.

A caracterização espectroscópica do produto da substituição nucleofílica aromática (composto 35) foi feito por RMN de ^1H e ^{13}C em DMSO deuterado, e seus dados estão descritos na parte experimental, apresentando os sinais de carbono e hidrogênio bem definidos.

4.6 Determinação dos valores de pKa para as triazinanas

Os valores de pKa(s) das triazinanas foram obtidos pelo método potenciométrico e, sua determinação teve o intuito de relacionar os mesmos com a capacidade sequestrante e/ou com a velocidade da reação de sequestro de H₂S, que será discutida mais a frente, uma vez que a reação passa primeiramente, por uma etapa de protonação como mostram as reações na figura 58, sendo esperado, assim, uma reação mais rápida para as triazinana com maiores valores de pKa. A tabela 34 mostra os valores de pKa(s) obtidos.

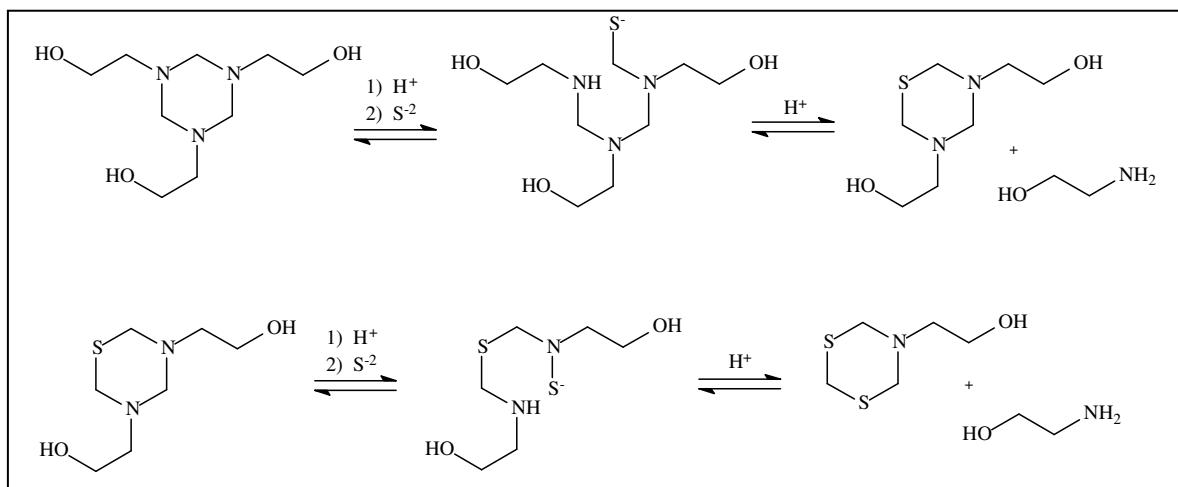


Figura 58. Mecanismo de sequestro de H₂S por triazinanas.

Tabela 34 : Valores de pKa(s) obtidos para as triazinanas sintetizadas.

Composto	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃
3	7,71 ± 0,38	15,30 ± 0,10	-
5	6,43 ± 0,09	14,36 ± 0,06	-
7	3,88 ± 0,05	7,80 ± 0,17	11,72 ± 0,44
9	5,92 ± 0,07	11,46 ± 0,37	-
11	0,08 ± 0,02	-	-
12	1,75 ± 0,32	-	-
14	7,90 ± 0,06	-	-
15	10,44 ± 0,08	-	-

Um fato a ser verificado foi a presença dos pKa₂ para as triazinanas **3**, **5**, **7** e **9** e o pKa₃ para a **9**. Provavelmente esses pKas se devem, no caso das triazinanas **3** e **5**, as hidroxilas de suas cadeias exociclicas ou da sua hidrólise parcial antes da titulação. No caso das triazinanas **7** e **9** esse fato pode ter haver com a hidrólise parcial antes da titulação e com o solvente (metanol) utilizado para a solubilização destes produtos.

Outro fato relevante foram os valores obtidos para o pKa das triazinana **11** e **12**, pois esses valores representam o pKa dos grupos sulfônicos das cadeias exociclicas destas substâncias e não os da protonação dos nitrogênios do anel triazinano o qual não foi observado durante a analise, embora possa-se considerar os valores de pKa dos compostos **14** e **15** como sendo iguais aos do **11** e **12**, respectivamente, para a protonação dos nitrogênios do anel, uma vez que eles são o produto de neutralização dos grupos sulfônicos dos compostos **11** e **12**.

4.7 Toxidez frente a *Artemia Salina*

A finalidade deste ensaio foi verificar o potencial tóxico das substâncias sintetizadas com o objetivo de avaliar os possíveis danos ambientais causados a partir de um vazamento, uma vez que as substâncias testadas têm a finalidade de serem introduzidas nos poços do pré-sal para sequestro do H₂S.

A toxidez foi avaliada através do ensaio de letalidade da *Artemia salina* LEACH que consiste em uma técnica relativamente simples, de baixo custo, além de utilizar pequenas quantidades dos compostos a serem testados.

As substâncias sintetizadas neste trabalho foram testadas a várias concentrações em tubos de vidro contendo água do mar sintética e, um número determinado de larvas. As larvas vivas e mortas foram contadas após 24 h, e os valores de DL₅₀, foram determinados a partir das equações obtidas por tratamento estatístico (Boltzman). A tabela 35 mostra os valores de DL₅₀ obtidos para as substâncias ensaiadas.

Tabela 35: Valores obtidos de DL₅₀ para os compostos ensaiados.

Composto	DL ₅₀ (ppm)	DL ₅₀ (mol L ⁻¹)
3	1028,75	4,70 x 10 ⁻³
5	511,03	1,96 x 10 ⁻³
11	468,73	1,02 x 10 ⁻³
12	450,58	8,99 x 10 ⁻⁴
14	a	a
15	a	a
18	a	a
19	a	a
21	417,98	1,62 x 10 ⁻³
22	468,75	1,56 x 10 ⁻³
27	a	a
28	a	a

^a Não apresentaram ação tóxica até a concentração máxima testada (1000 ppm)

Os resultados obtidos para o ensaio de letalidade mostraram menor toxidez para os derivados sulfatos e fosfatos das triazinana. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) substâncias com valores de DL₅₀ > 1000 ppm(s) em *Artemia salina* são considerados não tóxicos (MEYER *et al.*, 1982). Entretanto, os resultados dos ensaios também mostraram que os derivados hidroxilados e seus respectivos ácidos sulfônicos possuem uma toxidez moderada quando comparados com as triazinanas na forma de sal, que não apresentaram nenhuma ação tóxica até a concentração testada.

Não foi possível a realização do ensaio de toxidez frente à *Artemia salina* para os compostos não solúveis em água do mar sintética (**7, 9, 23, 24, 36**) mesmo utilizando misturas com dimetilsulfóxido (DMSO) e o tensoativo tween 80, pois ocorria precipitação dos mesmos.

4.8 Determinação da atividade sequestrante de H_2S das triazinanas

4.8.1 Determinação por titulação potenciométrica

O método potenciométrico utilizado, embora seja o mais preciso para determinar o ponto final de titulação, mostrou-se incapaz de avaliar a atividade sequestrante de H_2S pelas triazinanas, uma vez que o resultado obtido para a concentração de sulfeto era maior nas soluções contendo sulfeto e sequestrante do que nas soluções somente contendo sulfeto (branco). Essa discrepância foi atribuída a amina presente no meio reacional, pois de acordo com a reação de sequestro, quando esta ocorre, há a liberação de um mol de amina, conforme mostrado na figura 59, e como o titulante utilizado foi o nitrato de prata, poderia haver a complexação entre os íons Ag^+ com a amina liberada no meio (complexos amin-prata) interferindo, assim, na exatidão do método.

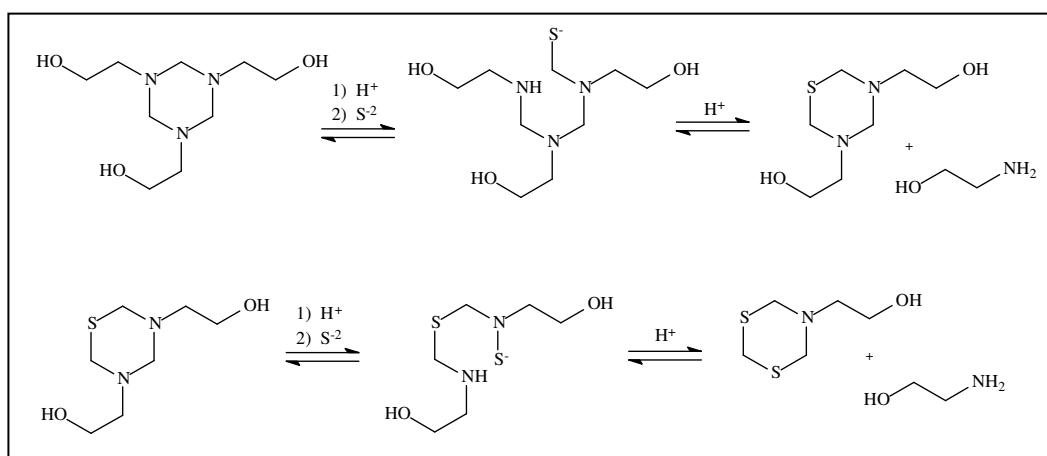


Figura 59. Mecanismo proposto para a reação de sequestro do composto 3.

4.8.2 Determinação por titulação iodimétrica

O método iodimétrico, assim como o potenciométrico, mostrou-se, também, incapaz para a determinação da atividade sequestrante de H_2S , pois todas as titulações das amostras (sulfeto e sequestrante), realizadas por este método revelaram ter o mesmo teor de sulfeto que suas amostras de controle (somente sulfeto e água), o que indica que esse método foi inadequado para a finalidade para qual foi realizado. Muito provavelmente o iodo estivesse reduzindo o sulfeto residual da reação de sequestro e o sulfeto sequestrado resultando, assim, no mesmo teor de sulfeto que a amostra original (branco).

4.8.3 Determinação por RMN

A determinação quantitativa dos produtos de sequestro e, portanto, a atividade sequestrante das triazinanas, foi possível utilizando-se a espectroscopia de RMN de hidrogênio. A análise dos espectros de RMN de hidrogênio da amostra de sequestrante na presença de íons sulfeto possibilitou a determinação da ação sequestrante uma vez que tal método não afeta o equilíbrio do sistema (sequestrante / produto de sequestro). O espectro apresentado abaixo, figura 60, foi obtido quando se solubilizou a triazinana **3** em água com o pH ajustado para 7, e devido a reação reversível da triazinana que é dependente do pH tanto o produto da reação (triazinana **3**) quanto seus reagentes (etanolamina e formol) estão presentes. O formol está na forma de hidrato e tem seu sinal encoberto pelo da água.

Na análise do espectro da figura 60 foi possível observar com clareza os sinais relativos aos diversos hidrogênios que constituem especificamente a molécula da triazinana **3**, a etanolamina e atribuir os respectivos deslocamentos químicos.

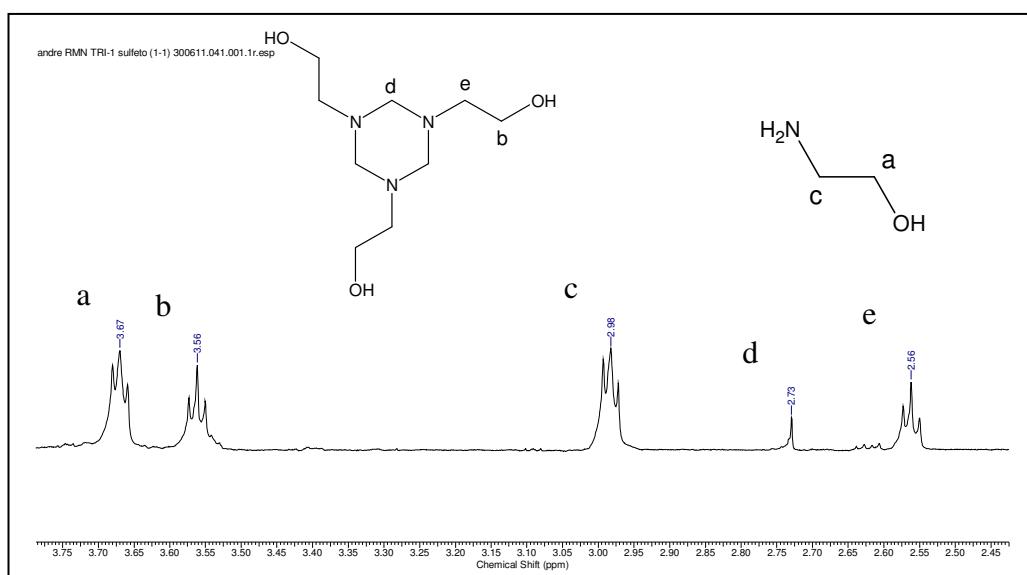


Figura 60. Espectro de RMN¹H de uma solução do composto **3** em água e pH 7.

Os espectros obtidos durante a reação, após a adição do íon sulfeto, se apresentaram bem resolvidos na temperatura de 20 °C para os compostos **3** e **5**, permitindo assim, que os diversos hidrogênios dos produtos formados tivessem seus deslocamentos químicos atribuídos, uma vez que possuem características próprias como é demonstrado na Figura 61, onde se observa a presença dos diversos hidrogênios referentes aos produtos do sequestro na mistura reacional.

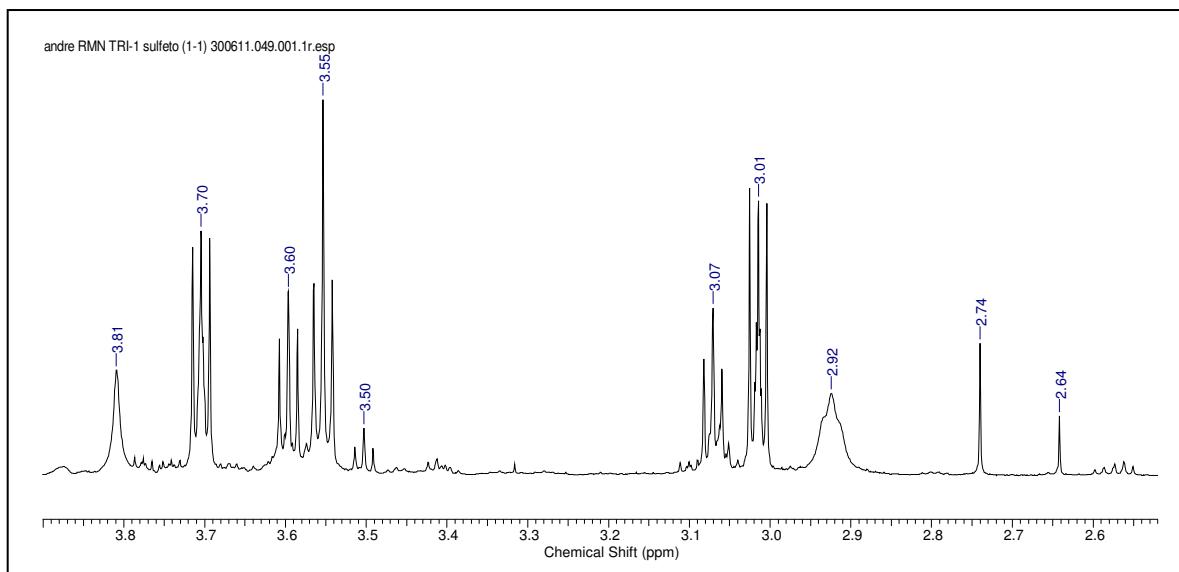


Figura 61. Espectro de RMN¹H de uma alíquota da mistura reacional entre o composto **3** e o sulfeto de sódio (2:1) em água em pH 7.

A quantificação foi realizada através da integração dos sinais, pois conhecendo a concentração do padrão adicionado, neste caso o benzoato de sódio, e tendo em vista que a área de integração é proporcional à concentração e ao número de hidrogênios relativos daquele sinal, pode-se calcular a concentração tanto do sequestrante como dos produtos de sequestro.

A figura 62 mostra as regiões do espectro onde os sinais do padrão utilizado e dos produtos de sequestro tem seus deslocamentos químicos estabelecidos. O círculo em azul mostra a região do espectro relativa aos sinais do padrão e, a área circulada em vermelho mostra a região do espectro relativa aos sinais tanto do sequestrante de H₂S como dos produtos de sequestro. Já a figura 63 mostra as duas regiões em um mesmo espectro onde os sinais integrados estão associados aos respectivos hidrogênios.

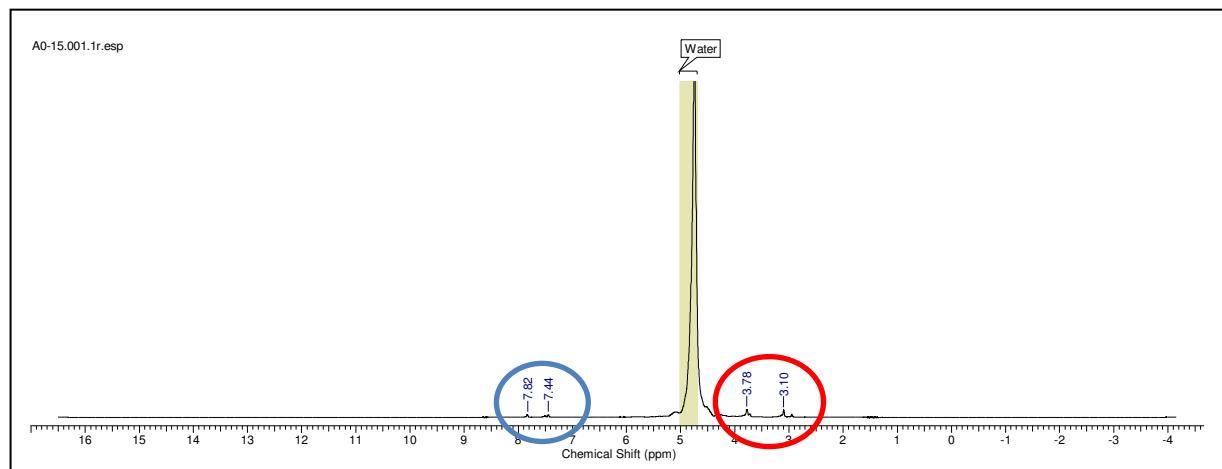


Figura 62. Regiões do espectro relativas aos sinais do padrão (círculo azul) utilizado e dos produtos de sequestro (círculo vermelho).

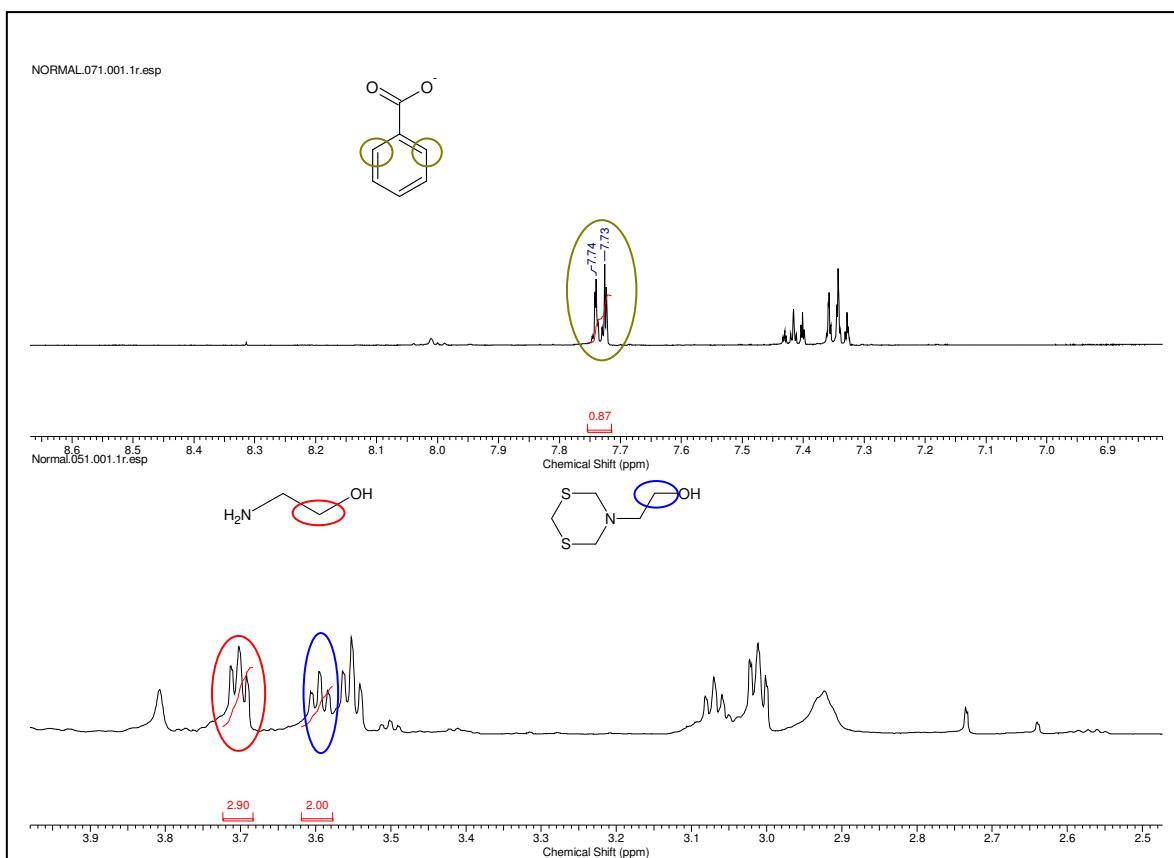


Figura 63. Espectros de RMN ^1H para a triazinana **3** na presença do íon sulfeto e na presença do padrão benzoato de sódio. Sinais integrados associados aos respectivos hidrogênios sendo circulados em verde para o padrão, vermelho para a amina liberada após o sequestro e azul para o produto do sequestro.

De acordo com os resultados obtidos e apresentados pelas tabelas 23-27, na parte experimental deste trabalho, a reação de sequestro é bastante rápida a temperatura de 20 °C, pois logo após a adição do sulfeto de sódio toda triazinana reage imediatamente, mesmo em pH 10 onde apenas são encontradas as espécies HS^- e S^{2-} sem que haja efetivamente a espécie H_2S para ser sequestrada. Isso indica que as triazinana **3** e **5** como sequestrantes de H_2S são muito eficientes, não somente reagindo com o próprio H_2S como também com suas espécies produzidas por hidrólise.

Outro fato observado foi que conforme a reação entre o sequestrante e o sulfeto se prolonga ocorre a diminuição do primeiro produto de sequestro e o aumento do segundo, indicando que o segundo produto de sequestro é termodinamicamente mais estável que o primeiro sendo formado mais rapidamente se houver maior concentração de sulfeto, sugerindo, assim, que a cinética da reação é bimolecular, onde a velocidade da reação depende tanto da concentração do sequestrante como a de sulfeto.

Pode-se observar, também, que a reação mostrou-se dependente do pH uma vez que em pH 7 a medida que se aumenta a proporção molar entre triazinana e o sulfeto somente o segundo produto de sequestro foi observado o que não ocorre em pH 10, indicando, que a reação tem sua eficiência aumentada com a diminuição do pH do meio.

Ainda foi possível verificar que o composto **5** (derivado da 1-hidroxipropil-3-amina) reage mais lentamente com o sulfeto quando comparamos com o composto **3**, isso

provavelmente se deve ao maior impedimento estérico no composto **5** e a maior estabilidade estrutural desta triazinana diminuindo assim sua reatividade. Outra característica observada do composto **5** foi que seus produtos de sequestro em pHs elevados estão mais suscetíveis a reação reversa como mostra a tabela 27, pois inicialmente há a formação dos produtos de sequestro que vão diminuindo em quantidade conforme a reação se prolonga, o que indica que em pHs elevados este composto tem sua eficiência bastante prejudicada.

Muito embora esse método tenha se mostrado adequado para a avaliação da atividade sequestrante, não foi possível a realização de testes para os compostos **7** e **9** (triazinanas derivadas da benzil e fenetilamina, respectivamente), pois esses se apresentaram insolúveis em água impossibilitando, assim, a realização do experimento. Os experimentos em pH 5 não foram apresentados, pois ocorreu a coalescência dos sinais, como já apresentado na tabela 25 da parte experimental.

Os compostos **14**, **15**, **18** e **19**, sais sulfatos e fosfatos de sódio, dos compostos **3** e **5** não puderam ter suas atividades quantificadas por este método, pois seus sinais não mostraram multiplicidade a temperatura em que os experimentos foram realizados (coalesceram a 20 °C) impedindo, assim, que eles fossem atribuídos aos respectivos hidrogênios corretamente, embora haja uma mudança de perfil dos sinais quando era adicionado o íon sulfeto quando comparado ao espectro da triazinana correspondente pura, indicando uma possível atividade sequestrante. A figura 64 mostra os espectros sobrepostos do composto **15** em pH 7 exemplificando o problema descrito.

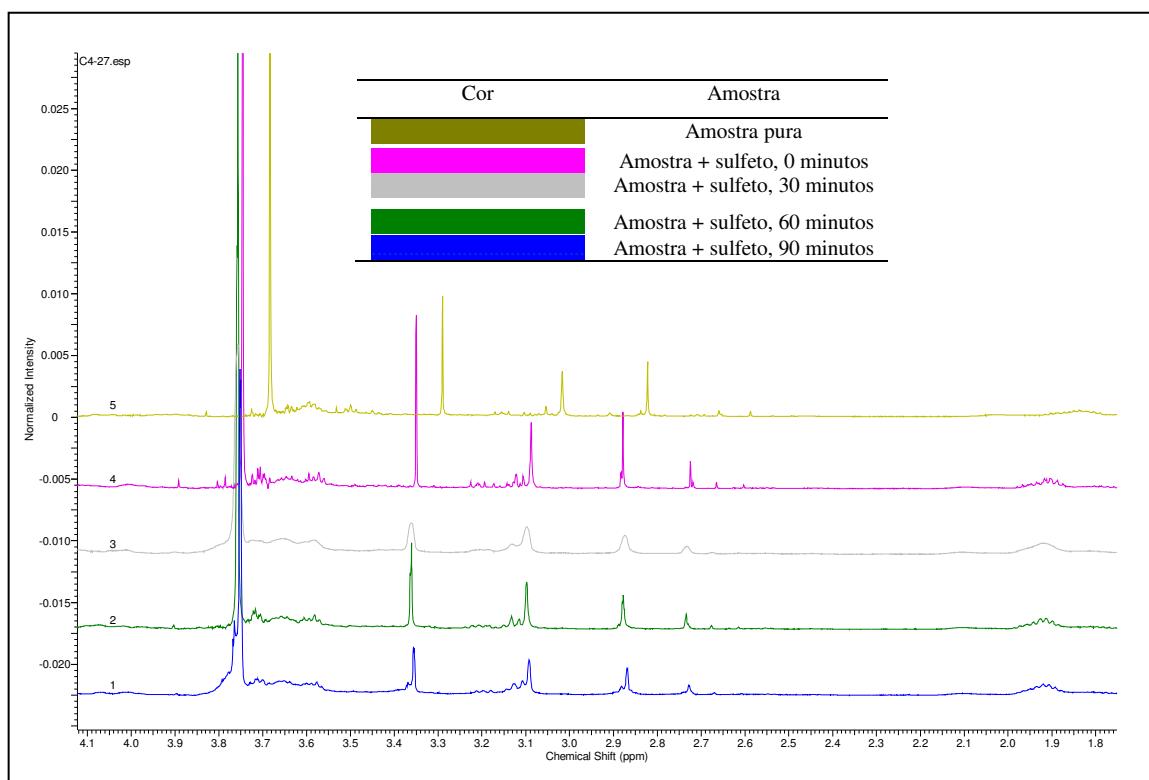


Figura 64. Espectros de RMN de ^1H sobrepostos do composto **15** na presença do íon sulfeto em pH 7.

Uma particularidade observada durante os testes de sequestro através da espectroscopia de RMN foi o aparecimento de um precipitado branco, insolúvel em água, obtido após a reação de qualquer uma das triazinanas e o sulfeto, quando a relação molar entre eles era maior para o sulfeto, principalmente na relação de 3:1, e quando o pH do meio era 7.

As figuras 65 e 66 mostram fotos da reação do composto **5** em pH 7 antes e depois da adição de sulfeto mostrando o precipitado obtido.



Figura 65. Foto da reação do composto **5** com sulfeto (1:3) em pH 7 antes da adição de sulfeto.

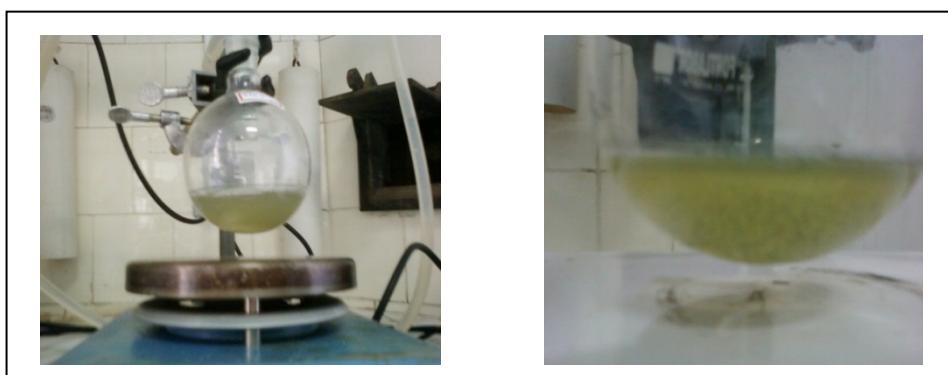


Figura 66. Fotos da reação do composto **5** com sulfeto (1:3) em pH 7 depois da adição de sulfeto.

O precipitado obtido foi filtrado, lavado com água e seco em estufa. Após a obtenção dos espectros em clorofórmio deuterado, a atribuição do deslocamento químico no espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C para o produto obtido indicou que se tratava do 3º produto de sequestro como mostram os espectros na figura 67.

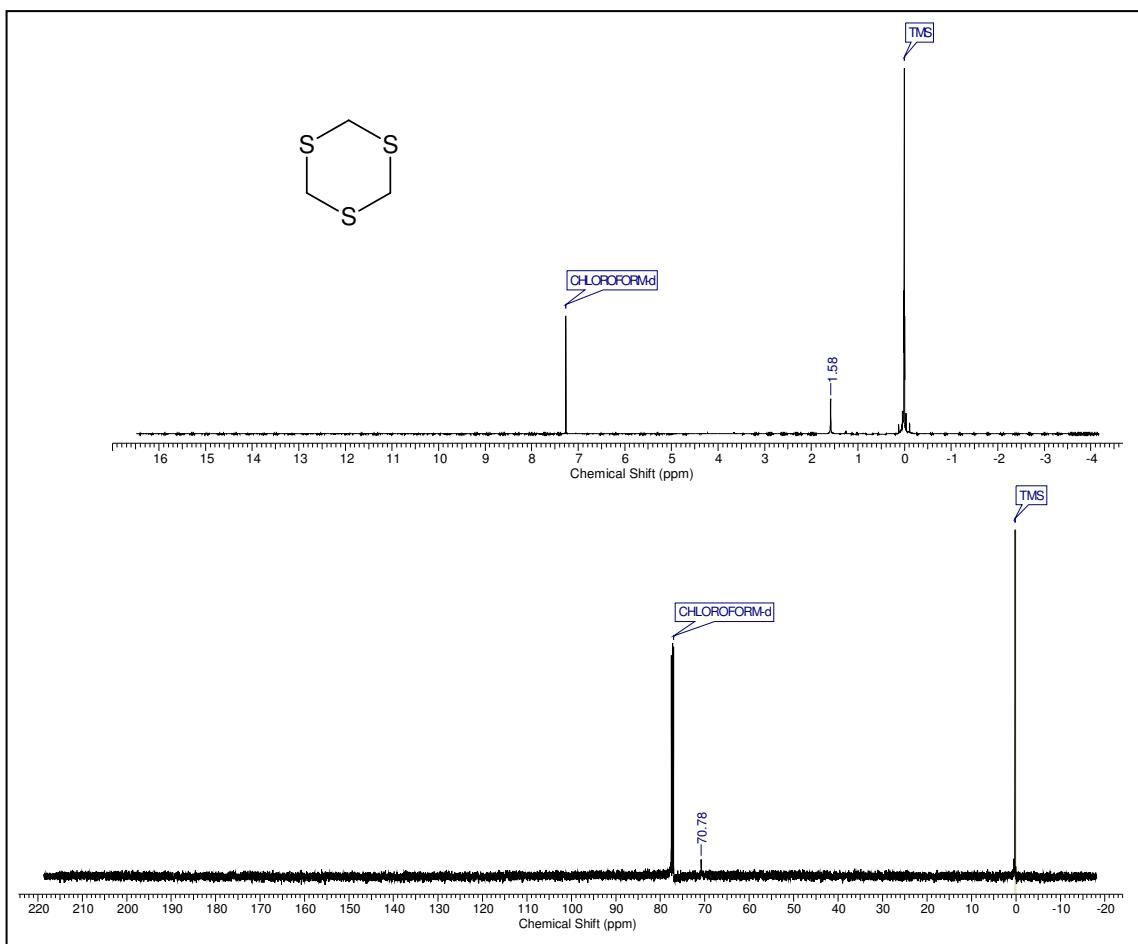


Figura 67. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do sólido obtido após a reação entre a triazinana **5** e o íon sulfeto em CDCl_3 .

4.8.4 Determinação qualitativa do sequestro de H_2S com papel indicador de acetato de chumbo

Com o intuito de avaliar qualitativamente as triazinanas sintetizadas, bem como seus sais, quanto ao sequestro de H_2S , foi utilizado papel indicador contendo acetato de chumbo impregnado como método de monitoramento da reação de sequestro entre o sulfeto de sódio e as triazinanas em valores de pH iguais a 9, 7 e 5 e em concentrações distintas de sequestrante na proporção de 1:1, 1:2 e 1:3 (sulfeto: sequestrante). A variação de pH foi realizada devido ao fato da reação de sequestro ser condicionada ao mesmo como já foi verificado e explicitado anteriormente. Já a variação da concentração de sequestrante, mantendo-se a concentração de sulfeto fixa, foi para se avaliar melhor o desempenho de cada triazinana uma vez que esse método é puramente qualitativo.

A figura 68 mostra a comparação da ação sequestrante do composto **3**, em três valores de pH e com relações estequiométricas entre o sulfeto e o sequestrante variando de 1:1 a 1:3, sendo a reação acompanhada a cada 30 minutos, começando, respectivamente, da esquerda para a direita em cada foto, o papel indicador da solução de sulfeto puro, logo após adição do sequestrante (tempo 0) e após 30, 60 e 90 minutos.

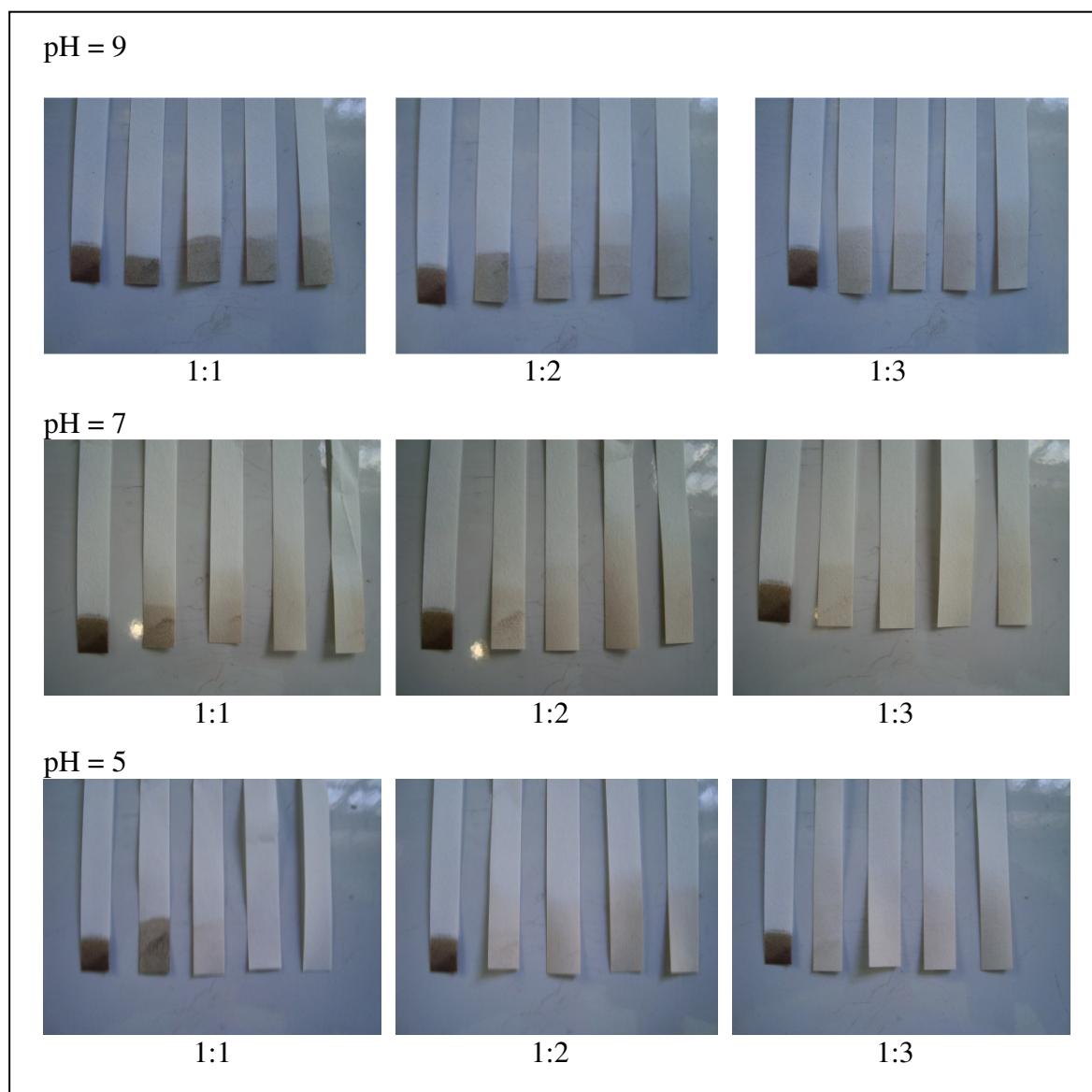


Figura 68. Fotos dos papeis indicadores de sulfeto após terem sido embebidos com a mistura reacional resultante entre as reações do composto **3** e o sulfeto de sódio nas proporções 1:1, 2:1 e 3:1, em pH 9, 7 e 5.

A figura 69 mostra a comparação da ação sequestrante do composto **14** (sal sulfato de sódio da triazinana **3**), em três valores de pH e com relações estequiométrica entre o sulfeto e o sequestrante variando de 1:1 a 1:3, sendo acompanhada a cada 30 minutos, começando, respectivamente, da esquerda para a direita em cada foto, o papel indicador da solução de sulfeto puro, logo após adição do sequestrante (tempo 0) e após 30, 60 e 90 minutos.

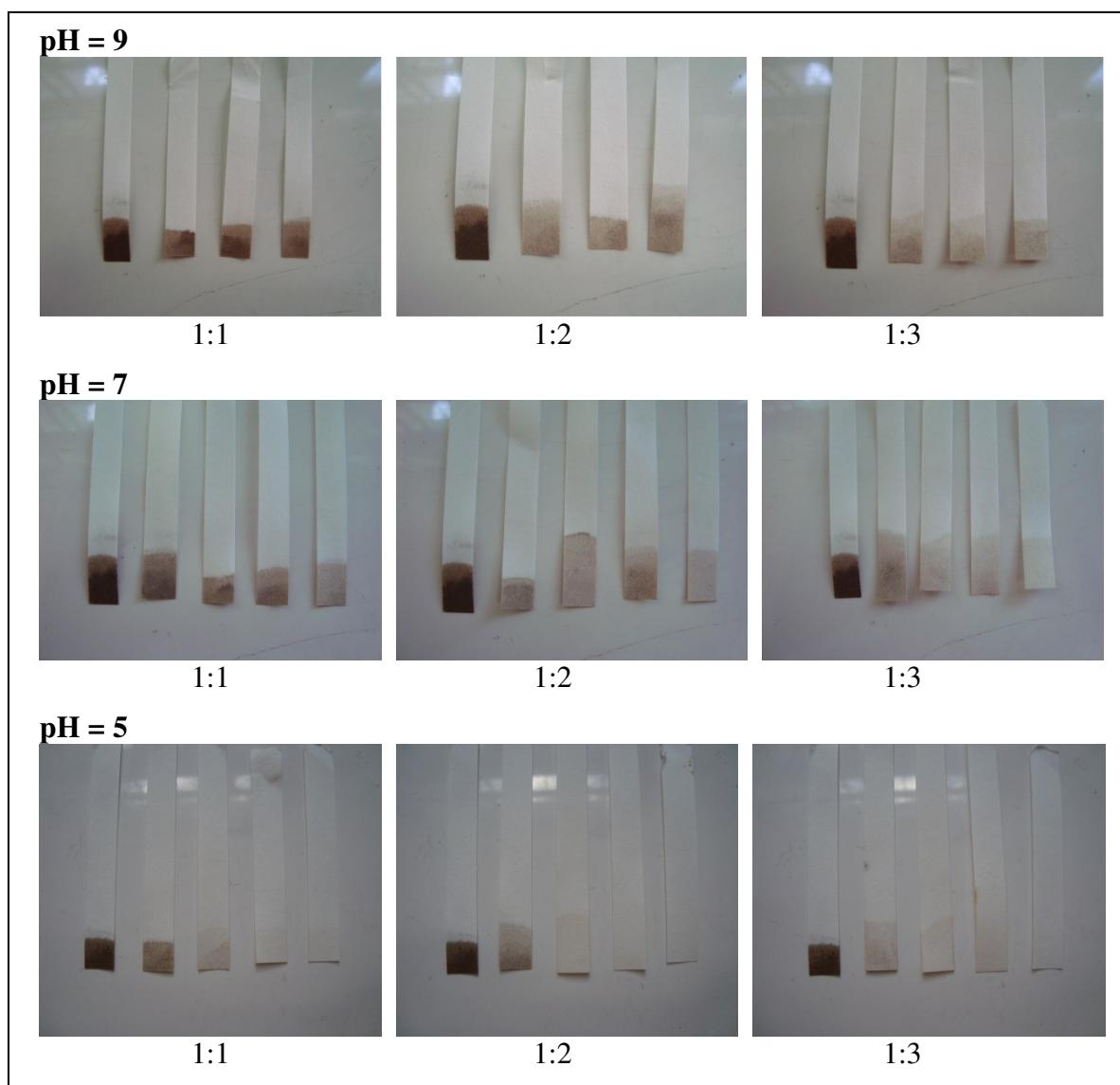


Figura 69. Fotos dos papeis indicadores de sulfeto após terem sido embebidos com a mistura reacional resultante entre as reações do composto **14** e o sulfeto de sódio nas proporções 1:1, 2:1 e 3:1, em pH 9, 7 e 5.

A figura 70 mostra a comparação da ação sequestrante do composto **5**, em três valores de pH e com relações estequiométrica entre o sulfeto e o sequestrante variando de 1:1 a 1:3, sendo acompanhada a cada 30 minutos, começando, respectivamente, da esquerda para a direita em cada foto, o papel indicador da solução de sulfeto puro, logo após adição do sequestrante (tempo 0) e após 30, 60 e 90 minutos.

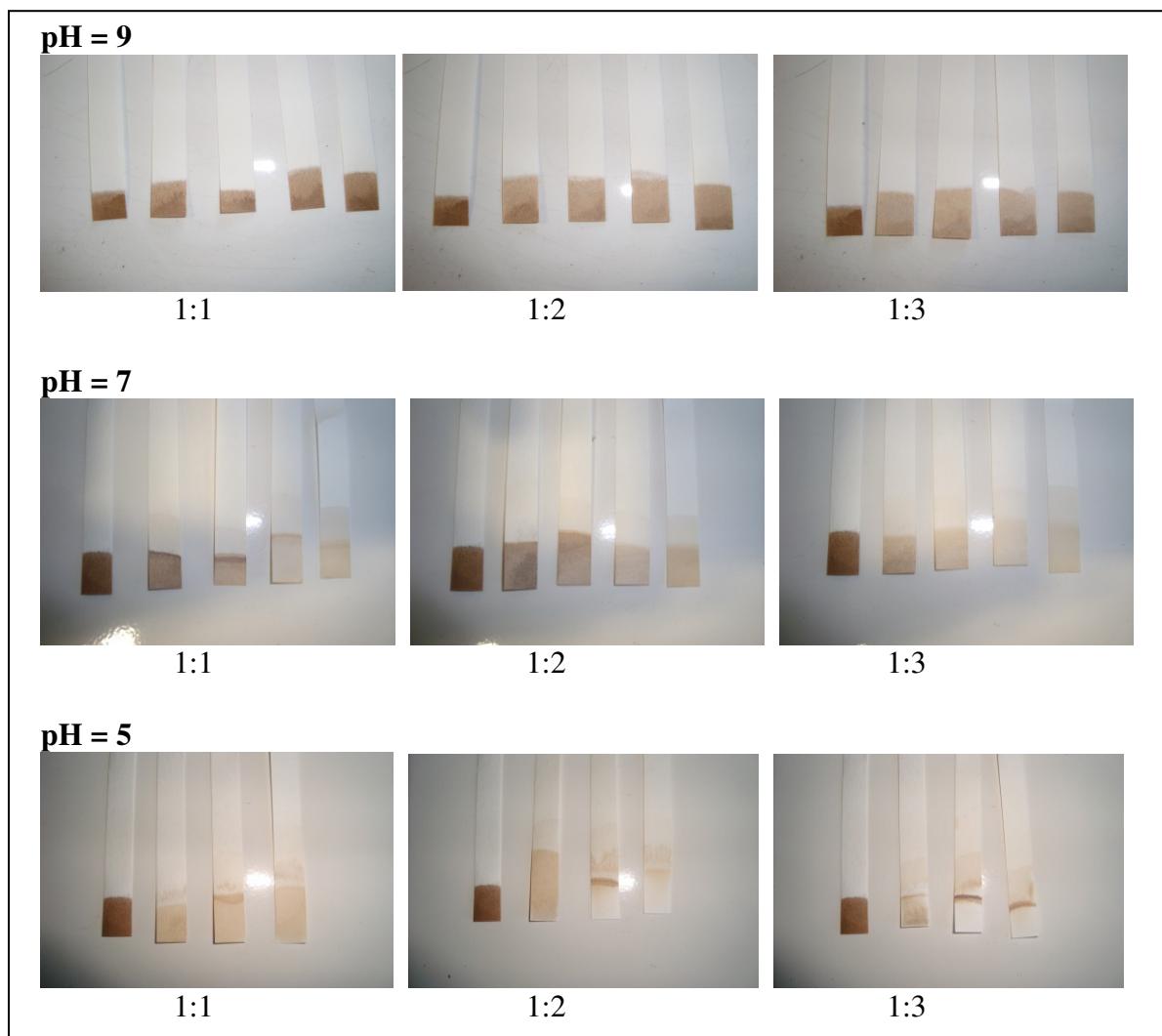


Figura 70. Fotos dos papeis indicadores de sulfeto após terem sido embebidos com a mistura reacional resultante entre as reações do composto **5** e o sulfeto de sódio nas proporções 1:1, 2:1 e 3:1, em pH 9, 7 e 5.

A figura 71 mostra a comparação da ação sequestrante do composto **15** (sal sulfato de sódio da triazinana **5**), em três valores de pH e com relações estequiométrica entre o sulfeto e o sequestrante variando de 1:1 a 1:3, sendo acompanhada a cada 30 minutos, começando, respectivamente, da esquerda para a direita em cada foto, o papel indicador da solução de sulfeto puro, logo após adição do sequestrante (tempo 0) e após 30, 60 e 90 minutos.

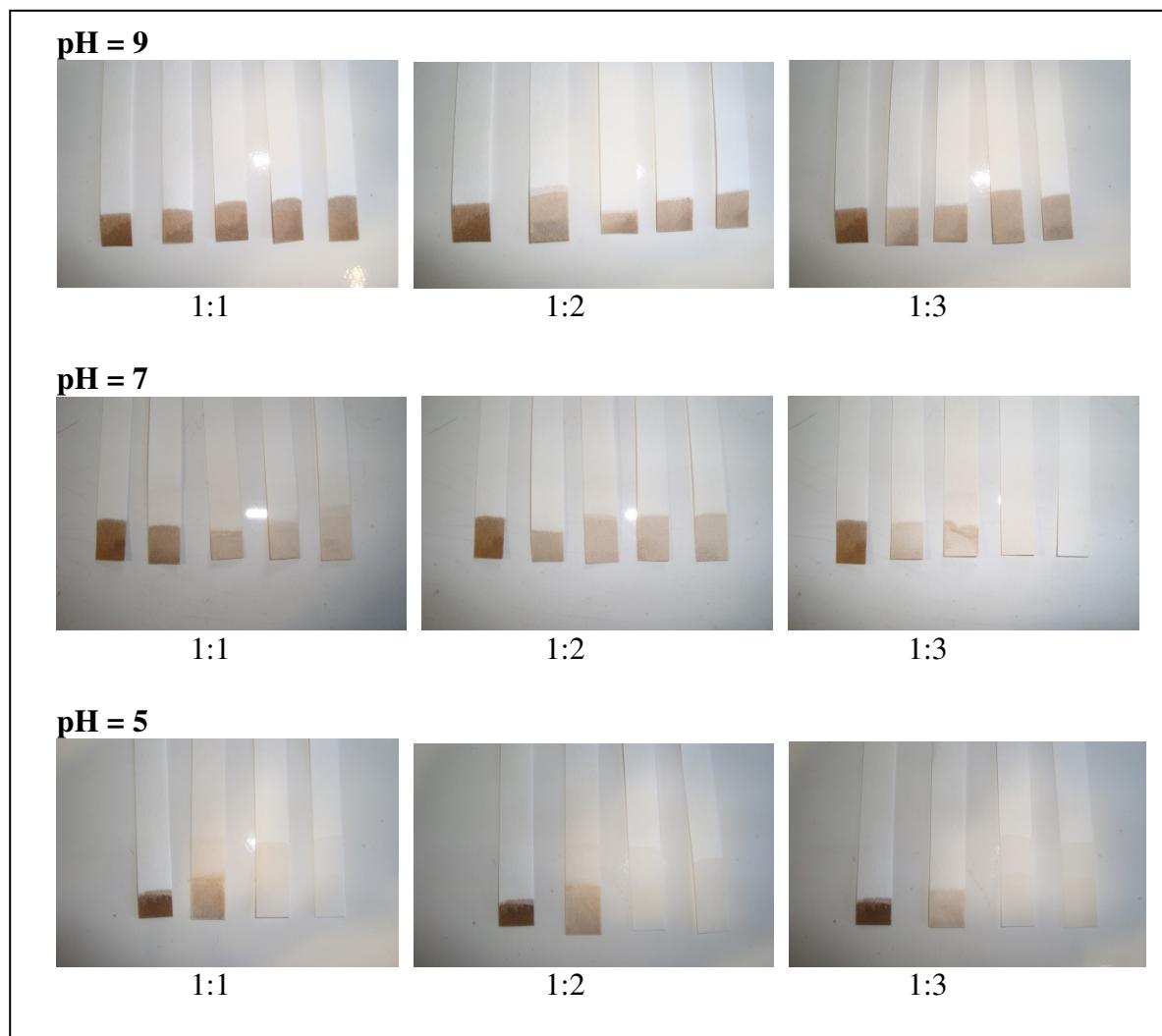


Figura 71. Fotos dos papeis indicadores de sulfeto após terem sido embebidos com a mistura reacional resultante entre as reações do composto **15** e o sulfeto de sódio nas proporções 1:1, 2:1 e 3:1, em pH 9, 7 e 5.

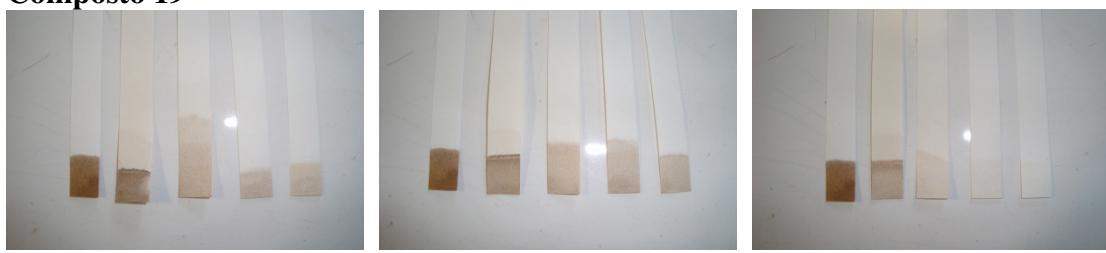
Os compostos **18** e **19** (sais fosfatos de sódio das triazinanas **3** e **5**) apresentaram uma atividade frente ao papel impregnado com acetato de chumbo muito semelhante aos seus correspondentes sais sulfonados (compostos **14** e **15**, respectivamente), como mostra a figura 72, e portanto, optou-se pela apresentação de apenas fotos comparativas entre o composto **15** e **19** resultantes dos experimentos nas mesmas condições que anteriormente detalhadas.

Composto 15

1:1

1:2

1:3

Composto 19

1:1

1:2

1:3

Figura 72. Fotos dos papeis indicadores de sulfeto após terem sido embebidos com a mistura reacional resultante entre as reações do composto **15** e **19** e o sulfeto de sódio, respectivamente, nas proporções 1:1, 2:1 e 3:1, em pH 7.

De acordo com os resultados obtidos nos experimento para a avaliação da atividade sequestrante a correlação entre o pKa e a atividade sequestrante parece não ser de grande relevância, pois a atividade sequestrante não se mostrou muito diferente para as triazinanas testadas, embora as mesmas tenham um valor de pKa bastante distinto umas das outras.

As triazinas hidroxiladas (compostos **21** e **22**) também foram testadas pelo método de monitoramento com as fitas indicadoras de sulfeto nas mesmas condições das triazinanas, para avaliação da atividade sequestrante devido a sua similaridade com as triazinanas. Os resultados obtidos estão mostrados a seguir.

A figura 73 mostra a comparação da ação sequestrante da triazina **21**, em três valores de pH e com relações estequiométrica entre o sulfeto e o sequestrante variando de 1:1 a 1:3, sendo acompanhada a cada 30 minutos, começando, respectivamente, da esquerda para a direita em cada foto, o papel indicador da solução de sulfeto puro, logo após adição do sequestrante (tempo 0) e após 30, 60 e 90 minutos.

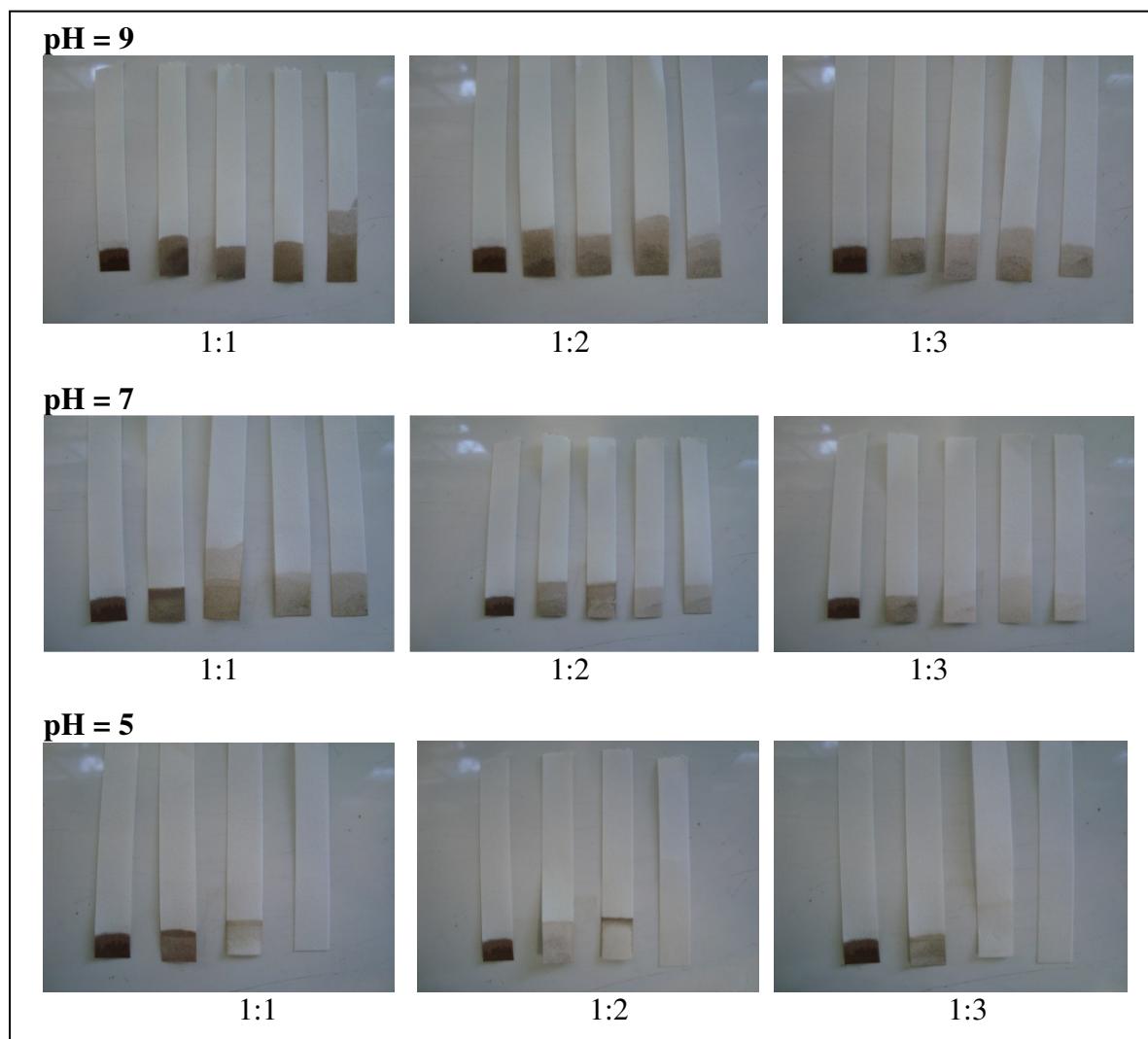


Figura 73. Fotos dos papeis indicadores de sulfeto após terem sido embebidos com a mistura reacional resultante entre as reações do composto **21** e o sulfeto de sódio nas proporções 1:1, 2:1 e 3:1, em pH 9, 7 e 5.

A figura 74 mostra a comparação da ação sequestrante da triazina **22**, em três valores de pH e com relações estequiométrica entre o sulfeto e o sequestrante variando de 1:1 a 1:3, sendo acompanhada a cada 30 minutos, começando, respectivamente, da esquerda para a direita em cada foto, o papel indicador da solução de sulfeto puro, logo após adição do sequestrante (tempo 0) e após 30, 60 e 90 minutos.

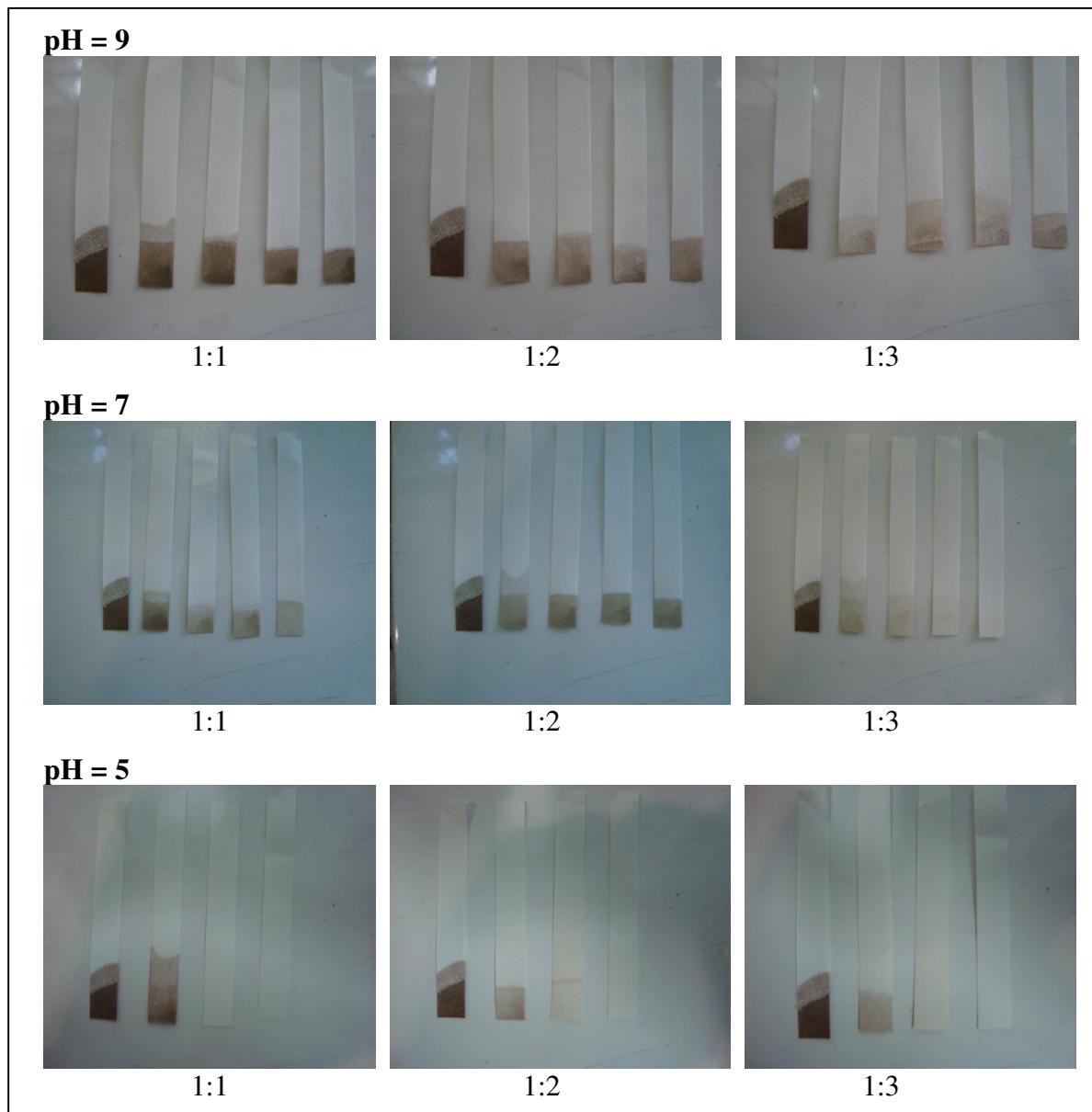


Figura 74. Fotos dos papeis indicadores impregnados com acetato de chumbo após terem sido embebidos com a mistura reacional resultante entre as reações do composto **22** e o sulfeto de sódio nas proporções 1:1, 2:1 e 3:1, em pH 9, 7 e 5.

Como pode ser observado nas figuras 73 e 74 os compostos triazínicos (**21** e **22**) também apresentaram atividade sequestrante de H_2S comparável as triazinanas, embora o mecanismo de sequestro com certeza não ocorra pela abertura do anel, uma vez que as triazinas são compostos com anéis aromáticos heterocíclicos. Para tentar elucidar este fato foram realizados experimentos de monitoramento por RMN, nas mesmas condições que para as triazinanas, para as duas triazinas hidroxiladas (compostos **21** e **22**). Embora tenha sido notado uma mudança visual na reação durante o tempo de experimento, não foi evidenciada qualquer mudança nos espectros das alíquotas retiradas do meio reacional, o que tornou inviável, até o momento, a elucidação do mecanismo de sequestro.

5. CONCLUSÃO

A rota de síntese para a obtenção das 1,3,5-triazinanas e das 1,3,5-triazinas, bem como para seus derivados mostrou-se adequada levando aos compostos previstos e em bons rendimentos.

De acordo com os resultados obtidos e apresentados para a reação de sequestro de H₂S pelas triazinanas, a mesma foi bastante rápida e eficiente, não somente reagindo com o próprio H₂S como também com suas espécies produzidas por hidrólise, embora o processo seja dependente do pH do meio e das concentrações dos seus reagentes, sendo favorecidas as reações que acontecem em pHs mais baixos.

As triazinanas derivadas da 1-hidroxipropil-3-amina demonstraram serem menos reativas quando comparados com as derivadas da 1-hidroxietil-3-amina, isso provavelmente se deve ao maior impedimento estérico nos compostos derivados da 1-hidroxipropil-3-amina diminuindo assim sua reatividade.

As triazinanas na forma de sal não demonstraram ação tóxica frente à *Artemia salina* diferentemente dos seus precursores hidroxilados. Além disso, todos os compostos sintetizados e solúveis em água não demonstraram precipitação ou degradação em altas e baixas temperaturas, com exceção do composto **3** que, com o aumento da temperatura apresentou escurecimento quando em solução aquosa.

Os métodos para quantificação da atividade sequestrante que se baseiam de alguma forma perturbando o equilíbrio da reação de sequestro, tais como a potenciometria e a iodimetria, mostraram-se ineficientes para este fim, uma vez que os produtos de sequestro podem voltar a liberar o sulfeto para a solução caso o equilíbrio seja deslocado.

O método de monitoramento por RMN da reação de sequestro de H₂S pelas triazinanas mostrou-se adequado para a avaliação quantitativa da atividade sequestrante, embora tenha apresentado limitações devido a incompatibilidade do solvente utilizado com a temperatura de trabalho, nos casos em que as estruturas apresentam um tempo de relaxação muito curto (compostos **14**, **15**, **18**, **19**) fazendo com que os sinais coalescessem, impedindo, assim, a quantificação.

O acompanhamento da reação através de papel indicador embebido em acetato de chumbo, embora qualitativo, possibilitou a verificação da atividade sequestrante dos compostos triazinianicos na forma de sal (compostos **14**, **15**, **18**, **19**), e estes apresentaram uma atividade comparável as respectivas triazinanas precursoras. Além disso, os compostos triazínicos (**21** e **22**) também apresentaram atividade sequestrante de H₂S comparável as triazinanas como observado por esse método, embora o mecanismo de sequestro ainda seja desconhecido.

Finalmente, o composto mesoiônico da classe 1,2,3-oxadiazólio-2-olato foi obtido em bom rendimento e apresentou resultado muito interessante quanto a atividade anti-inflamatória e imunossupressora despertando o interesse para a continuidade e aprofundamento dos estudos biológicos, bem como para a realização de ensaios com novas substâncias dessa classe.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bakke J. M.; Buhaug J.; Riha J., Hydrolysis of 1,3,5-Tris(2-hydroxyethyl)hexahydro-*s*-triazine and Its Reaction with H₂S. *Ind. Eng. Chem. Res*, 40, 6051-6054, **2001**.
- Bizetto, E. L.; Noleto, G. R.; Echevarria, A.; Canuto, A. V.; Cadena, A. M. S. C., Effect of sydnone SYD-1 on certain functions of LPS-stimulated macrophages, *Mol Cell Biochem*, 360:15-21, **2012**.
- Braz, V. R., Síntese, estrutura e cinética das reações de SnAr de aril sidnonas, dissertação de mestrado, PPGQO, UFRRJ, **1992**.
- Brzozowski, Z.; Saczewski, F.; *Eur. J. Med. Chem.*, 37, 709, **2002**.
- Esteves, F. M.; Noronha, C. A.; Marinho, M. R., *World Textile Conference – 4th AUTEX Conference*, Portugal, **2004**.
- Deshpande S. R.; Pai, K.V., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 27(2), 241–248, **2012**.
- Dunkley, C. S.; Thoman, C. J., *Bioor. Med. Chem. Lett.*, 13, 2899-2901, **2003**.
- Gentil V., Corrosão, editora S.A. Rio de janeiro. – RJ. 3^a Ed., **1996**.
- Greco, C.V.; Neberg, W.H.; Cheng, C.C., *J. Med. Pharm. Chem.*, 5, 861–865, **1962**.
- Grundmann, C.; Kreutzberger, A.; *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 5646, **1954**.
- Grynpberg N.; Gomes, R.; Shinzato, T.; Echevarria, A; Miller, J., Some new aryl-sydnones: effects on murine tumours, *Anticancer*, 12, 1025-1028, **1992**.
- Guillemin J. C.; Denis J. M., Flash Vacuum Thermolysis of α-Aminonitriles and Subsequent HCN Removal on Solid Base, a 'One Line' Multistep Sequence to Reactive N-Methyleneamines, *J. CHEM. SOC., CHEM. COMMUN.*, **1985**.
- Halila, G. C. Efeitos dos compostos mesoionicos, representadis pela sidnona syd-1, sobre o metabolismo energético mitocondrial, Dissertação de mestrado, Curitiba, **2005**.
- Halila, G. C.; Oliveira, M. B.; Echevarria, A.; Belém, A. C.; Rocha, M. E.; Carnieri, E. G.; Martinez, G. R.; Noleto, G. R., Cadena, S. M., Effect of sydnone SDY -1, a mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria, *Chem. Biol. Interact.*, 169(3), 160-170, **2007**.
- Kamble, R.R.; Belgur, S.S.; Aladkatti, R.; Khazi, I.A., *Chem. Pharm. Bull.*, 57(1), 16–21, **2009**.
- Machado, V. G.; Nome, F., *Química Nova*, 22(3), 351-357, **1999**.

Mainier, F. B. ; Rocha, A. A., H₂S: Novas rotas de remoção química e recuperação de enxofre. Anais: 2º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás. Rio de Janeiro, **2003**.

Mainier, F. B. ; Sandres, G. C. ; Tavares, S. S. M. Corrosão por sulfeto de hidrogênio (H₂S) e suas implicações no meio ambiente e na segurança industrial, 8º congresso iberoamericano de engenharia mecânica. Rio de Janeiro, **2007**.

Meyer, B. N. ; Ferrigni, N. R.; Putnan, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; Aughlin, J., *Journal of Medical Plant Research*, 45 (1), 31-34, **1982**.

Nagl, G. J., *Hydrocarbon Engineering* **2001**, 6, 35-38.

Ogata, Y.; Kawasaki, A.; Kojoh, H., *J. Org. Chem.*, 39 (25), 3676-3679, **1974**.

Osugi, M. E.; Guaratini, C. C. I.; Stradiotto, N. R.; Zanoni, M. V. B., *Quim. Nova*, 27 (3), 417-420, **2004**.

Oliveira, R. C. G. *Novo Conceito de Dessaletação de Petróleo*. Boletim Técnico da Petrobrás, 43 (2), 111-119, **2000**.

Oudir, S.; Rigo, B.; Hénichart, J. P. ; Gautret, P., *Synthesis*, 2845-2848, **2006**.

Pastorin, G. ; Federico, S. ; Paoletta, S. ; Corradino, M. ; Cateni, F. ; Cacciari, B. ; Klotz, K. N. ; Gao, Z. G. ; Jacobson, K. A. ; Spalluto, G. ; Moro, S., *Bioorg. Med. Chem.*, 18(7), 2524-36, **2010**.

Patel, A.A.; Mehta, A.G., *J. Saudi Chem. Soc.*, 14, 203–208, **2010**.

Patente CA 2 491 973 A1. Sulfur scavengers and methods for making and using same. *Canadian intellectual property office*. **2005**

Patente US005554349A. Process for scavenging H₂S by mixtures of hexahydrotriazines. *United States Patent*. **1996**

Patente US20010046994A1. hexahydrotriazine compounds and insecticides. *United States Patent Application publication*. **2001**.

Patente US20100107476 A1. Compositions and Methods Including Hexahydrotriazines Useful as Direct Injection Fuel Additives. *United States Patent Application*. **2010**

Patente WO 2007/069685 A1. Method for selectively producing primary amine compound. *United States Patent*. **2007**.

Patente WO 2008/027721 A1. Fast, high capacity hydrogen sulfide scavengers. *World intellectual property organization*. **2008**.

Patente WO 2009/127604 A2. Methods of predicting/ optimizing hydrogen sulfide scavenging capacity and reduction of scale formation. *World intellectual property organization*. **2009**.

Patente WO2009/132342 A1. Nanoemulsions for treating fungal, yeast and mold infections. *World intellectual property organization*. **2009**.

Prade L.; Huber, R.; Bieseler, B.; *PubMed*, 6 (11) :1445-52, **1998**

Satyanarayana, K.; Rao, M. N. A., *J. Pharm. Sci.*, 84(2), 263-266, **1995**.

Shie, J. J.; Fang, J. M., *J. Org. Chem.*, 72, 3141-3144, **2007**.

Silva, R. A. S., Controle de H₂S na produção de petróleo, Monografia, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, **2007**.

Smolin, E. M.; Rapoport, L. *s-Triazines and Derivatives*, Interscience Publishers: New York, 477, **1959**.

Taylor G. N.; Matherly R., Gas Chromatography Mass Spectrometric Analysis of Chemically Derivatized Hexahydrotriazine-based Hydrogen Sulfide Scavengers, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 49, 5977–5980 and 6267–6269, **2010**.

Torres, F. ; Ferreira, P. A. ; Magalhães, A. A. O., Seqüestrantes de H₂S, Revisão bibliográfica , Centro de pesquisa e desenvolvimento Leopoldo A. Miguez de Mello, Rio de Janeiro, **2006**.

Yeh, M.Y.; Chan, F.F.; Tien, H.J.; Fuchigami, T.; Nonaka T., *J. Chin. Chem. Soc.*, 36(2),143–148, **1989**.

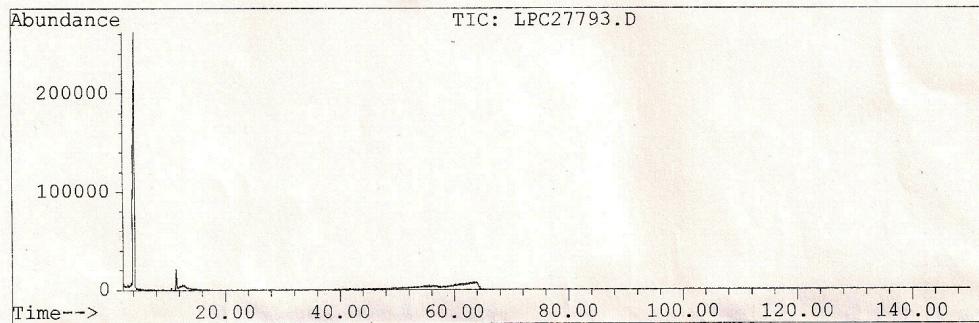
Vogel, A. I., Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry editado por Furniss, B.S; Hannaford, A. J.; Smith, .W.P.G. e Tatchell, A. R., **1989**.

7. ANEXOS

7.1 Cromatograma de CG da 1,3,5- tris(2-hidroxietil)- triazinana (3) incolor

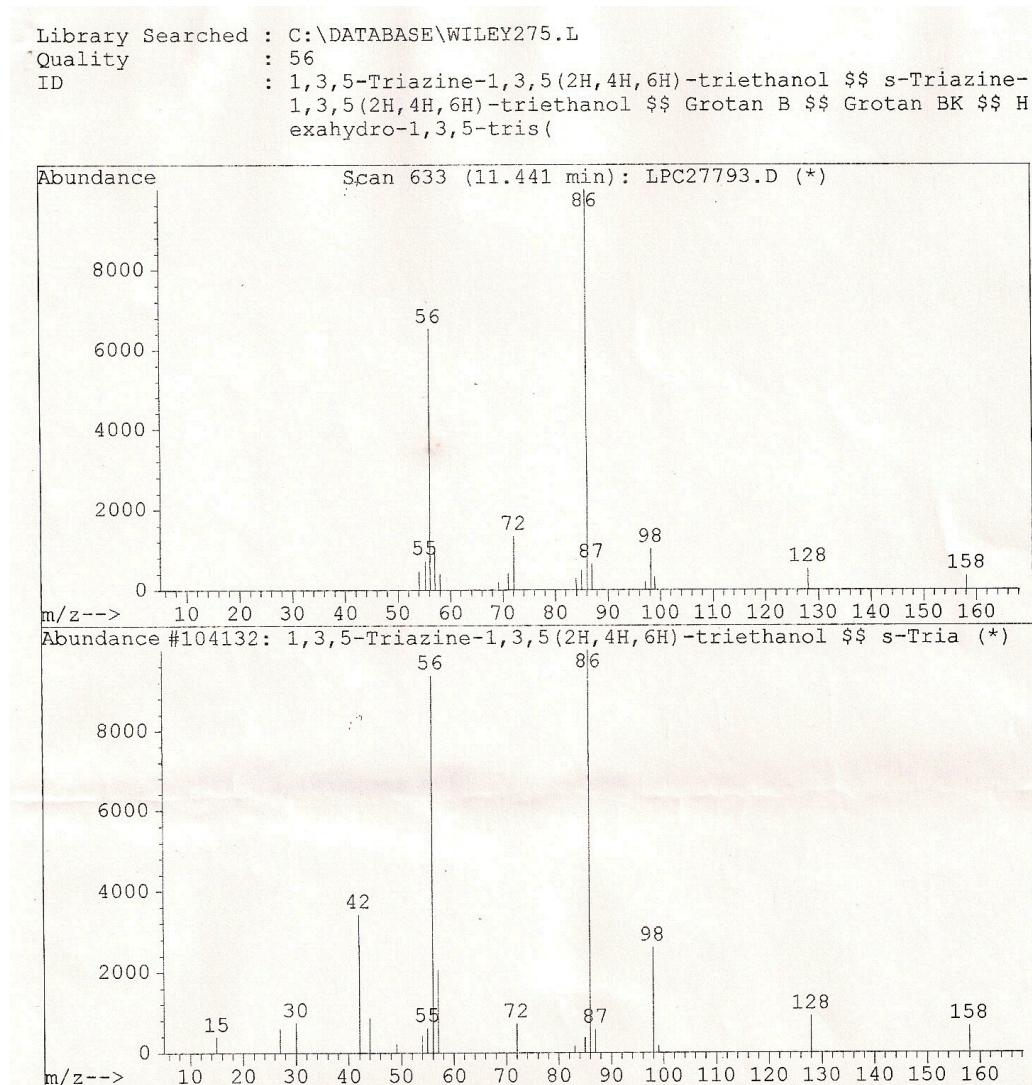
Area Percent Report -- Sorted by Signal

Information from Data File:
File : C:\HPCHEM\1\DATA\LPC27793.D
Operator : Ana Carolina
Acquired : 14 Dec 110 2:48 pm using AcqMethod FLAVANA2
Sample Name: Amostra III
Misc Info :
Vial Number: 3
CurrentMeth: C:\HPCHEM\1\METHODS\FLAVANA2.M

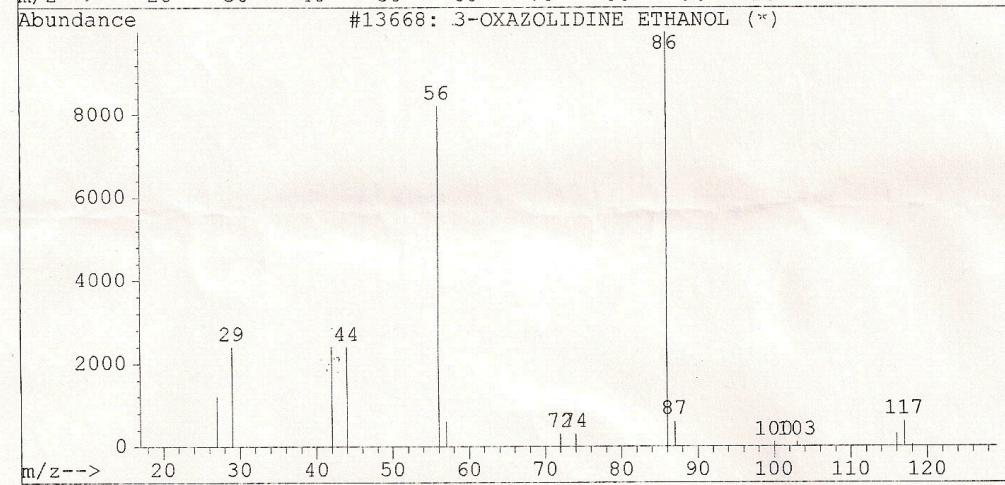
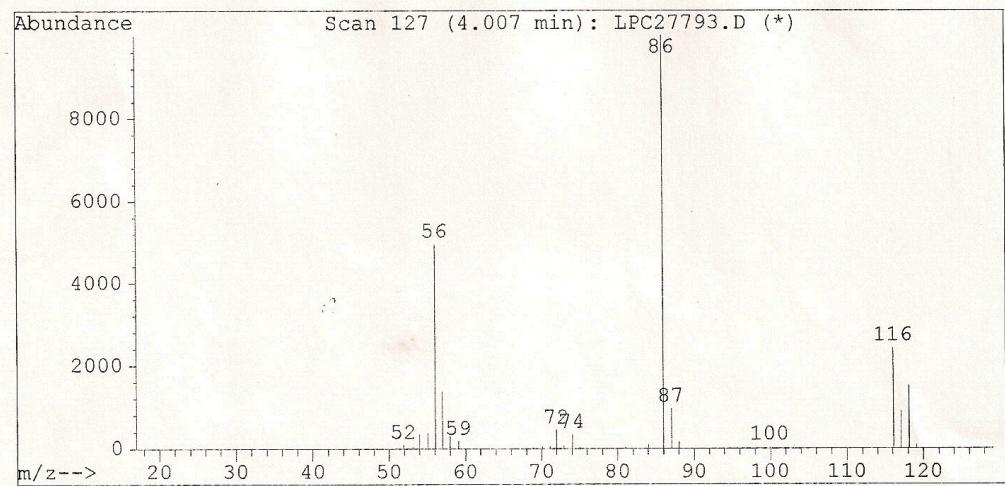


Retention Time	Area	Area %	Ratio %
<hr/>			
Total Ion Chromatogram			
4.226	39378625	95.978	100.000
11.442	1650363	4.022	4.191

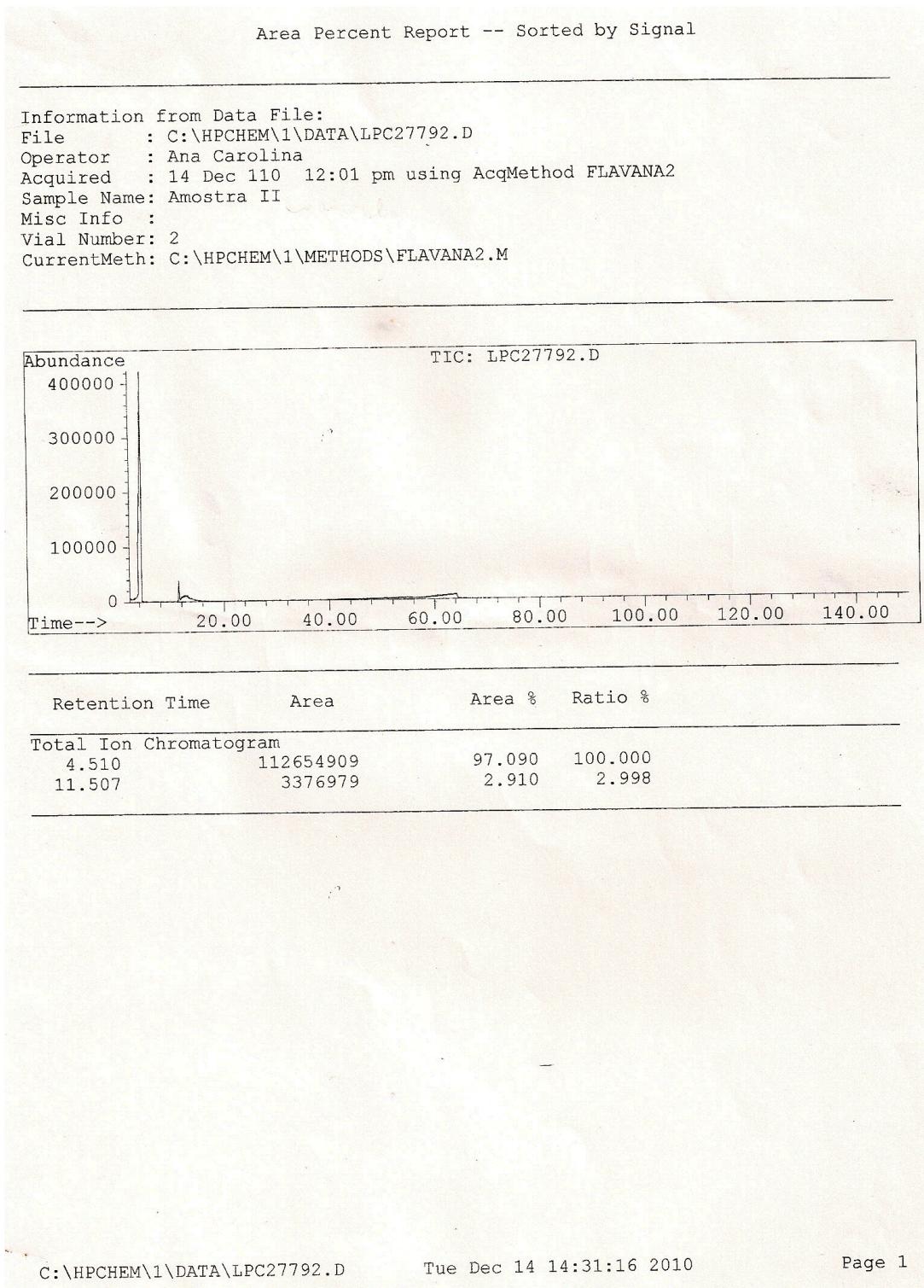
7.1.1 Espectro de massa da 1,3,5- tris(2-hidroxietil)- triazinana (3) incolor



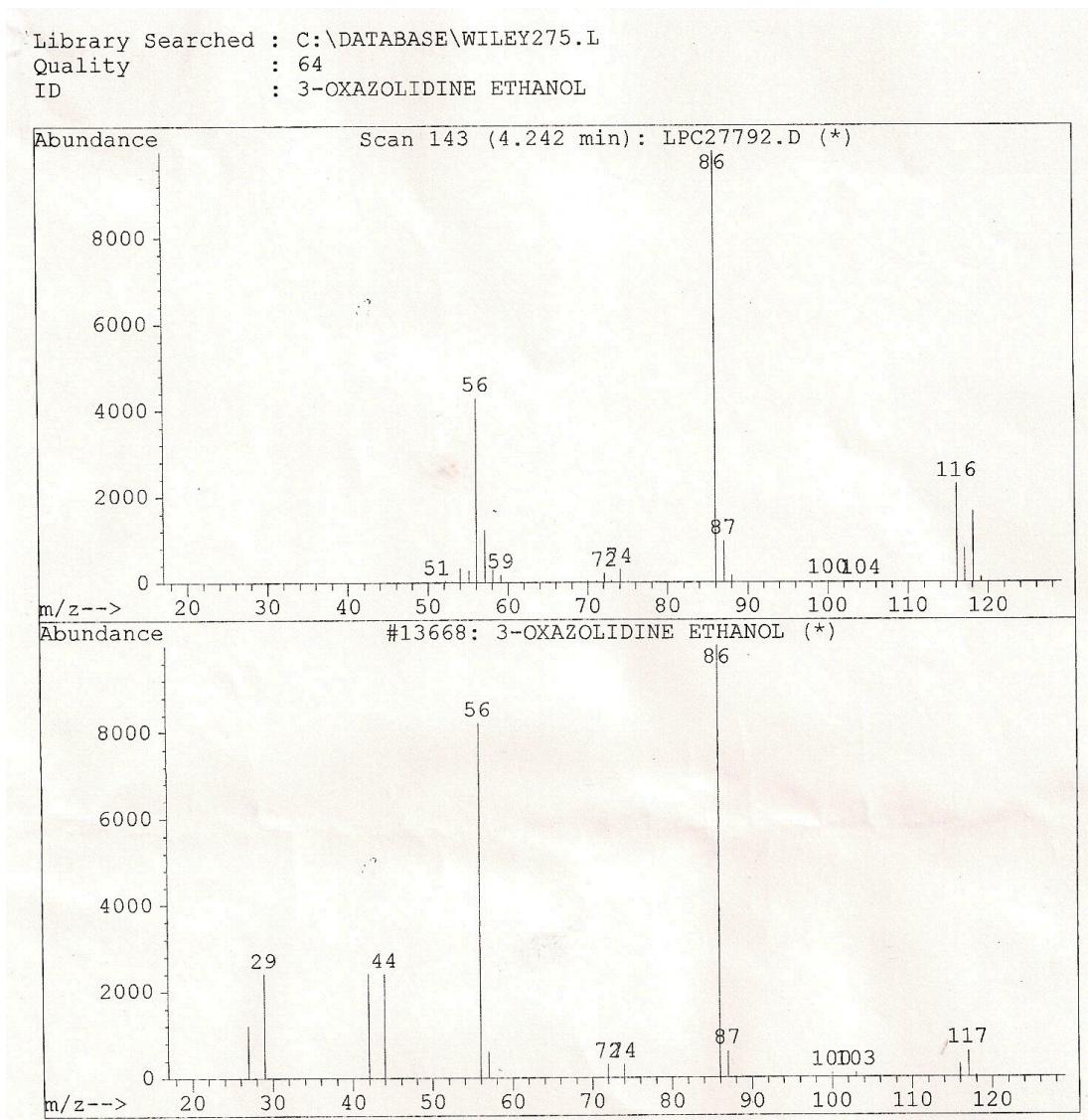
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 64
ID : 3-OXAZOLIDINE ETHANOL



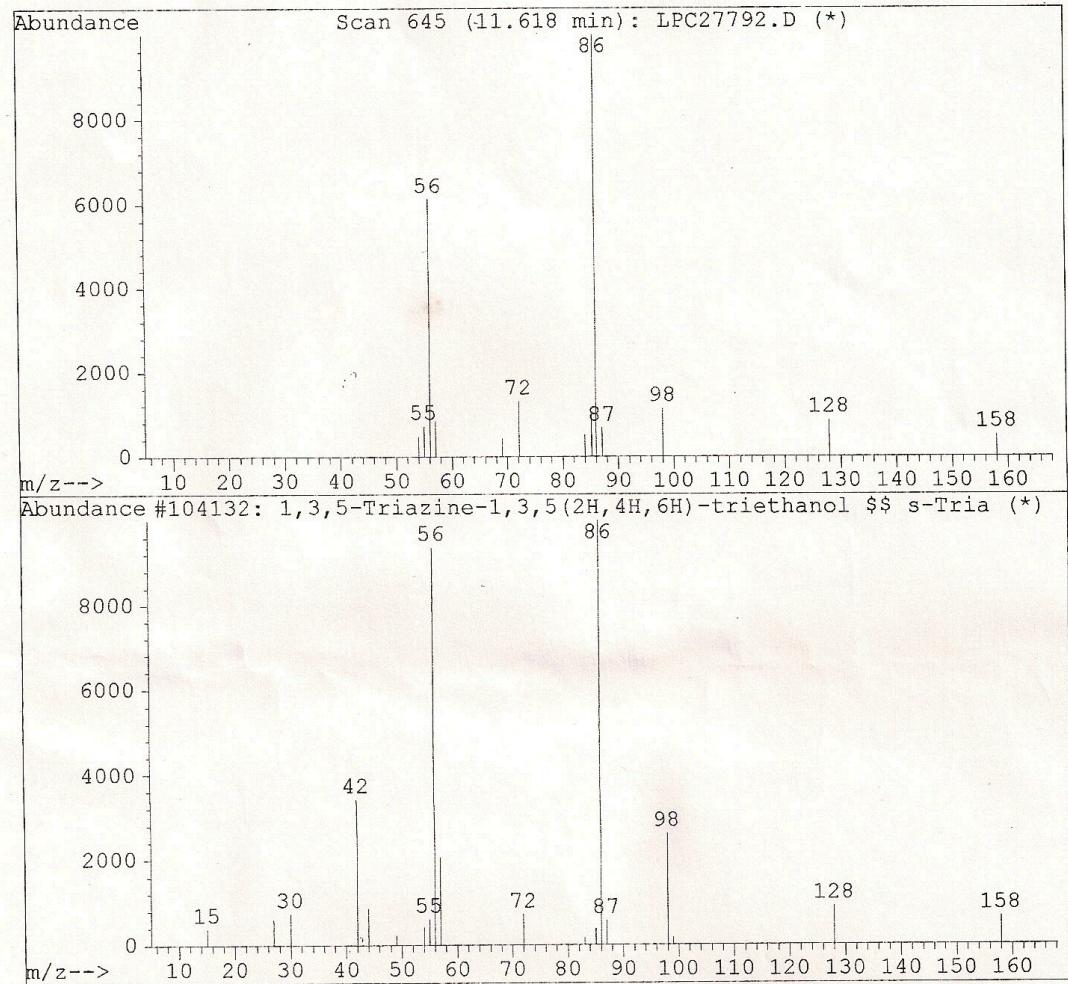
7.2 Cromatograma de CG da 1,3,5- tris(2-hidroxietil)- triazinana (3) amarela



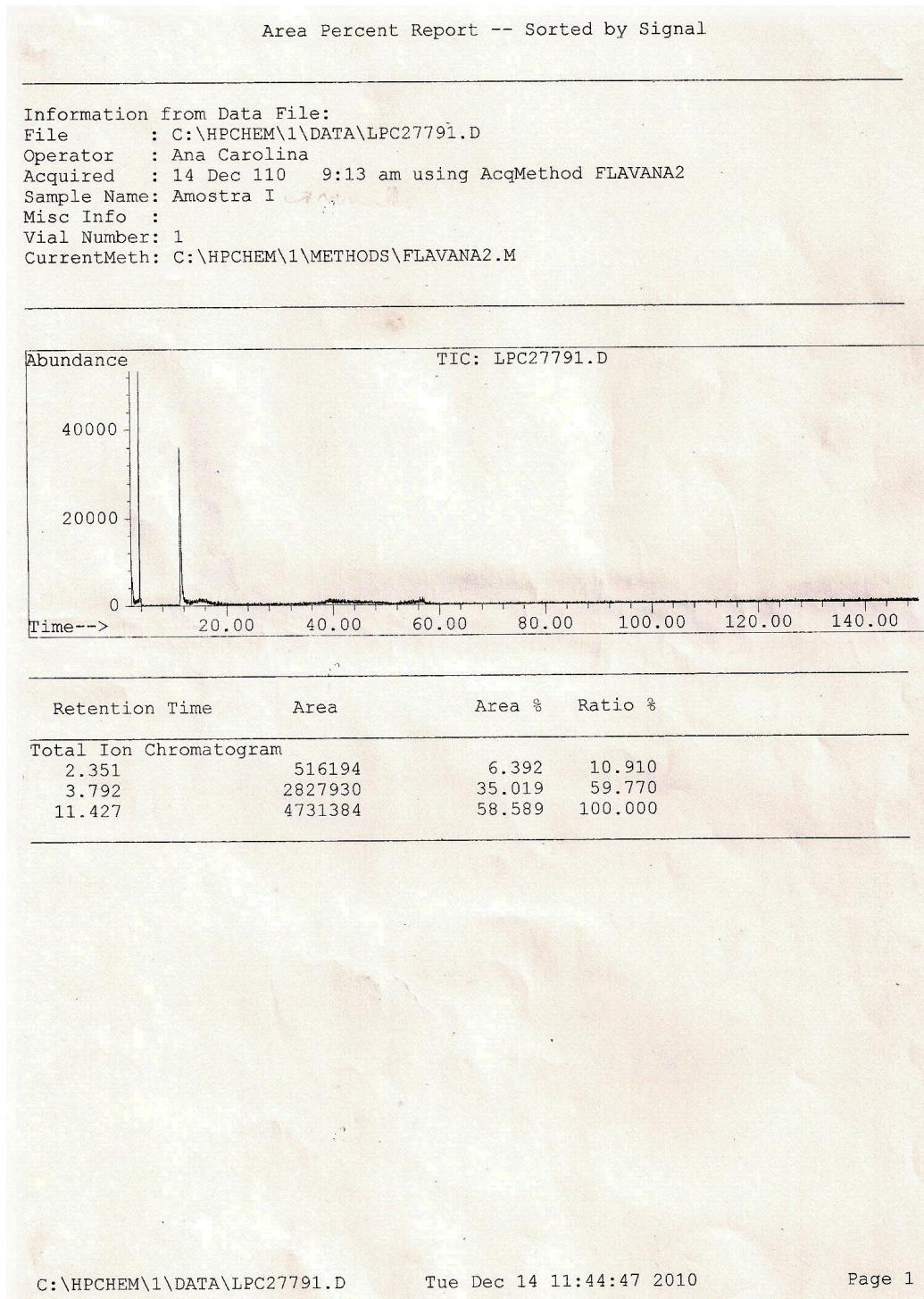
7.2.1 Espectro de massa da 1,3,5- tris(2-hidroxietil)- triazinana (3) amarela



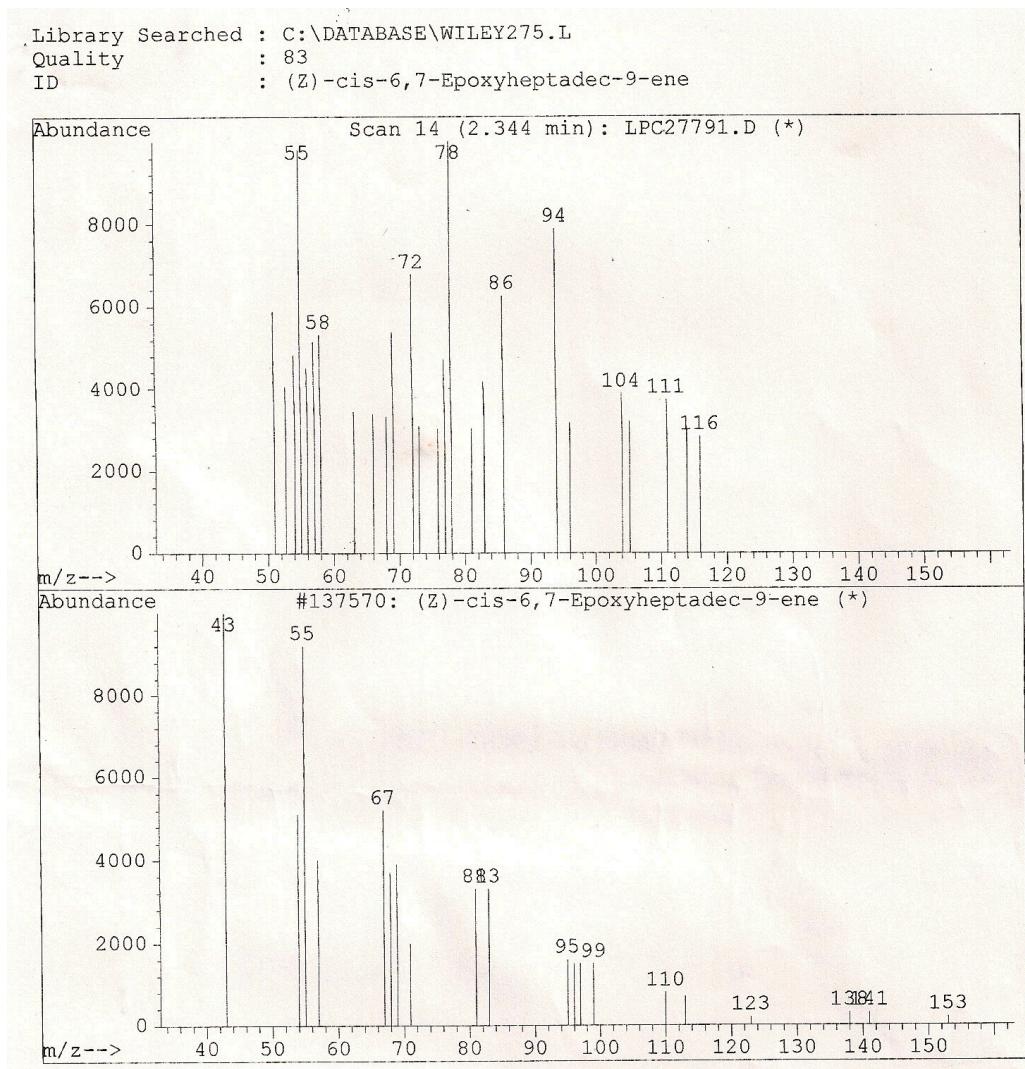
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 72
ID : 1,3,5-Triazine-1,3,5(2H,4H,6H)-triethanol \$\$ s-Triazine-
1,3,5(2H,4H,6H)-triethanol \$\$ Grotan B \$\$ Grotan BK \$\$ H
exahydro-1,3,5-tris(



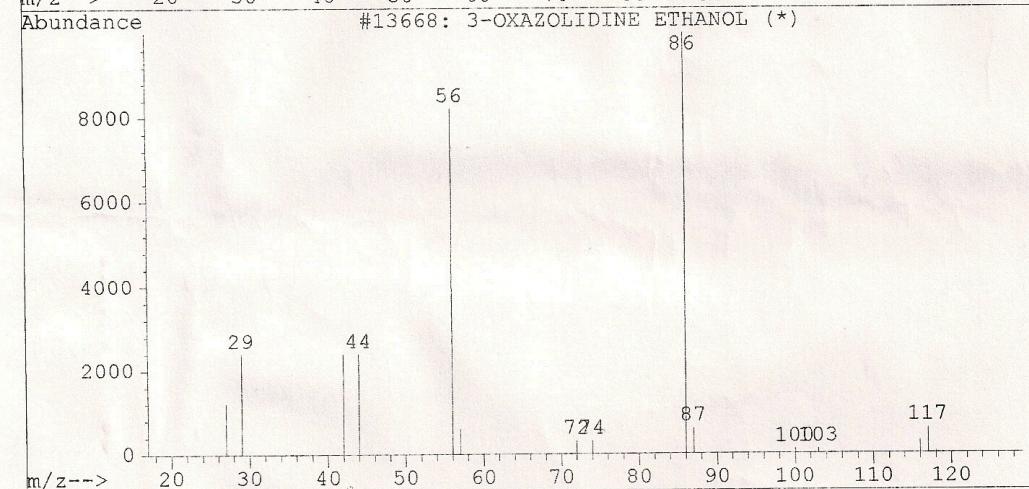
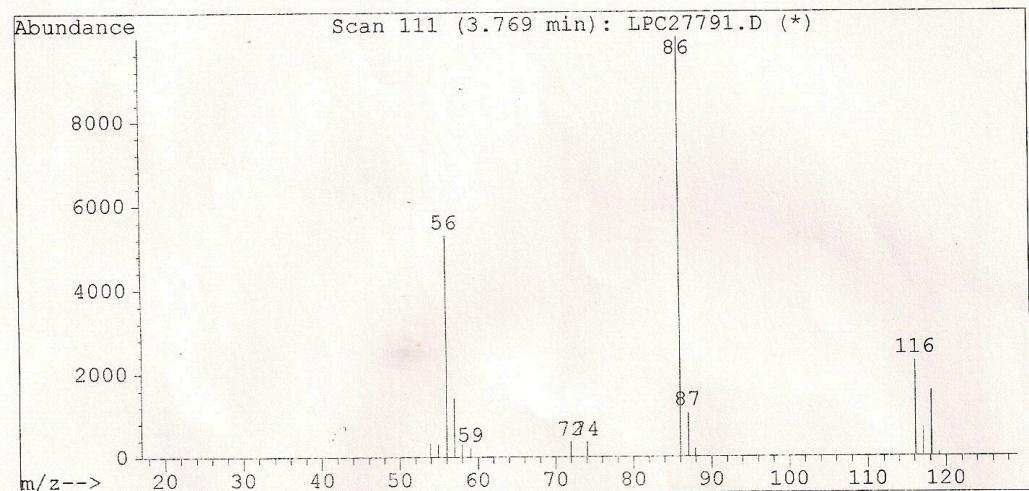
7.3 Cromatograma de CG da 1,3,5- tris(2-hidroxietil)- triazinana (3) vermelha



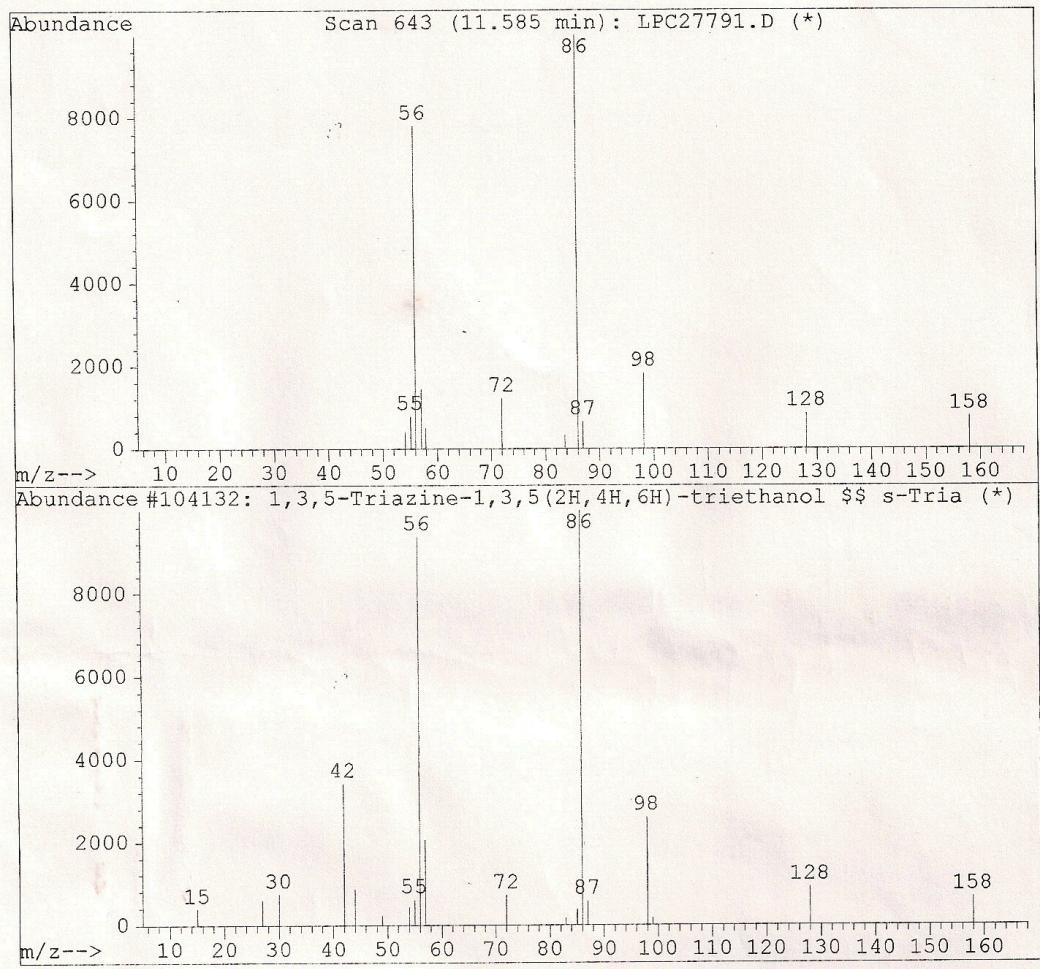
7.3.1 Espectro de massa da 1,3,5- tris(2-hidroxietil)- triazinana (3) vermelha



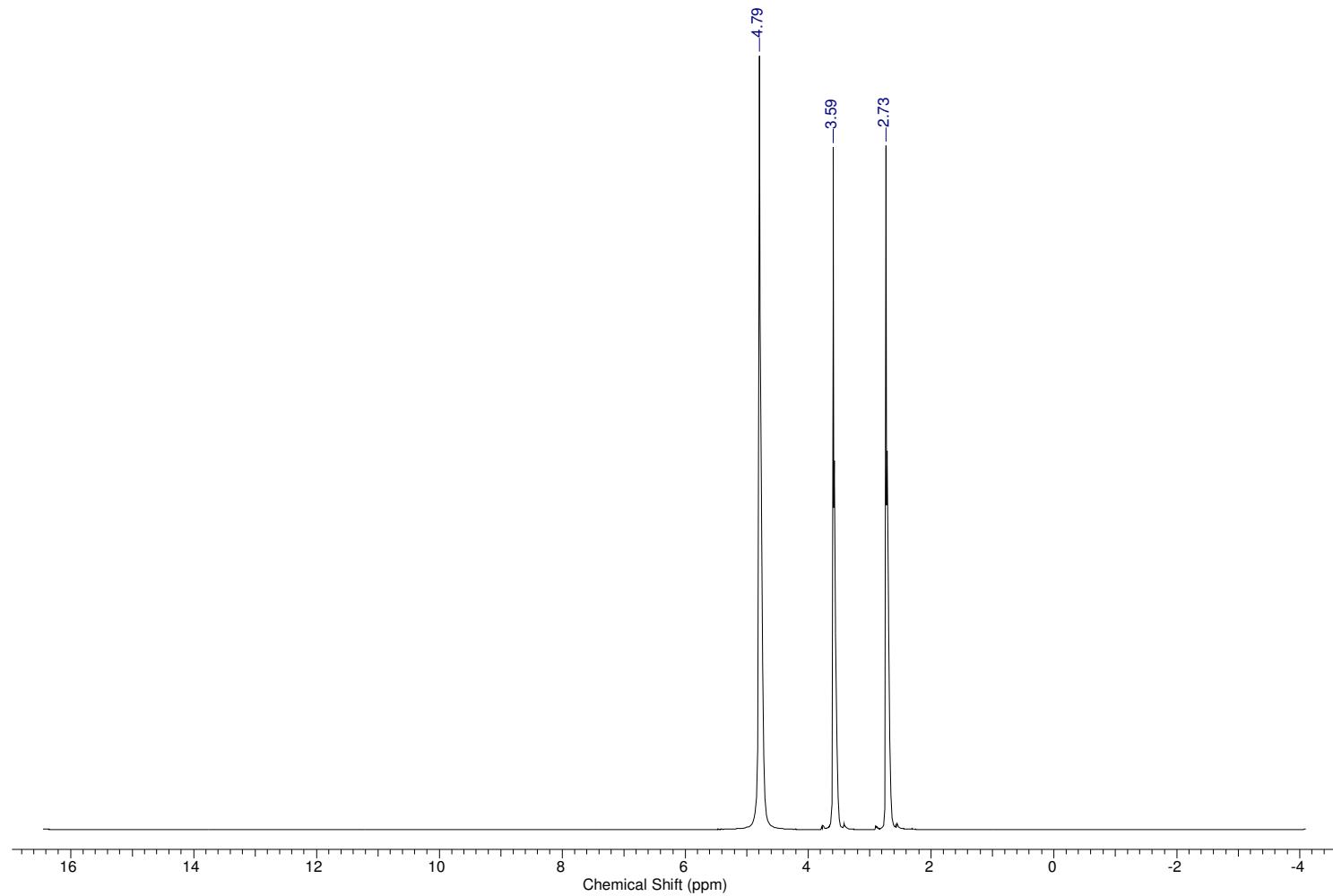
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 64
ID : 3-OXAZOLIDINE ETHANOL



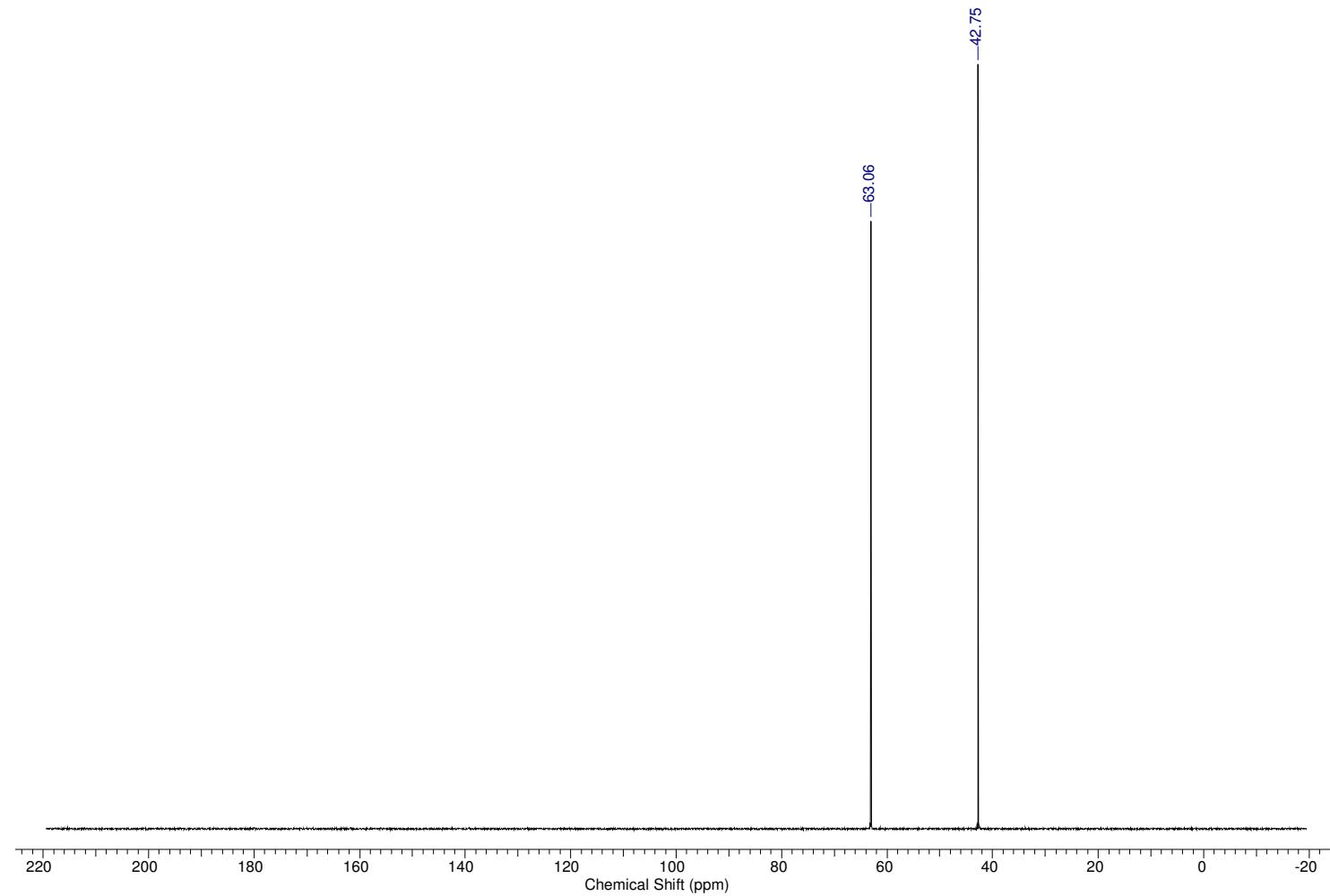
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
 Quality : 83
 ID : 1,3,5-Triazine-1,3,5(2H,4H,6H)-triethanol \$\$ s-Triazine-
 1,3,5(2H,4H,6H)-triethanol \$\$ Grotan B \$\$ Grotan BK \$\$ H
 exahydro-1,3,5-tris(



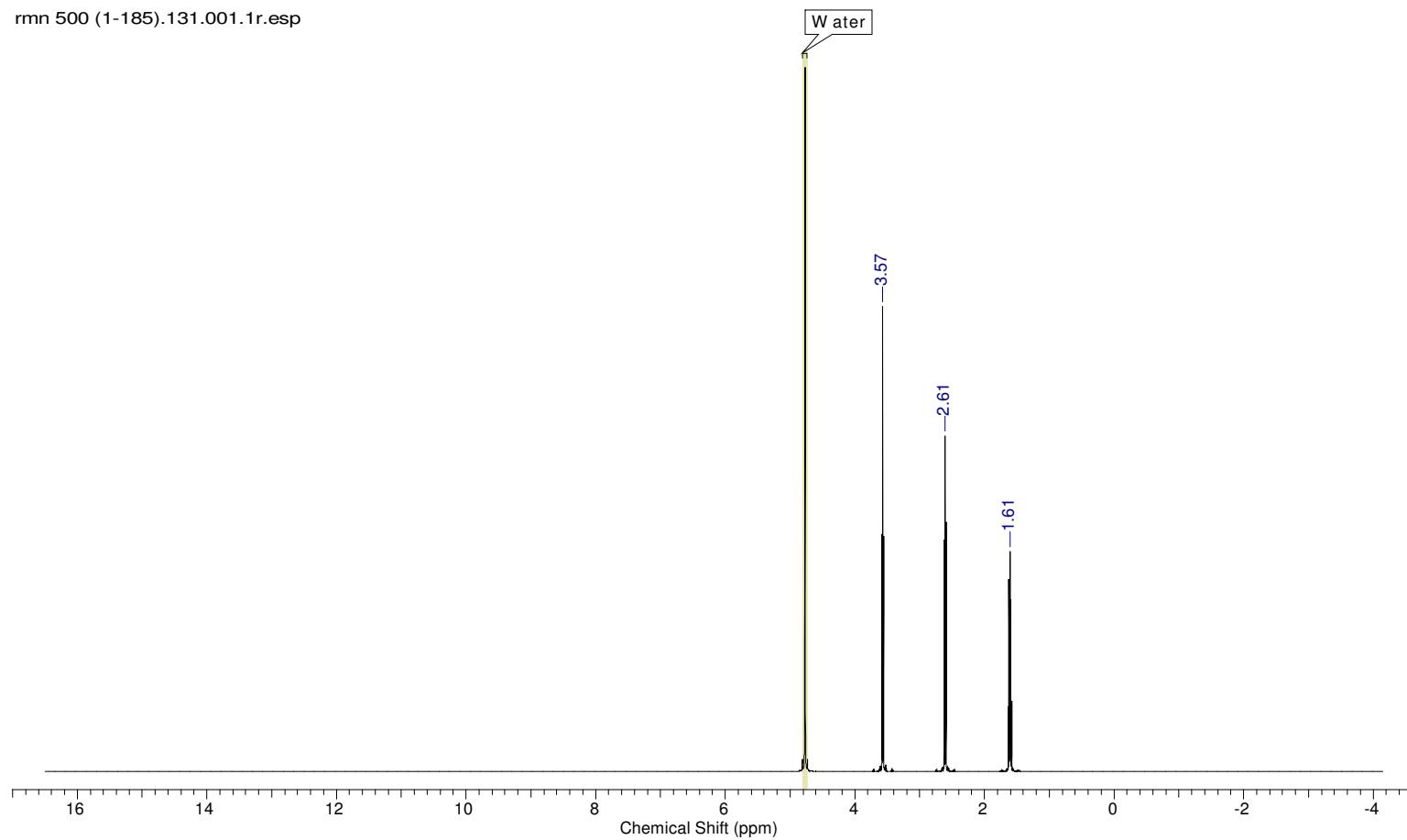
7.4 Espectro de RMN de ^1H da etanolamina (1) D_2O

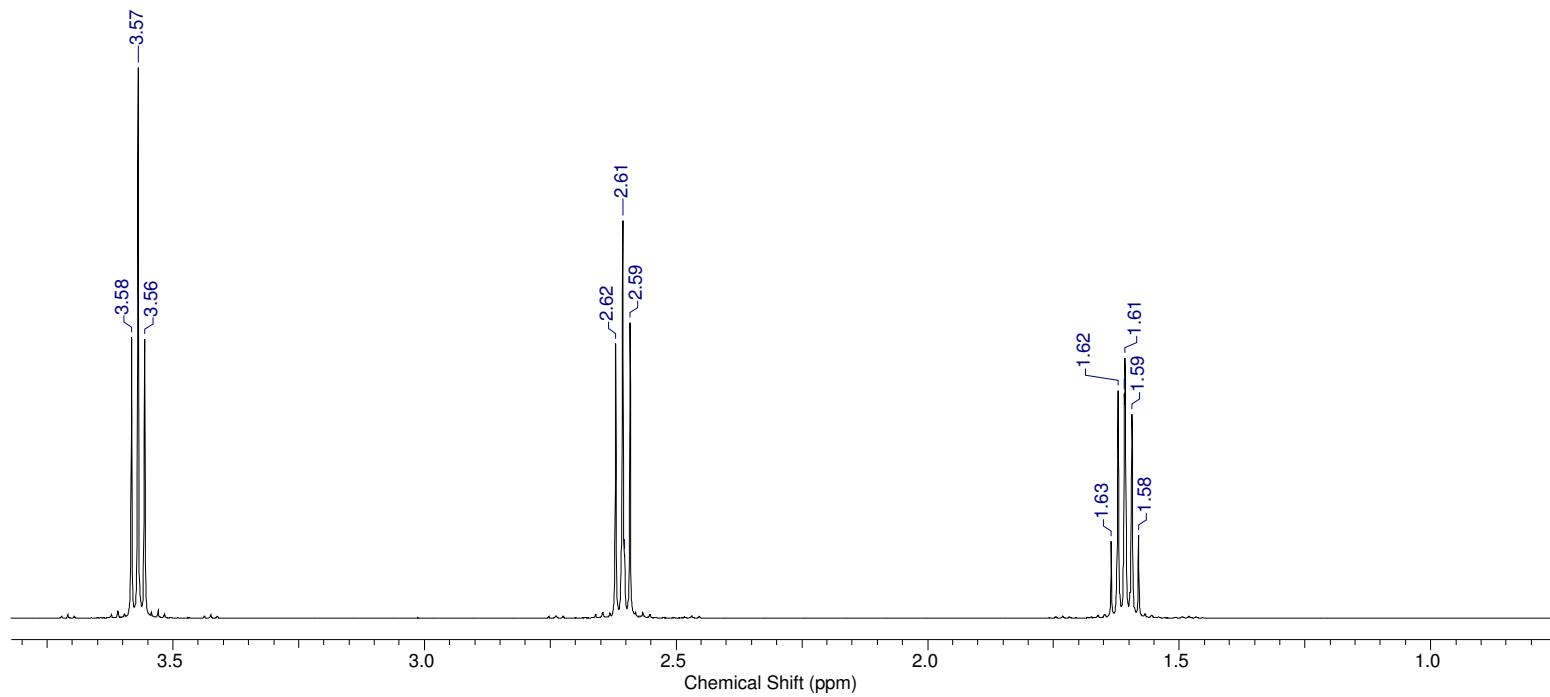


7.4.1 Espectro de RMN de ^{13}C da etanolamina (1) D_2O

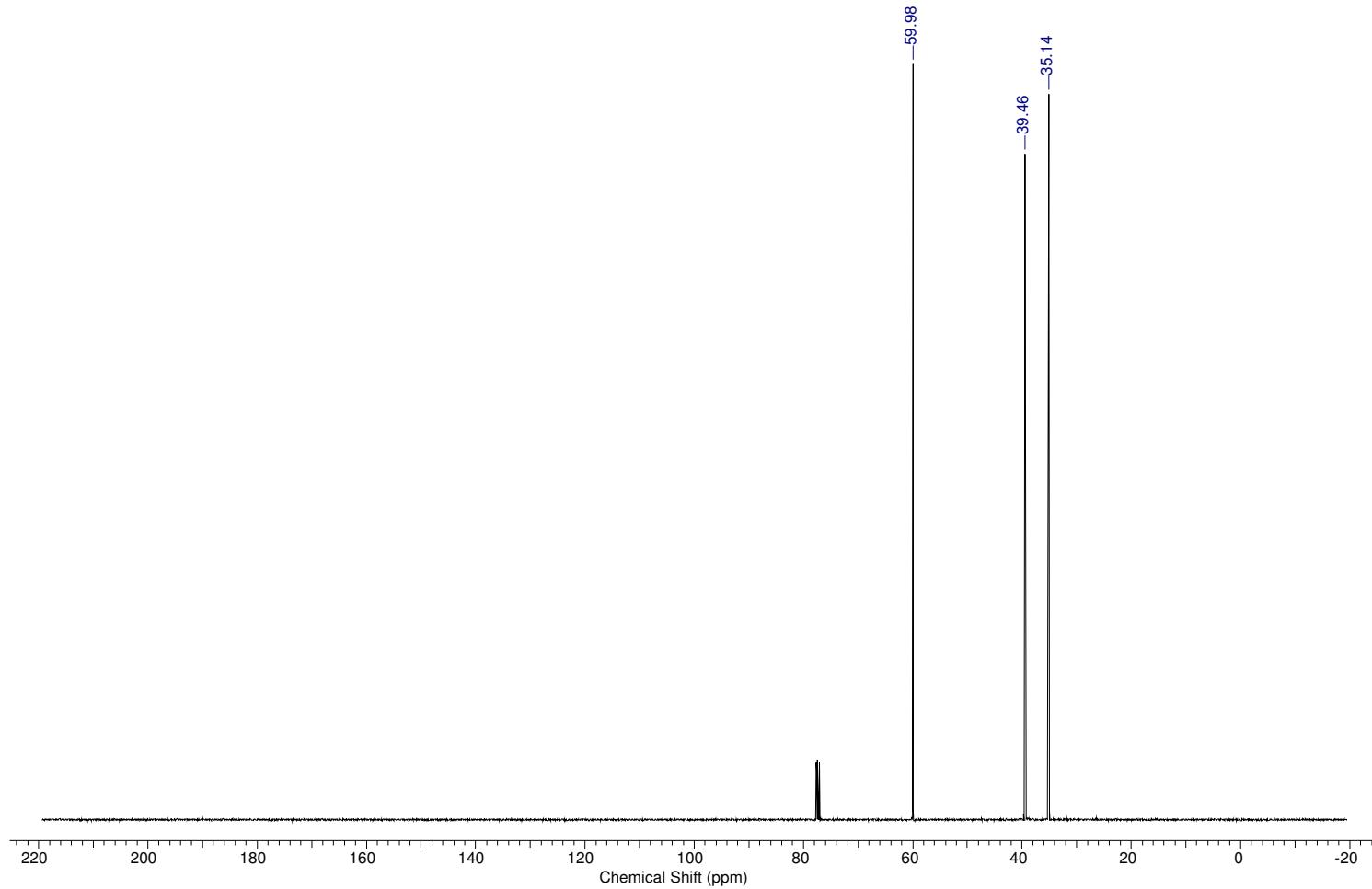


7.5 Espectro de RMN de ^1H da 3-amino-1-propanol (4) D_2O

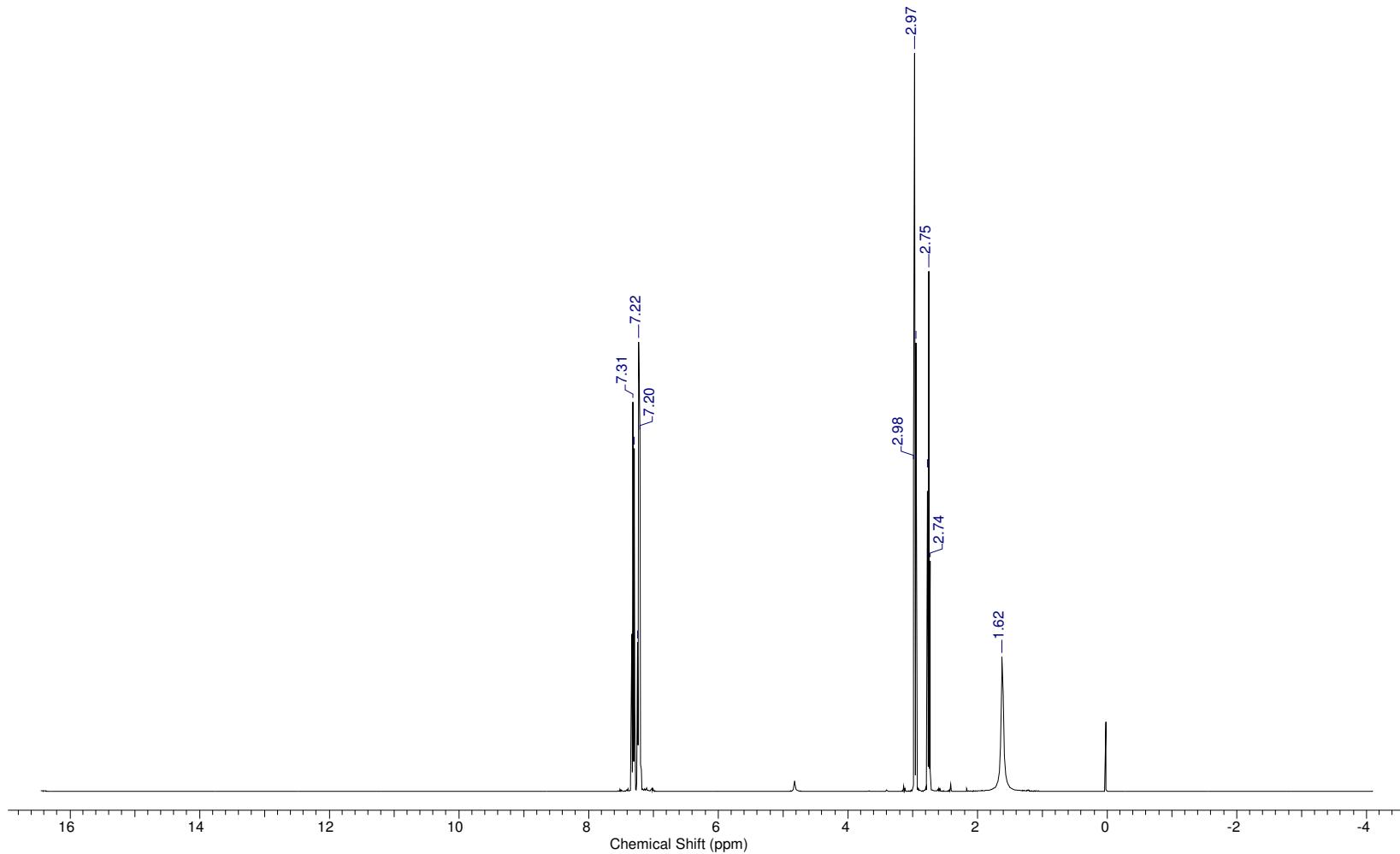




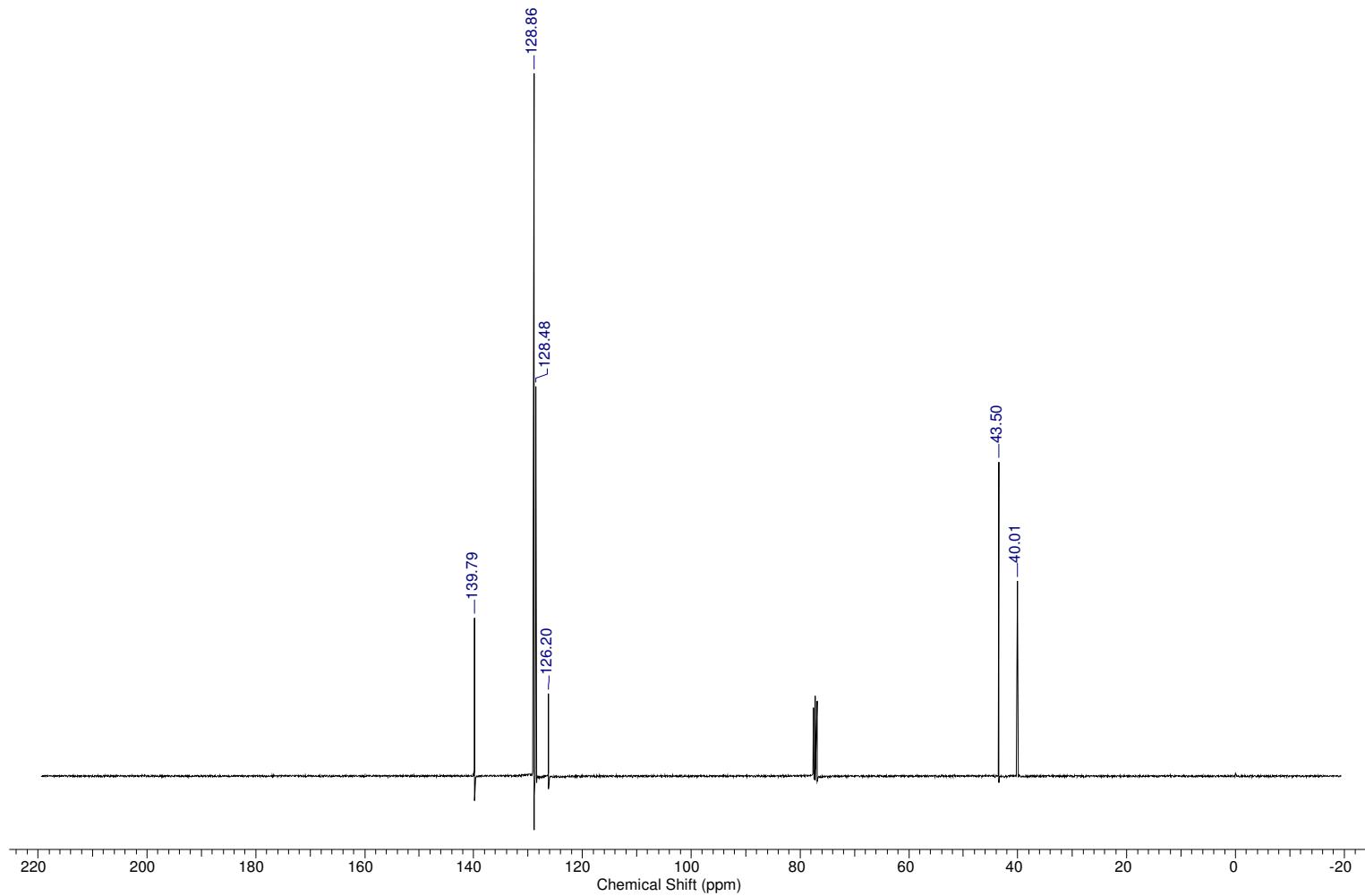
7.5.1 Espectro de RMN de ^{13}C da 3-amino-1-propanol (4) CDCl_3



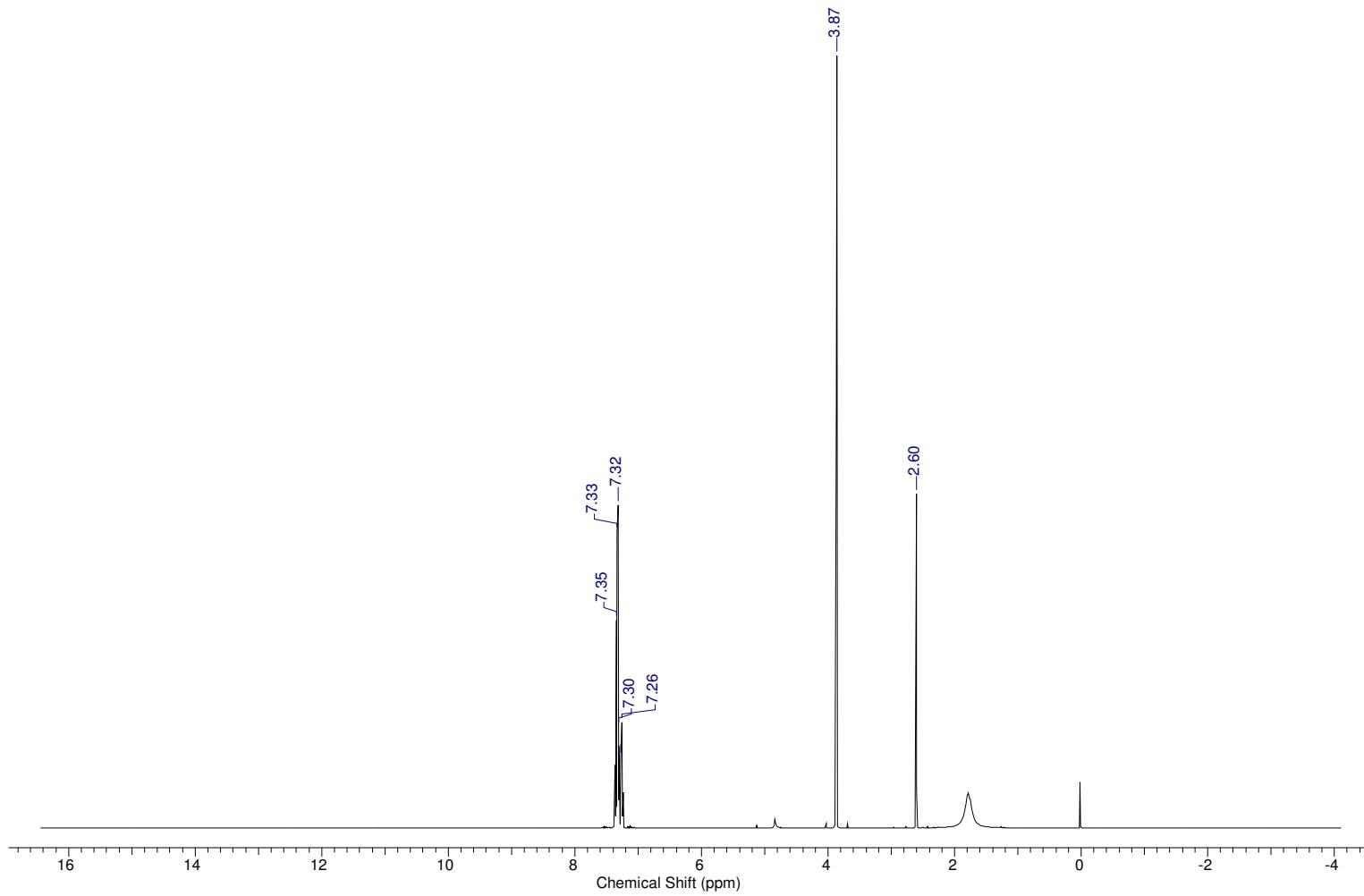
7.6 Espectro de RMN de ^1H da fenetilamina (8) CDCl_3



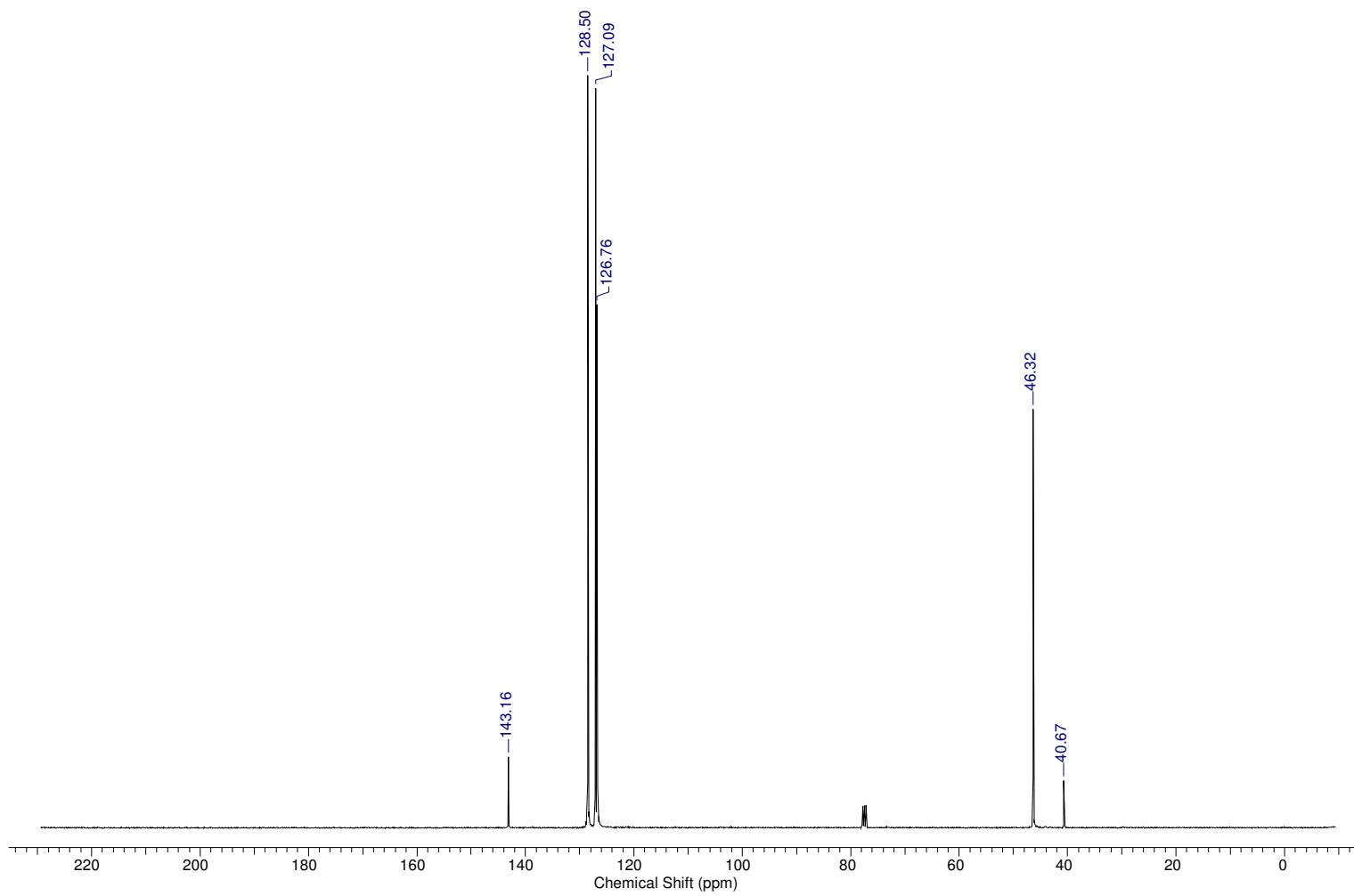
7.6.1 Espectro de RMN de ^{13}C da fenetilamina (8) CDCl_3



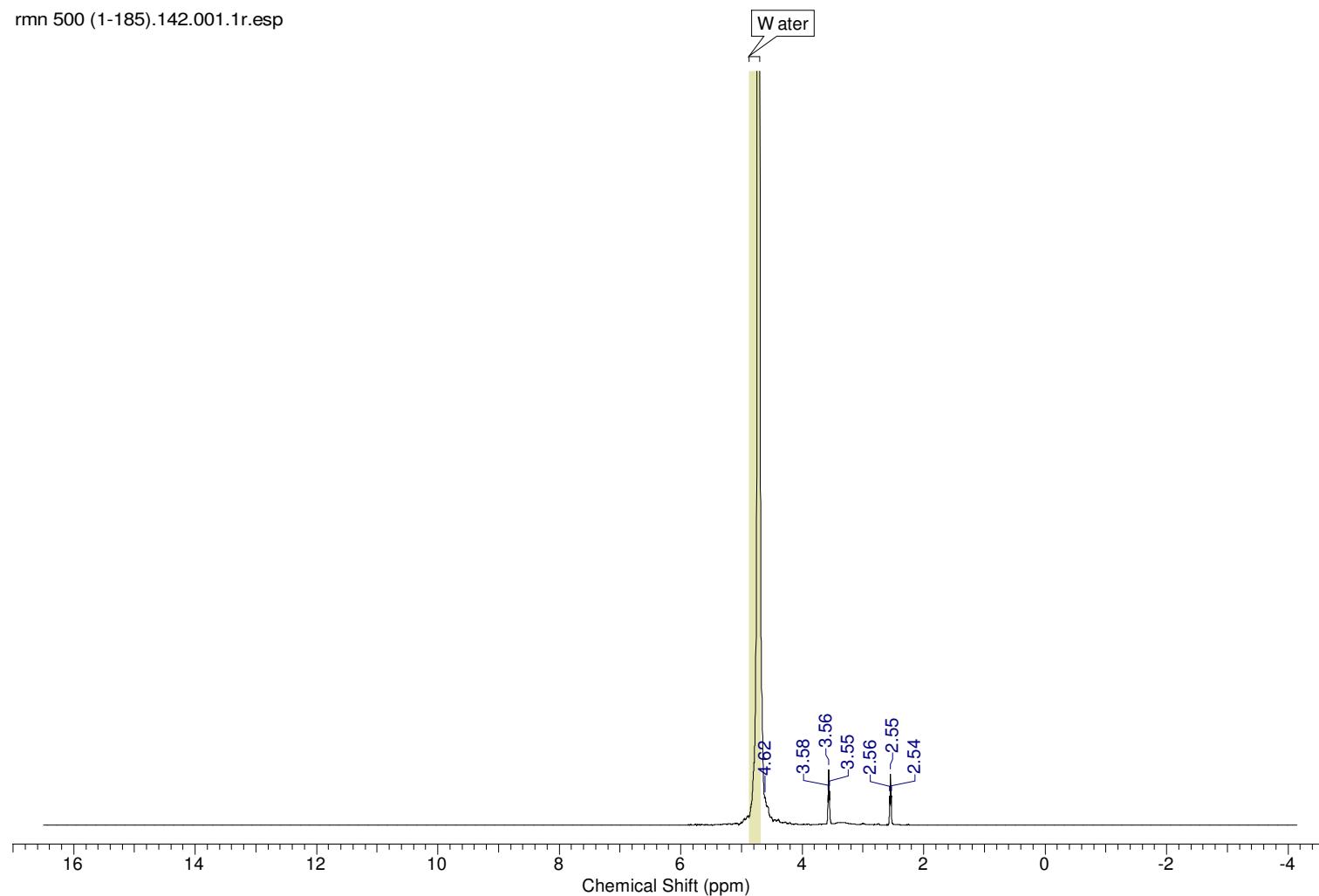
7.7 Espectro de RMN de ^1H da benzilamina (6) CDCl_3



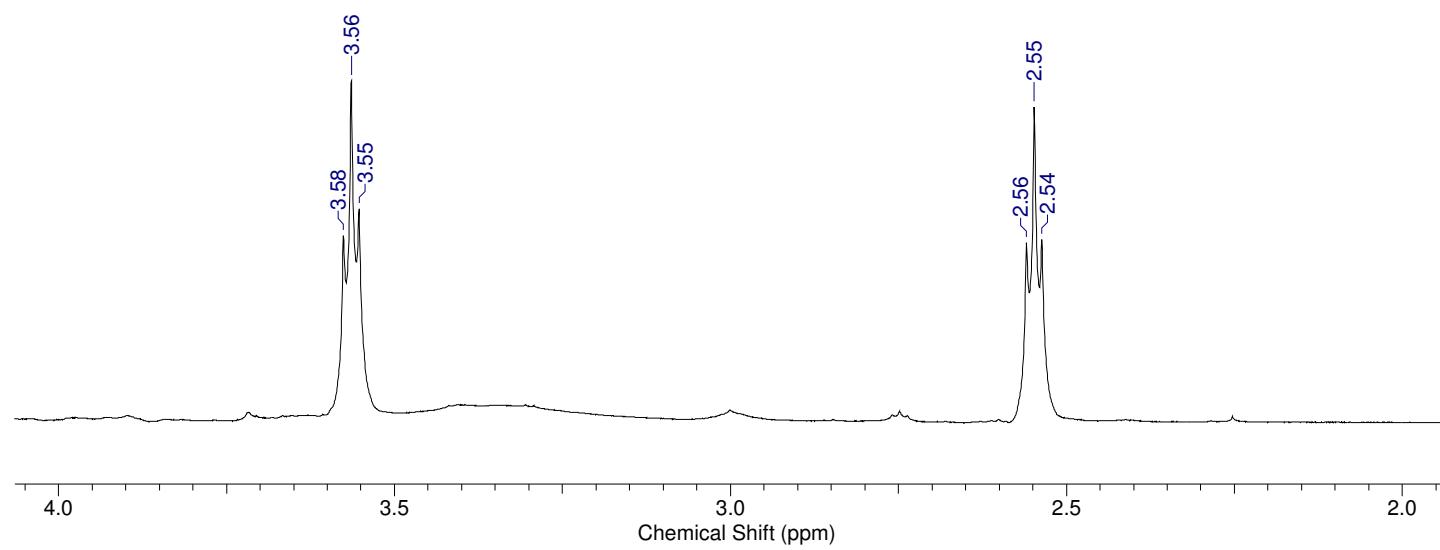
7.7.1 Espectro de RMN de ^{13}C da benzilamina (6) CDCl_3



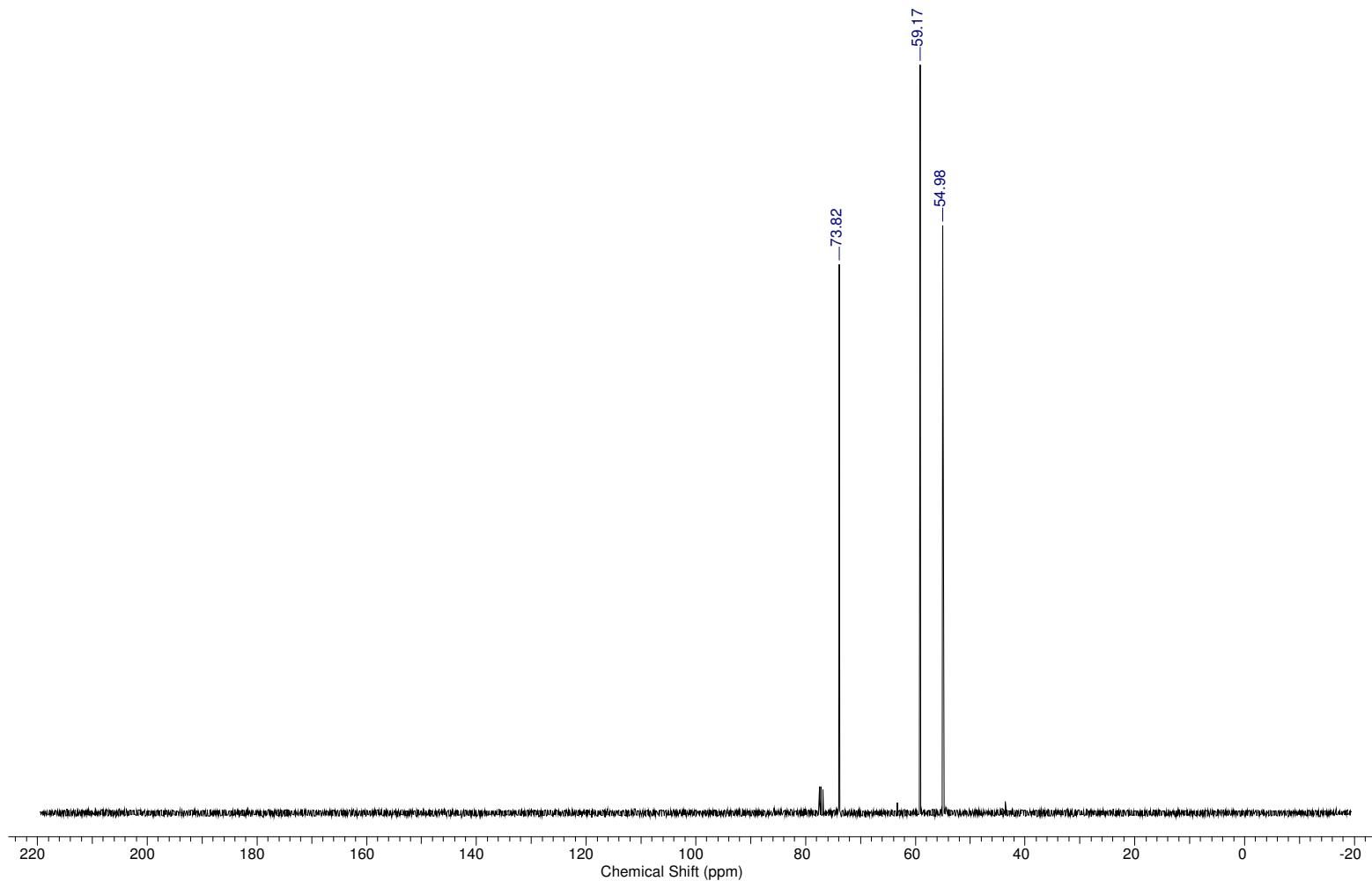
7.8 Espectro de RMN de ^1H da 1,3,5-tris(2-hidroxietil)-1,3,5-triazinana (3) D_2O



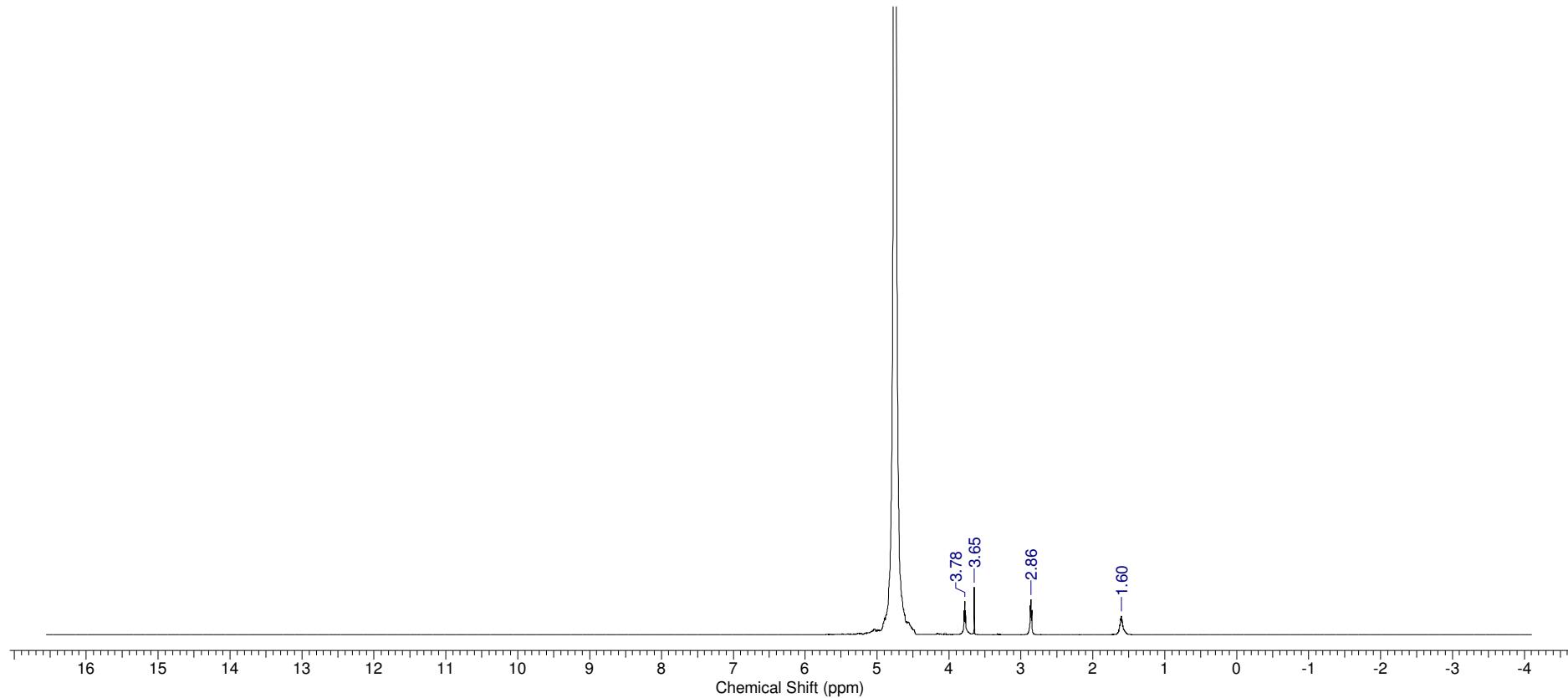
rmn 500 (1-185).142.001.1r.esp

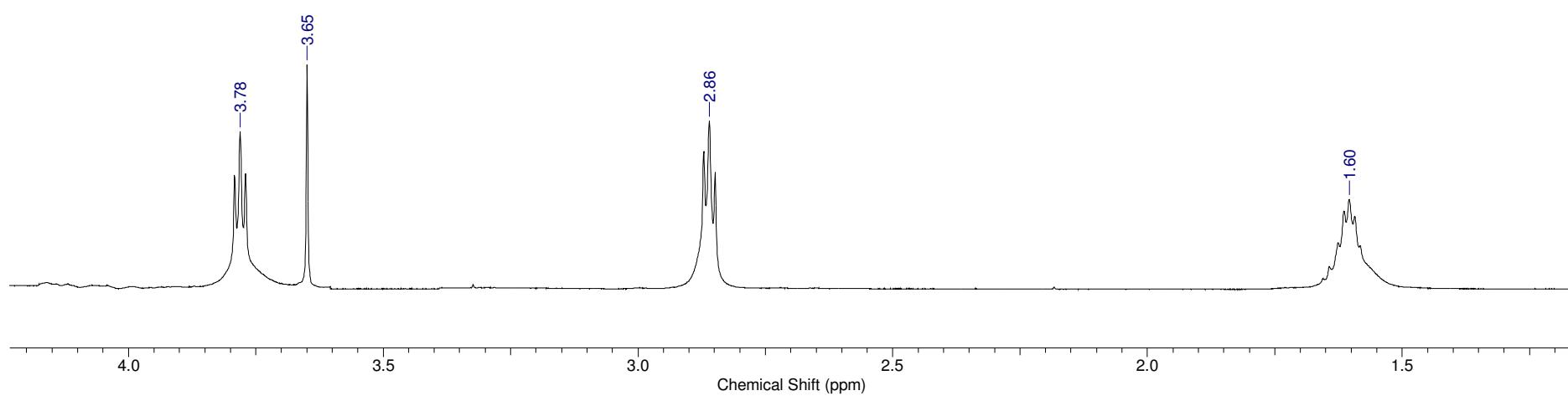


7.8.1 Espectro de RMN de ^{13}C da 1,3,5-tris(2-hidroxietil)-1,3,5-triazinana (3) CDCl_3

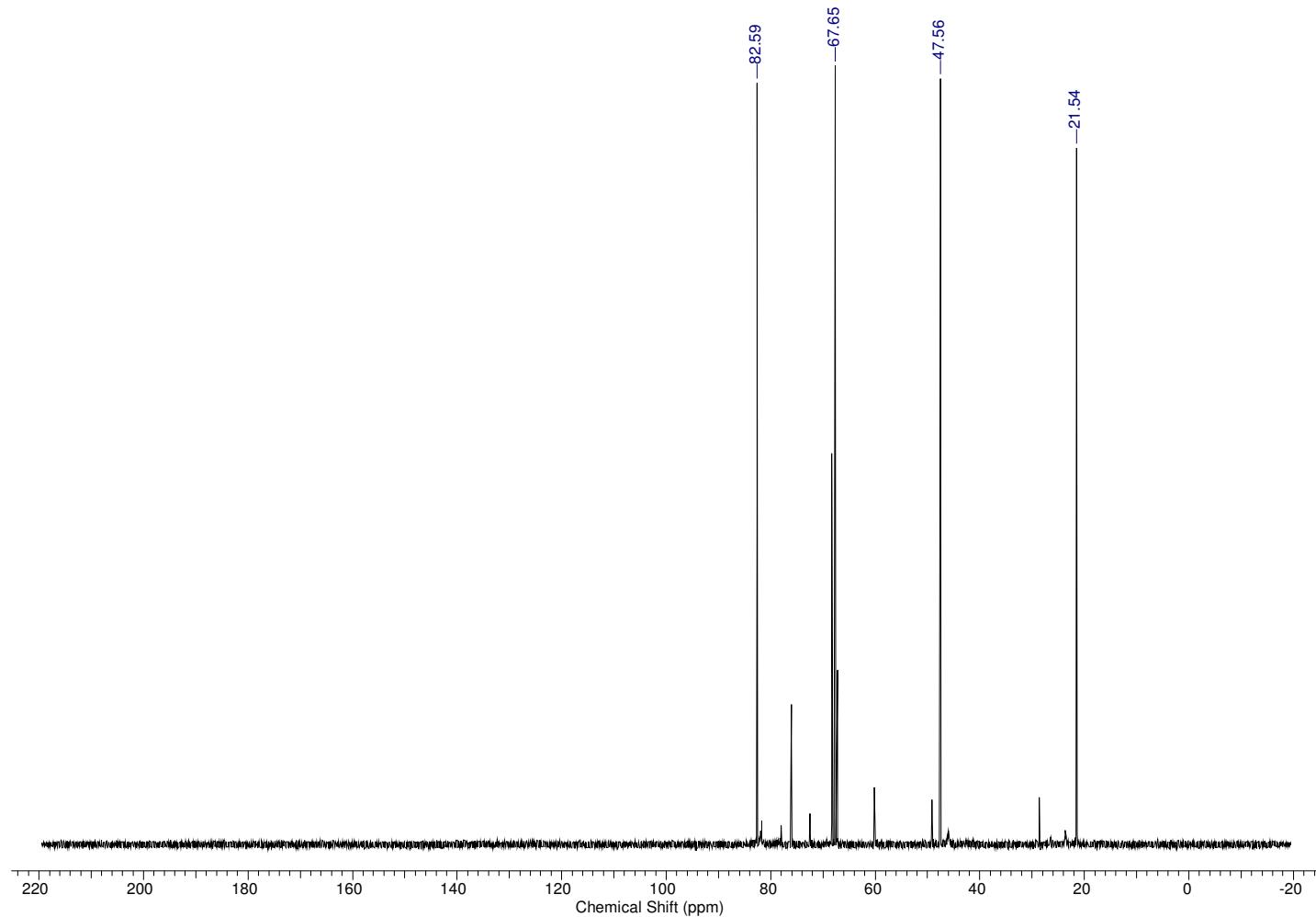


7.9 Espectro de RMN de ^1H da 1,3,5-tris(2-hidroxipropil)-1,3,5-triazinana (5) D_2O

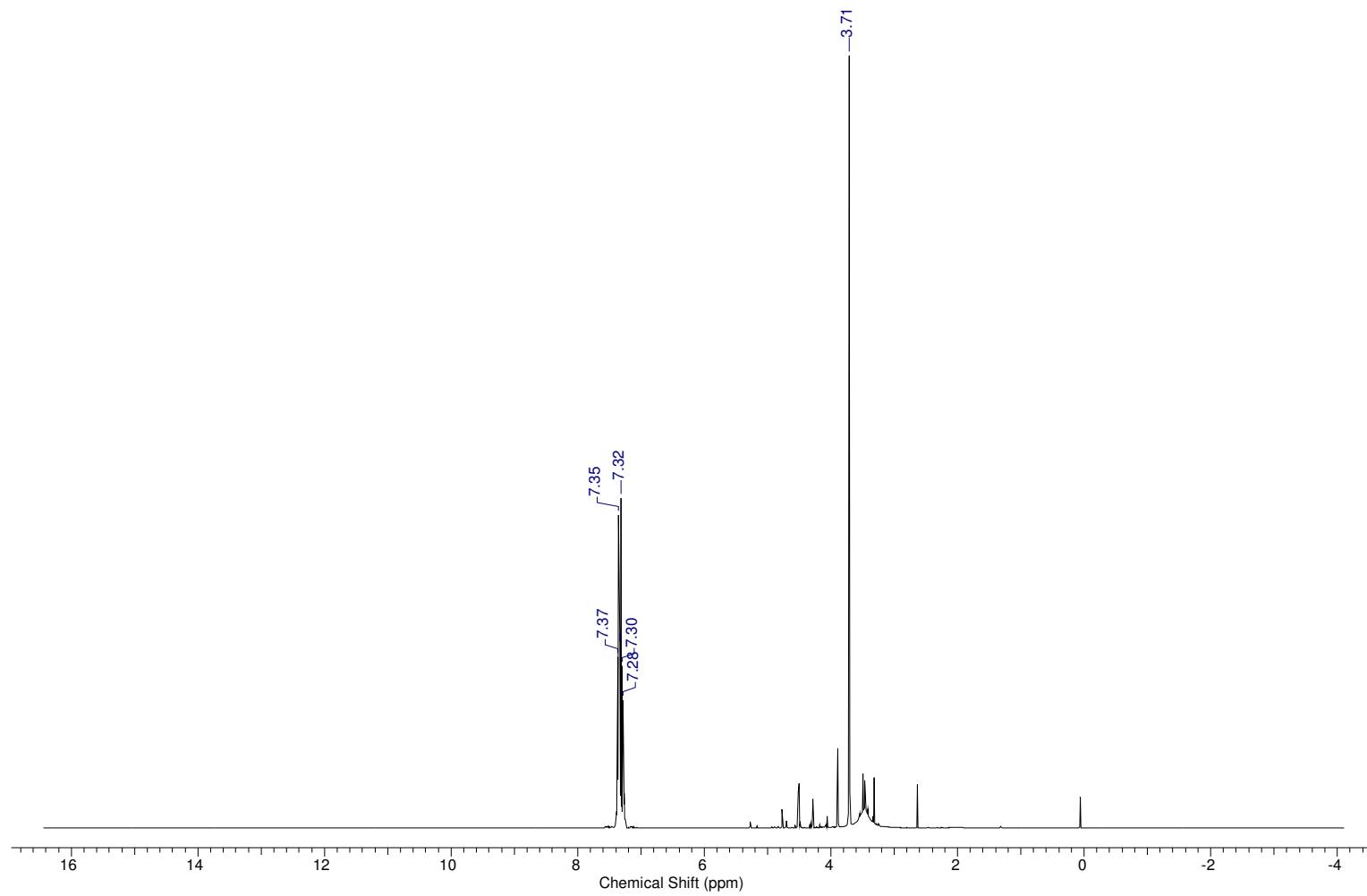




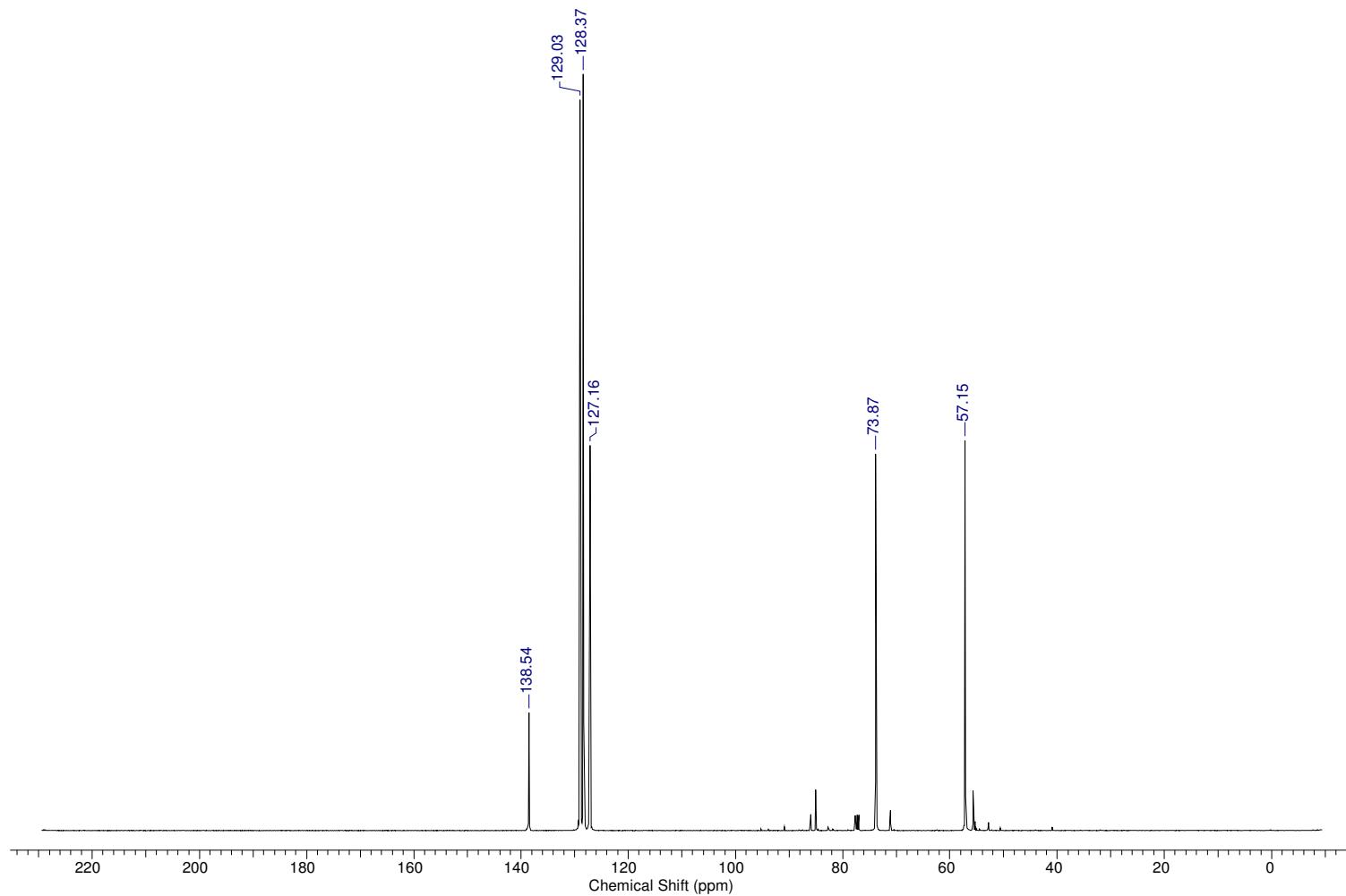
7.9.1 Espectro de RMN de ^{13}C da 1,3,5-tris(2-hidroxipropil)-1,3,5-triazinana (5) D_2O



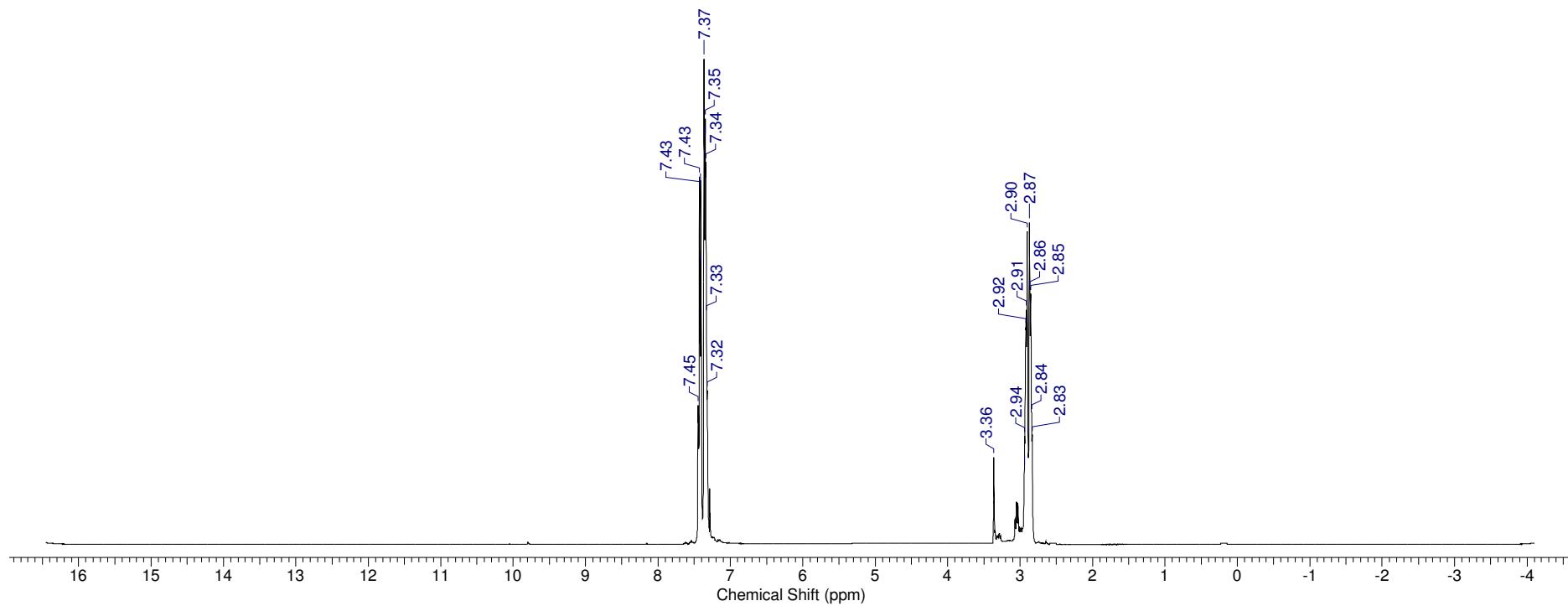
7.11 Espectro de RMN de ^1H da 1,3,5-tris-benzil-1,3,5-triazinana (7) CDCl_3



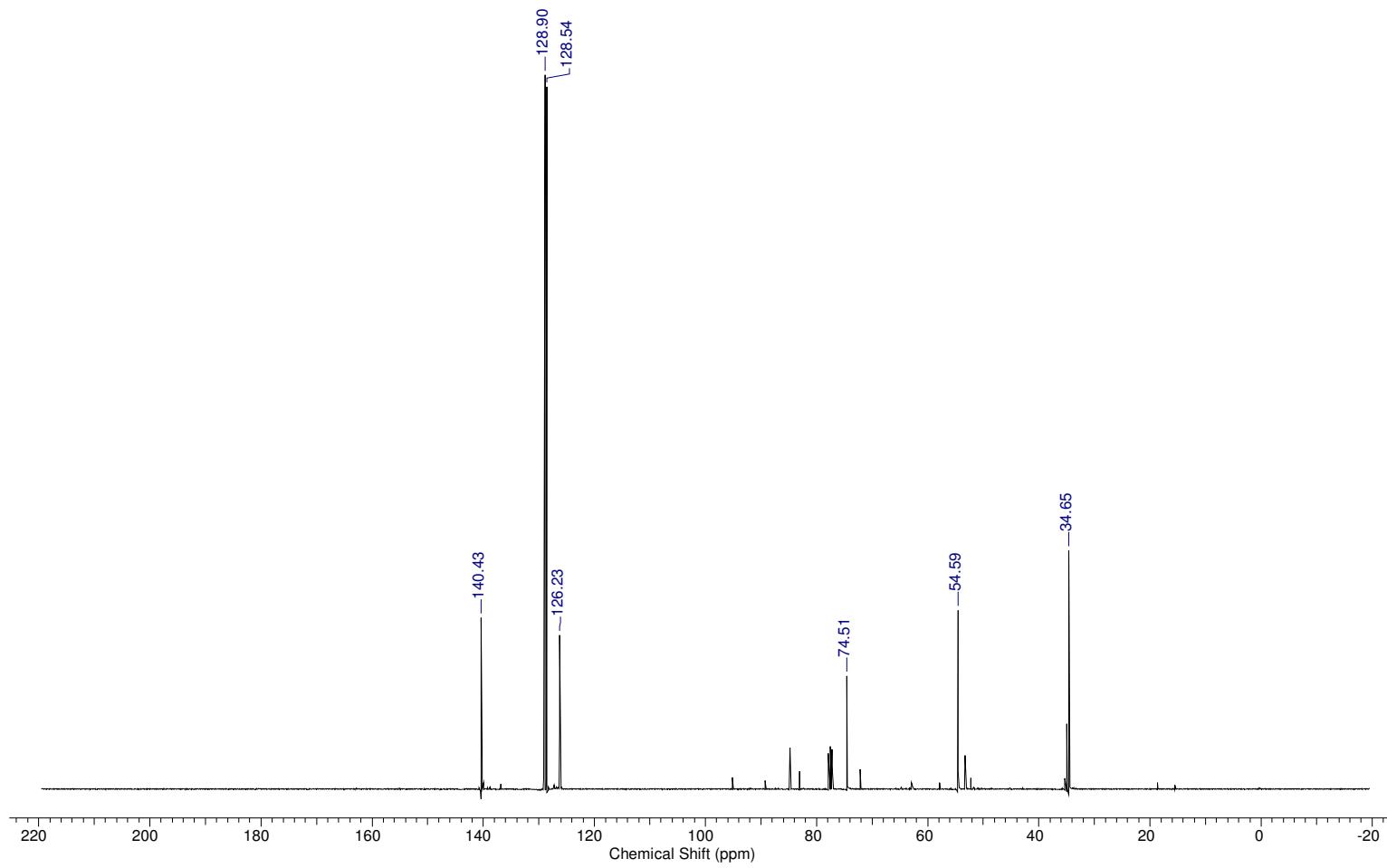
7.11.1 Espectro de RMN de ^{13}C da 1,3,5-tris-benzil-1,3,5-triazinana (7) CDCl_3



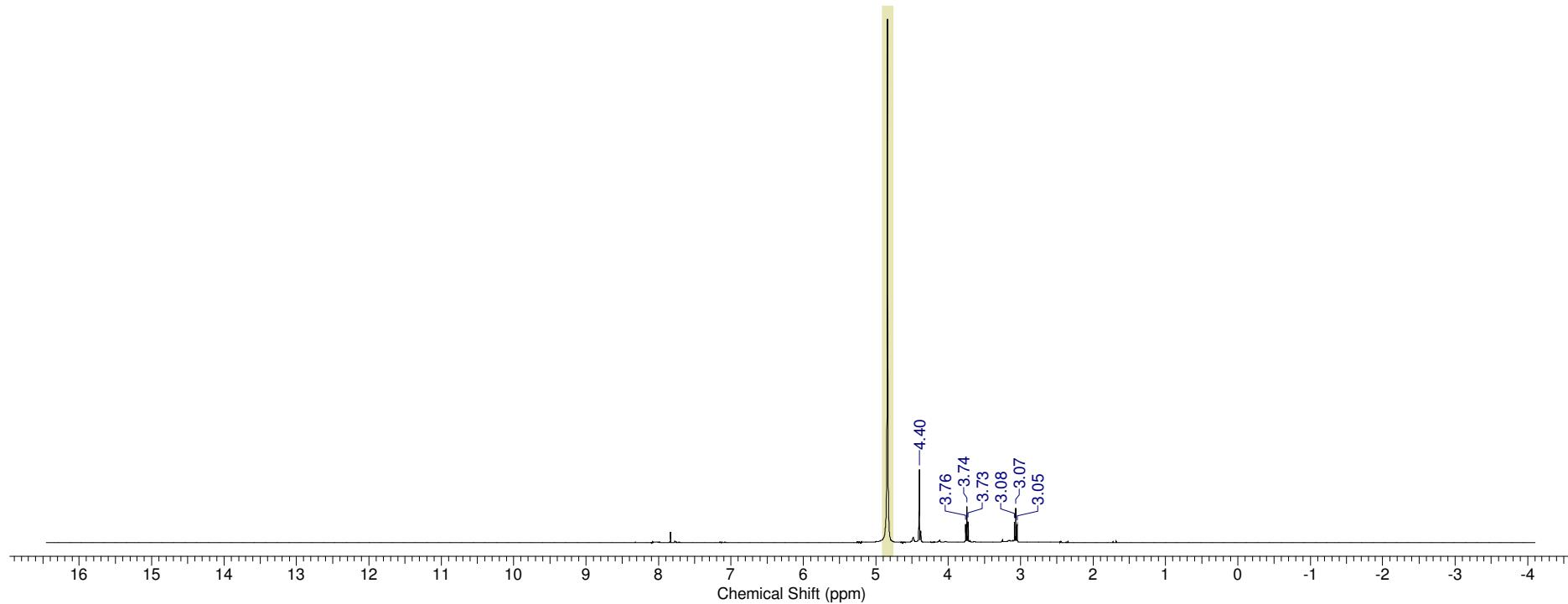
7.12 Espectro de RMN de ^1H da 1,3,5-tris-fenetil-1,3,5-triazinana (9) CDCl_3



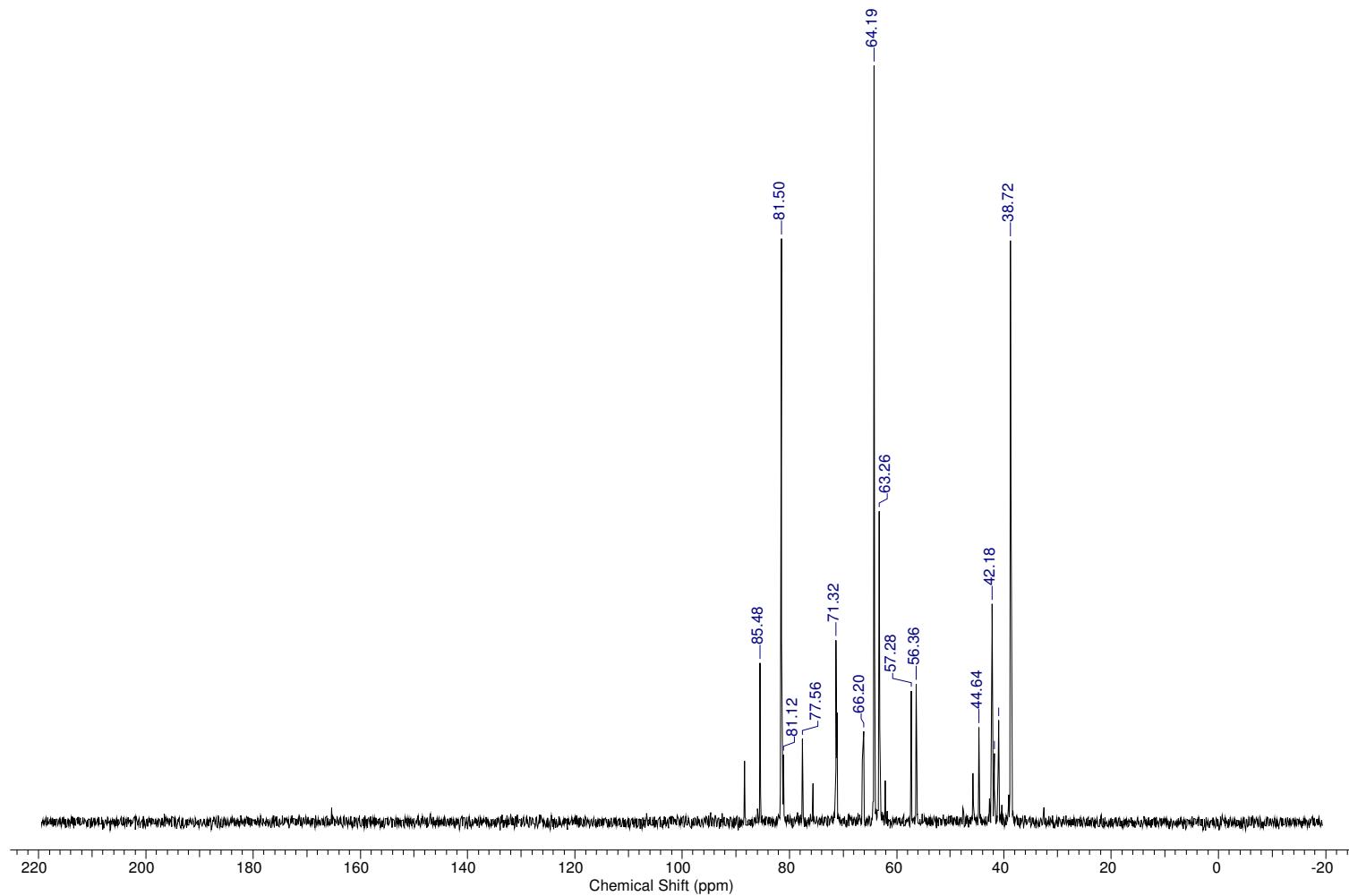
7.12.1 Espectro de RMN de ^{13}C da 1,3,5-tris-fenetil-1,3,5-triazinana (9) CD_2Cl_2



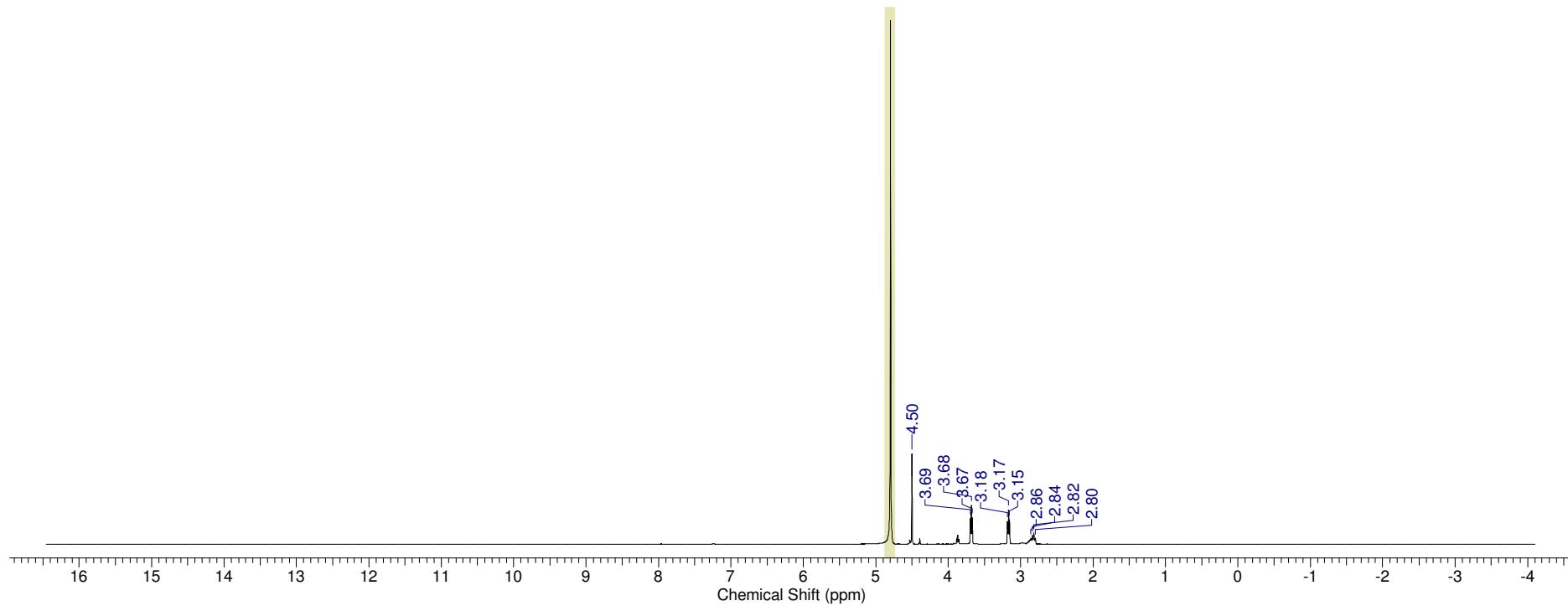
7.13 Espectro de RMN de ^1H da 1,3,5-N,N',N''-(etil-hidrogenosulfato)-triazinana (11) D_2O

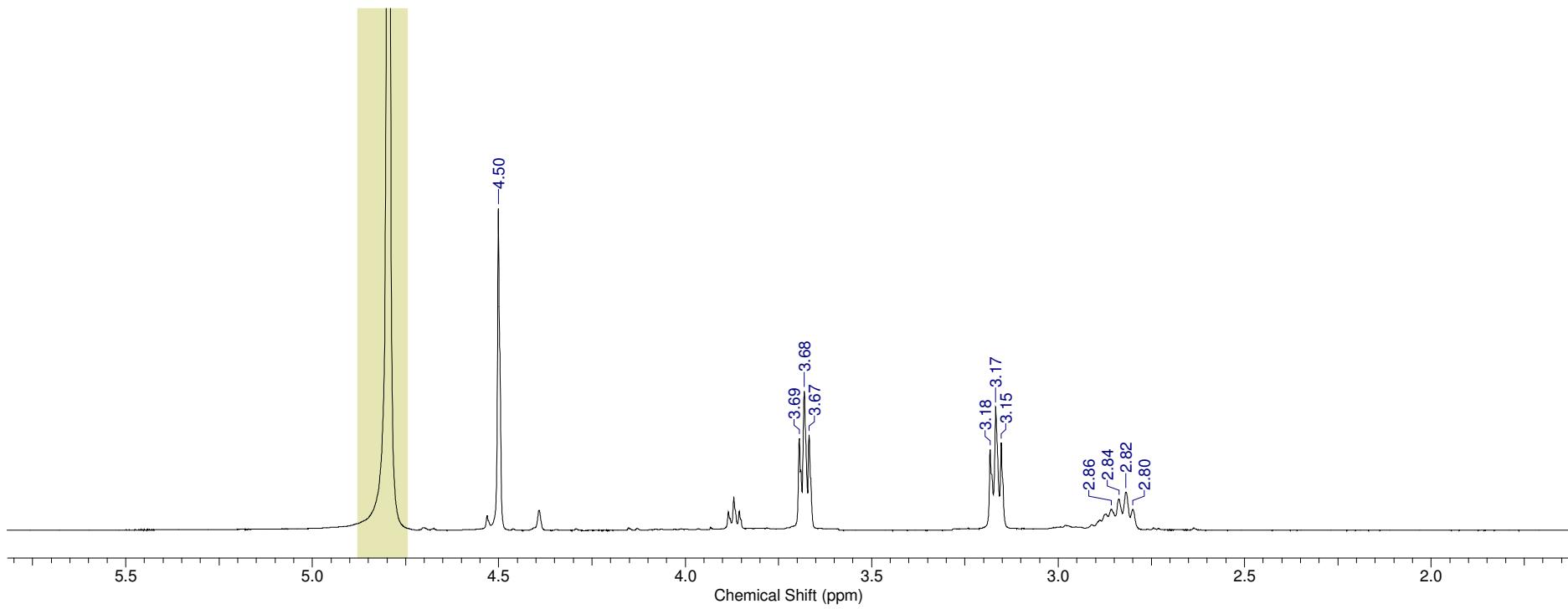


7.13.1 Espectro de RMN de ^{13}C da 1,3,5-N,N',N''-(etil-hidrogenosulfato)-triazinana (11) D_2O

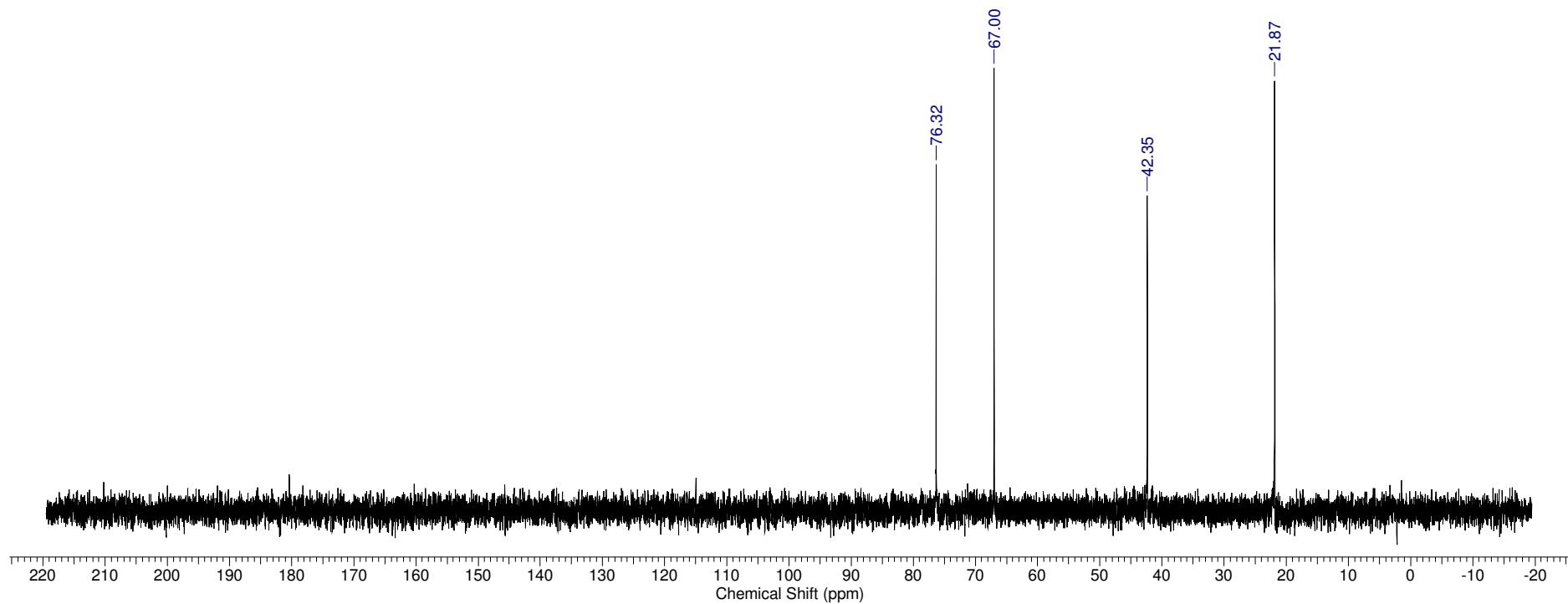


7.14 Espectro de RMN de ^1H da 1,3,5-N,N',N''-(propil-hidrogenosulfato)-triazinana (12) D_2O

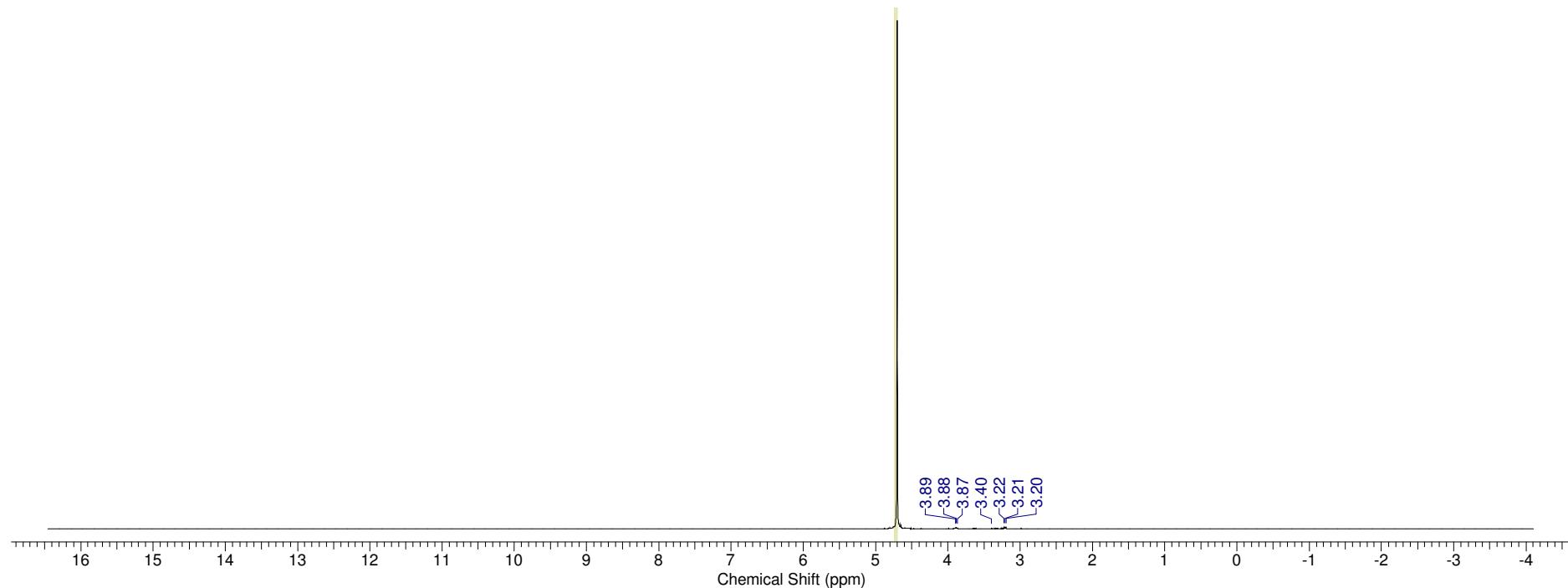


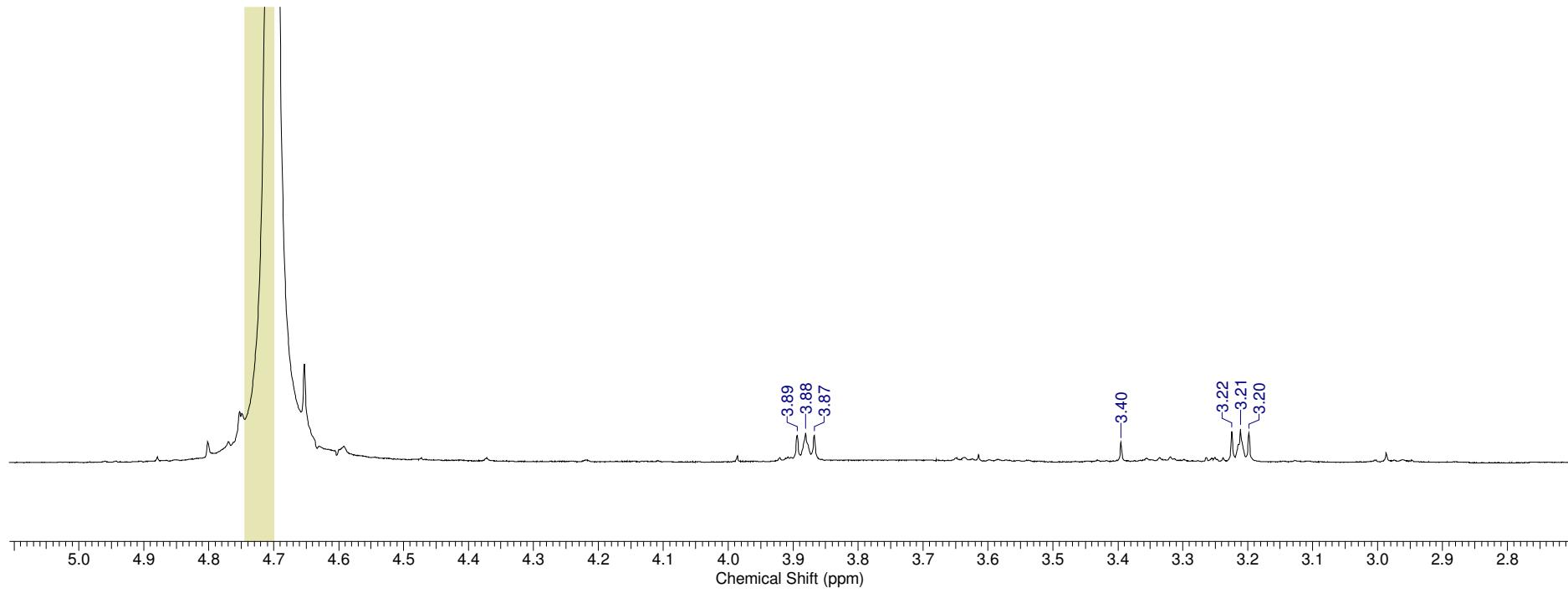


7.14.1 Espectro de RMN de ^{13}C da 1,3,5-N,N',N''-(propil-hidrogenosulfato)-triazinana (12) D_2O

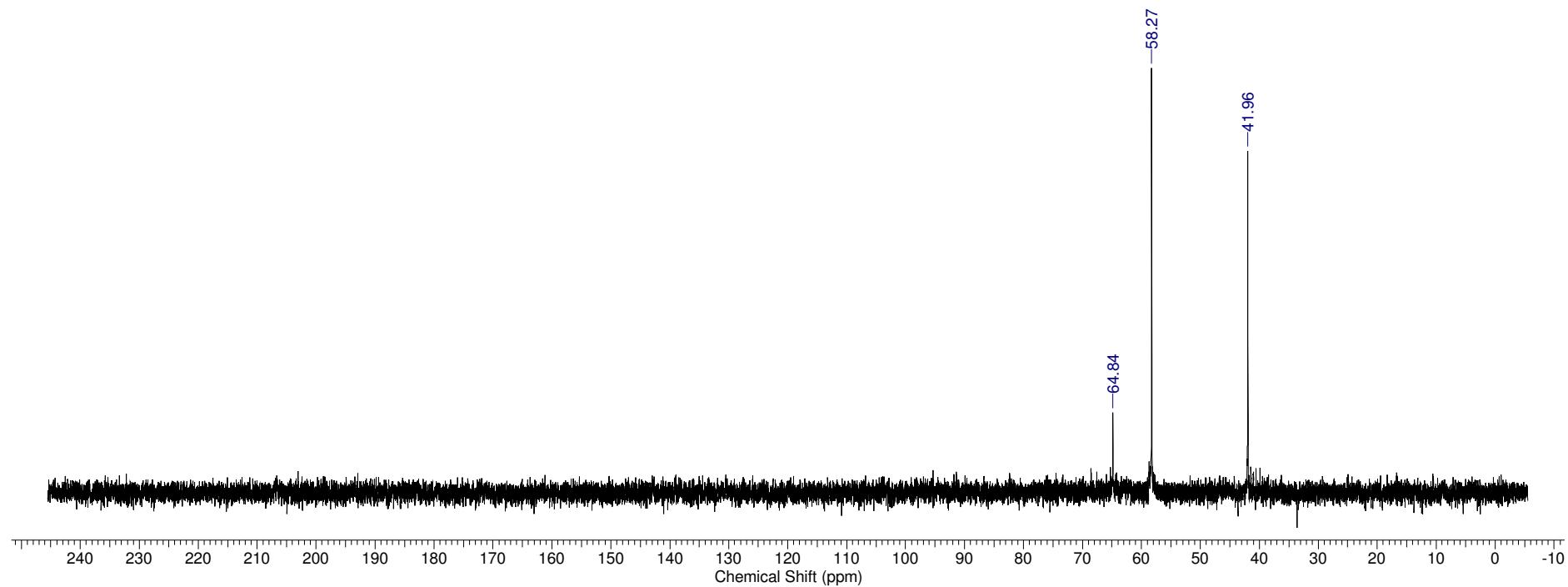


7.15 Espectro de RMN de ^1H do sal sódico da 1,3,5-N,N',N''-(etil-hidrogenosulfato)-triazinana (14) D_2O

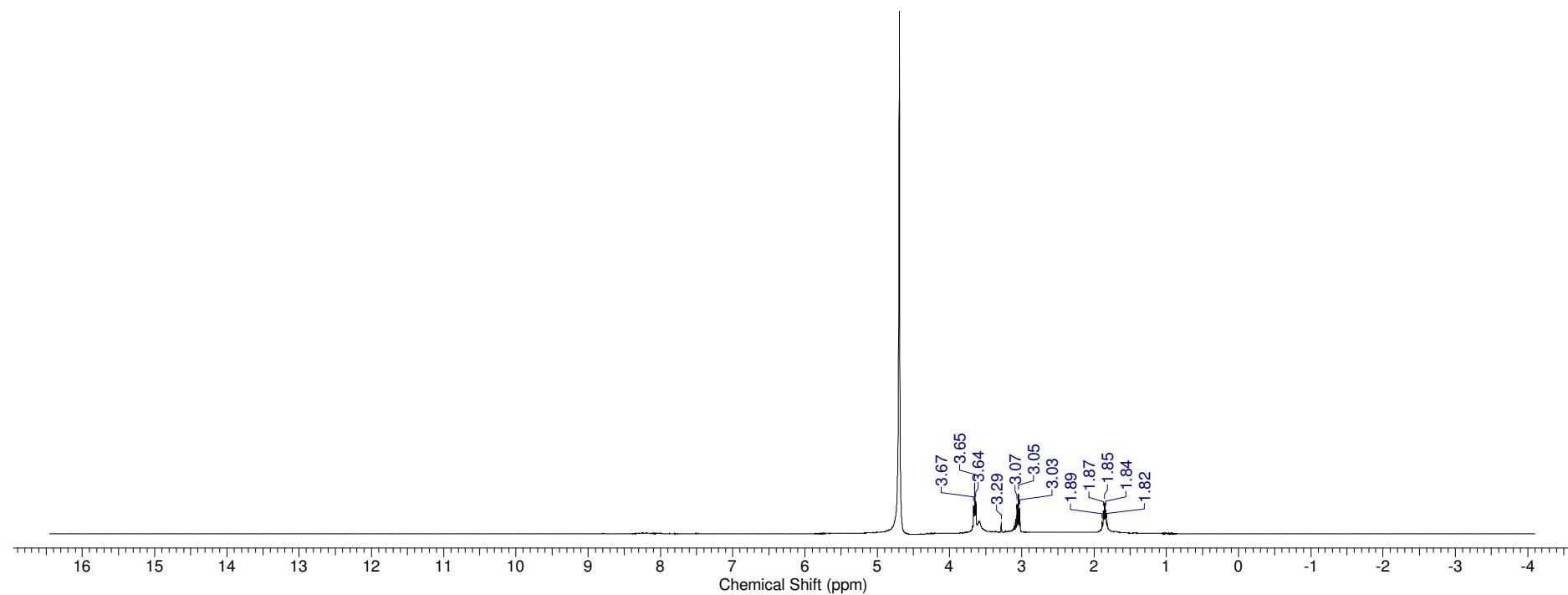


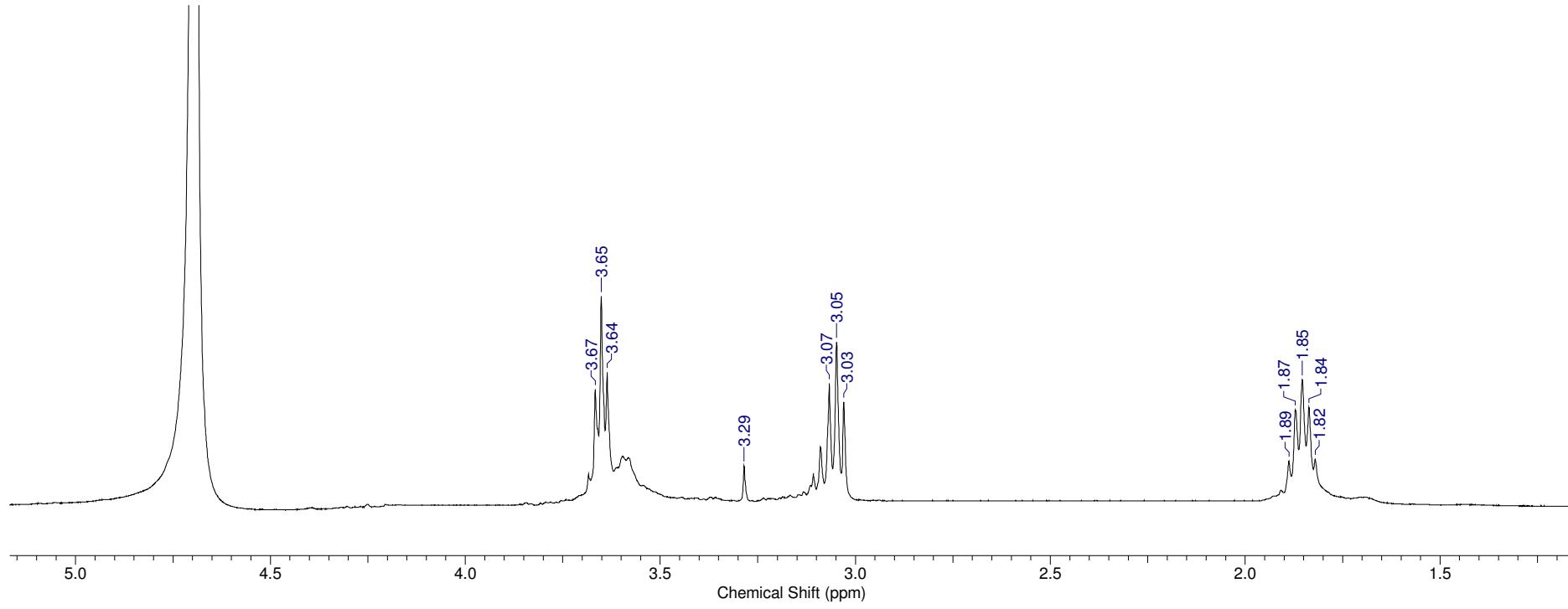


7.15.1 Espectro de RMN de ^{13}C do sal sódico da 1,3,5-N,N',N"- (etil-hidrogenosulfato)-triazinana (14) D_2O

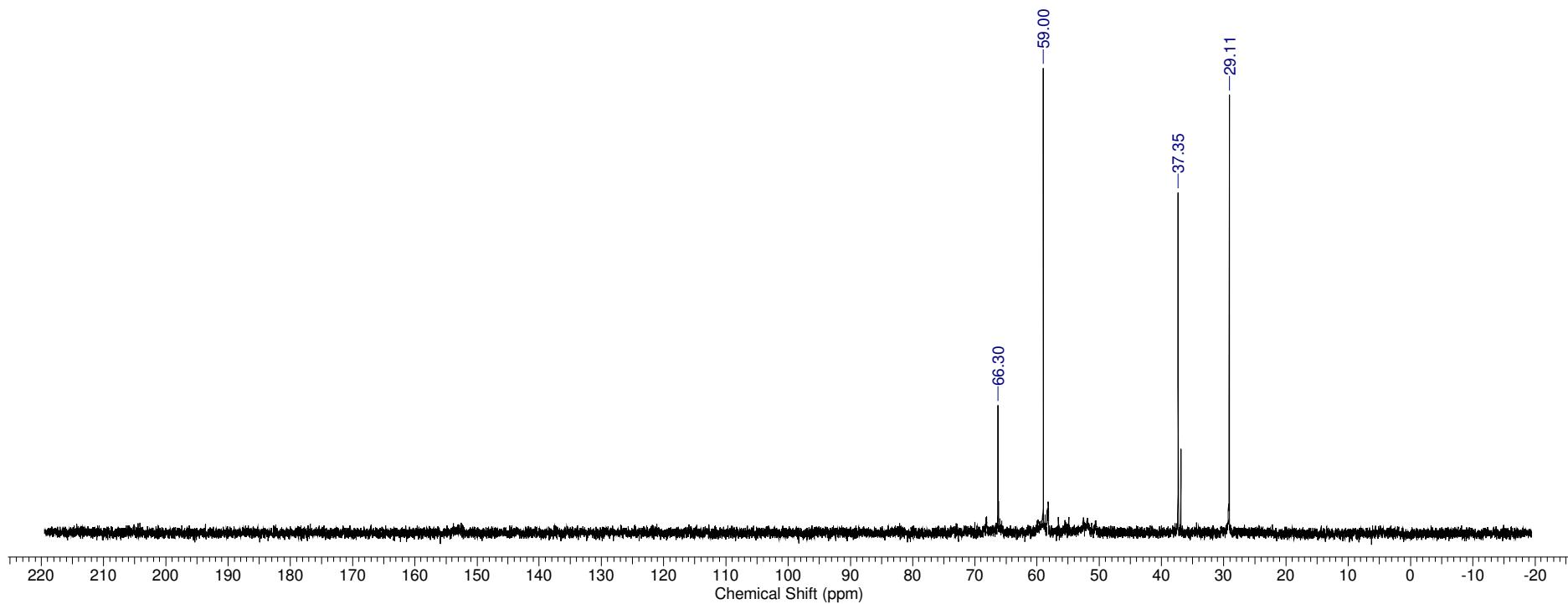


7.16 Espectro de RMN de ^1H do sal sódico da 1,3,5-N,N',N''-(propil-hidrogenosulfato)-triazinana (15) D_2O

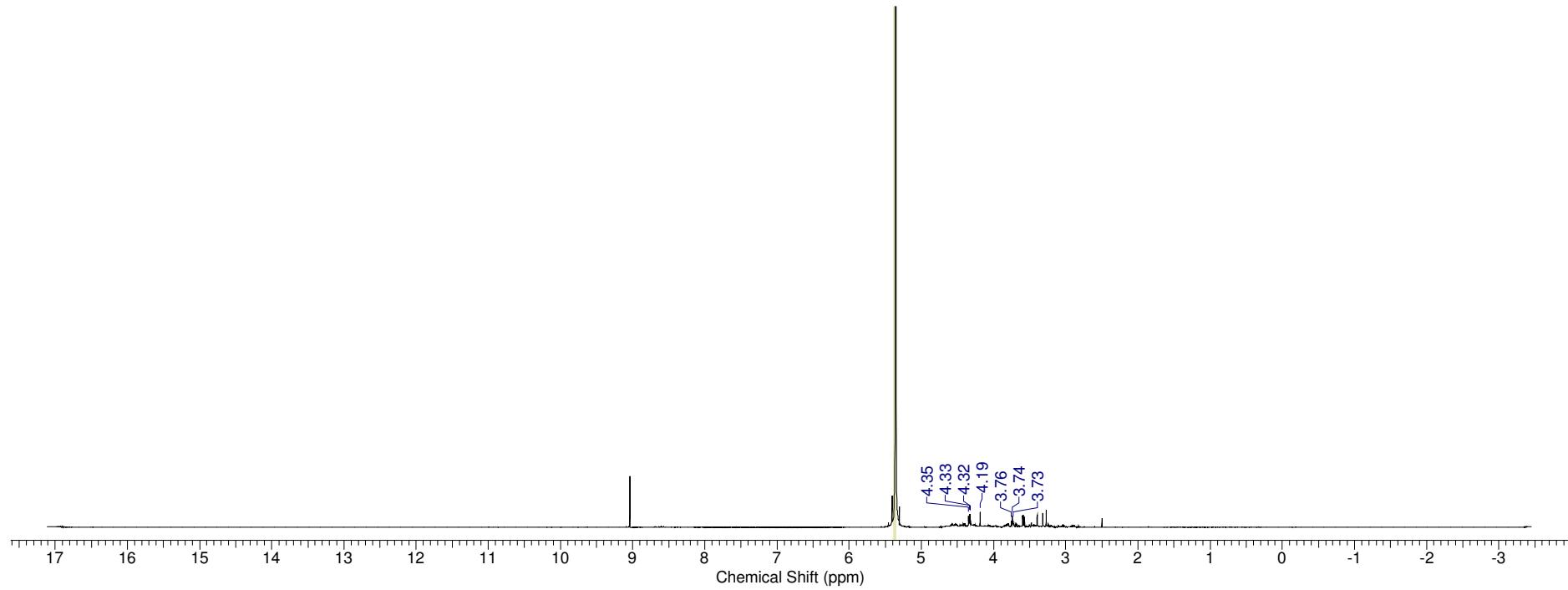


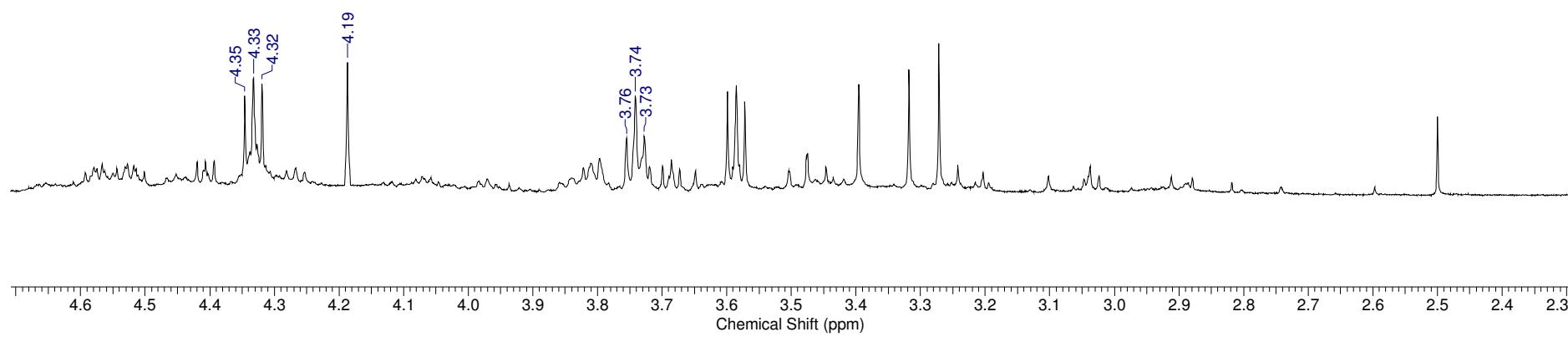


7.16.1 Espectro de RMN de ^{13}C do sal sódico da 1,3,5-N,N',N"- (propil-hidrogenosulfato)-triazinana (15) D_2O

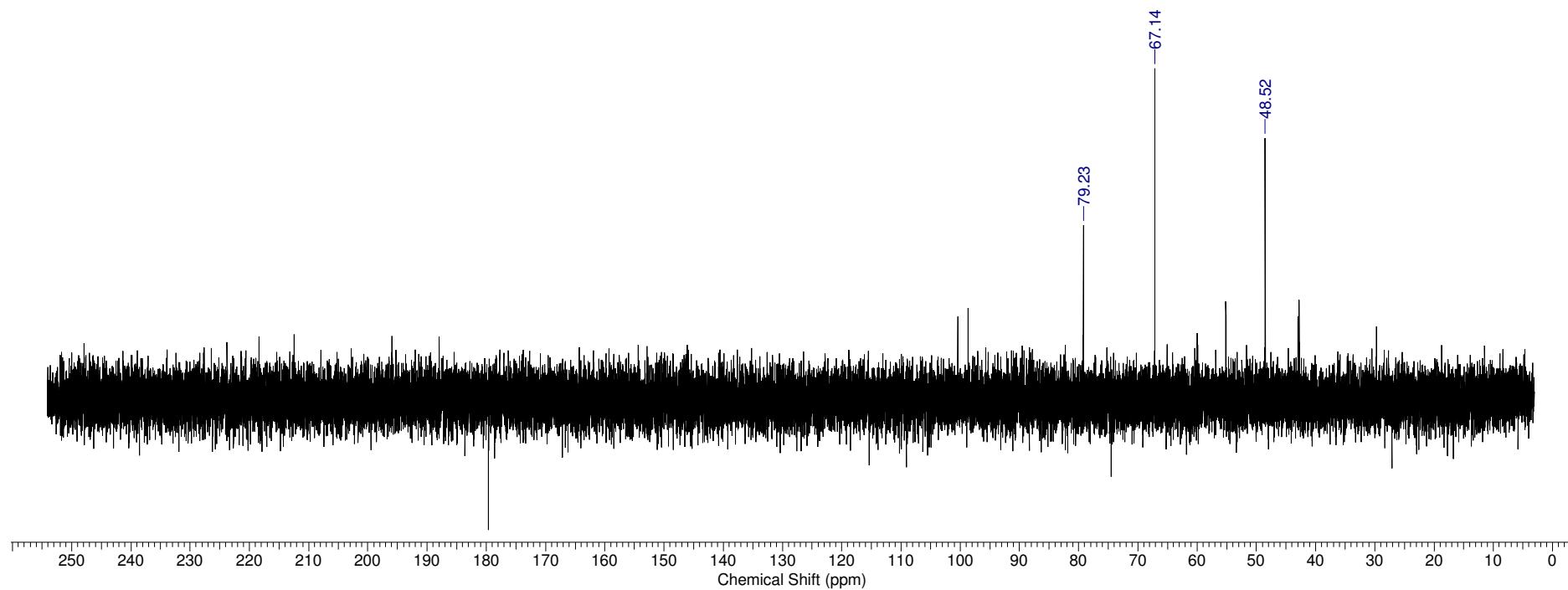


7.17 Espectro de RMN de ^1H da 1,3,5-N,N',N"- (etil-di-hidrogenofosfato)-triazinana (16) D_2O

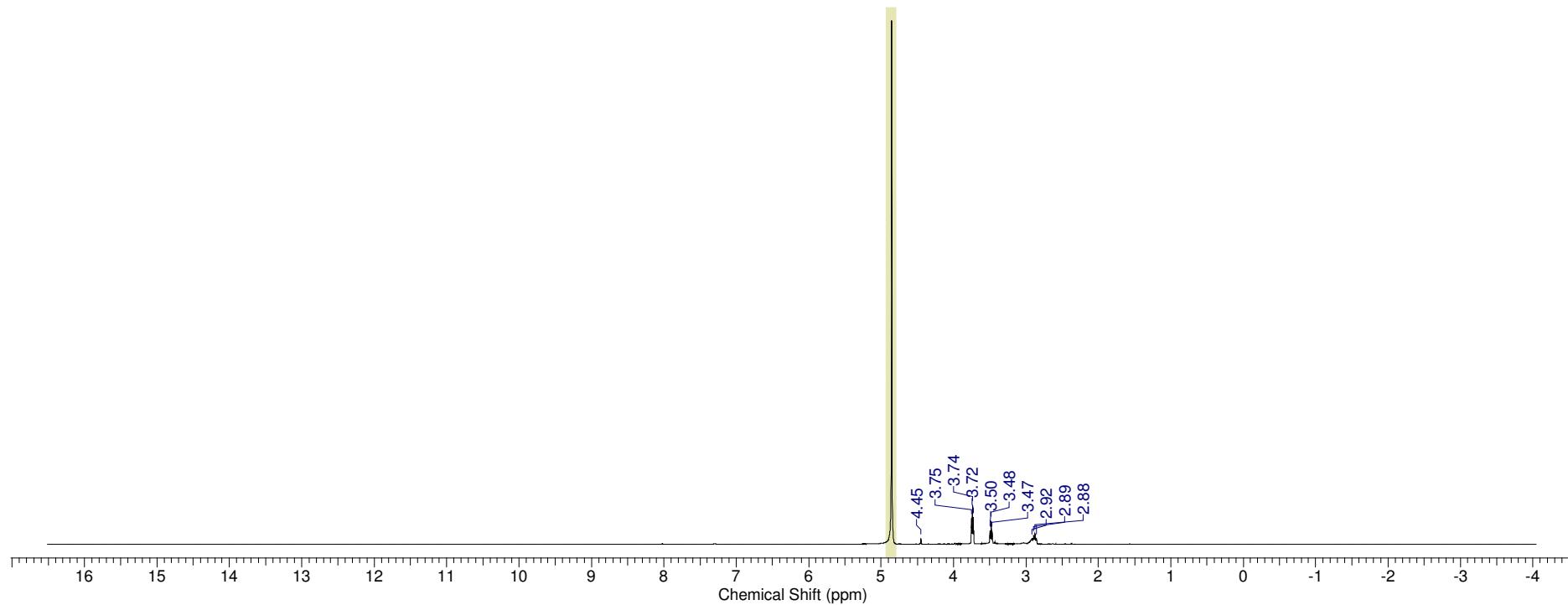


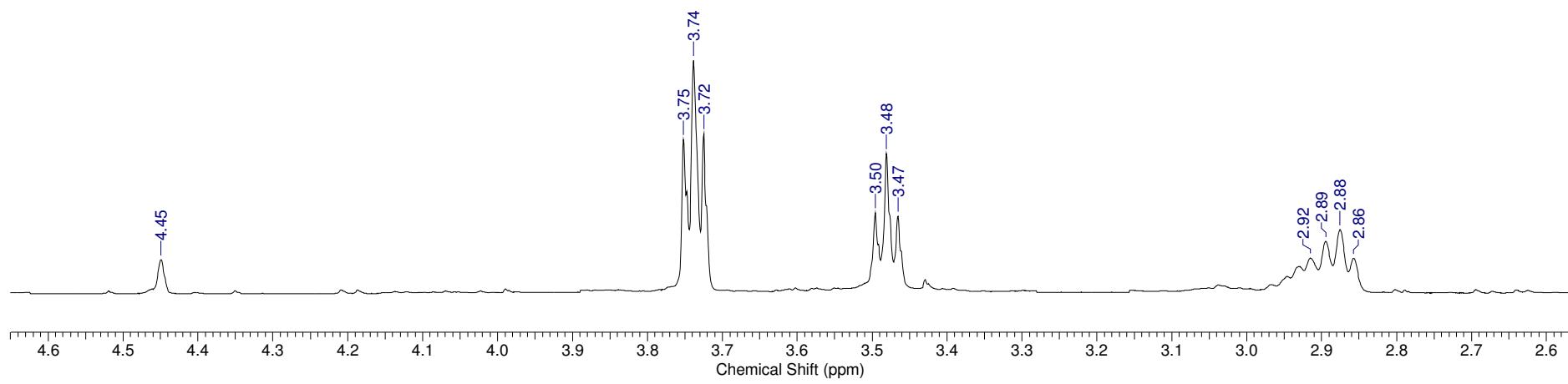


7.17.1 Espectro de RMN de ^{13}C da 1,3,5-N,N',N''-(etil-di-hidrogenofosfato)-triazinana (16) D_2O

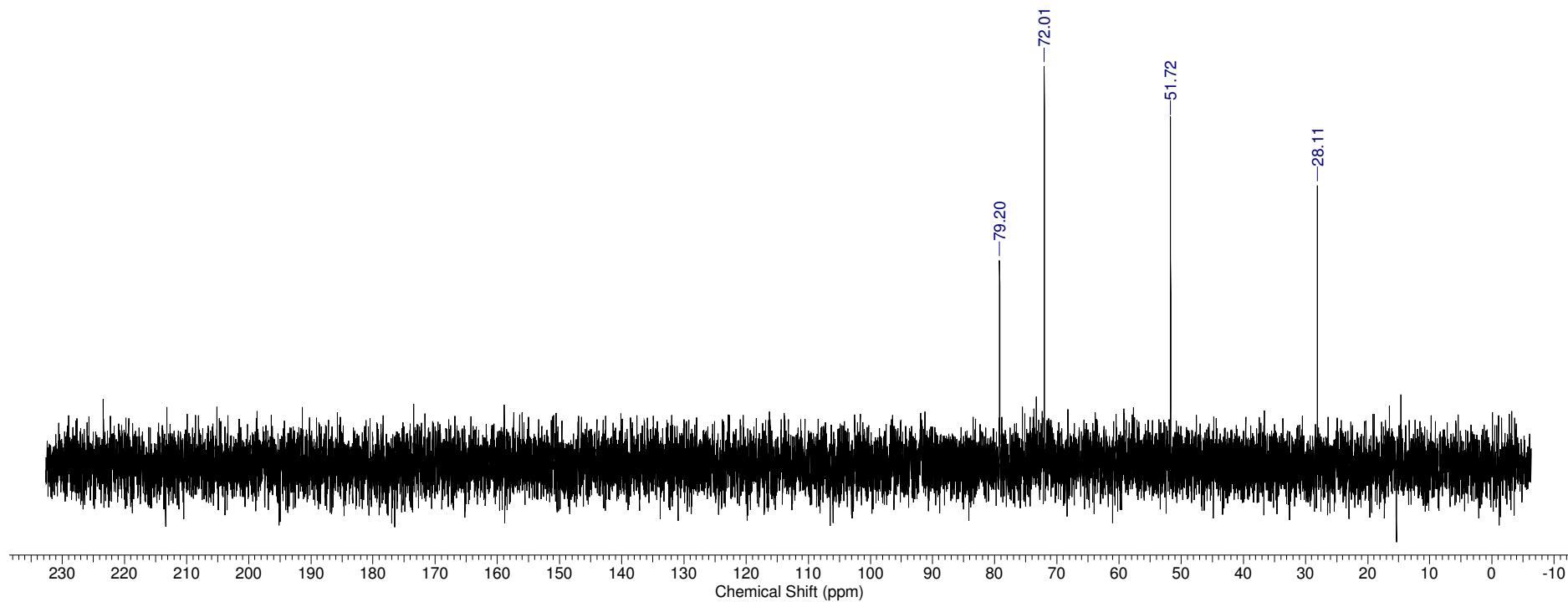


7.18 Espectro de RMN de ^1H da 1,3,5-N,N',N"- (propil-di-hidrogenofosfato)-triazinana (17) D_2O

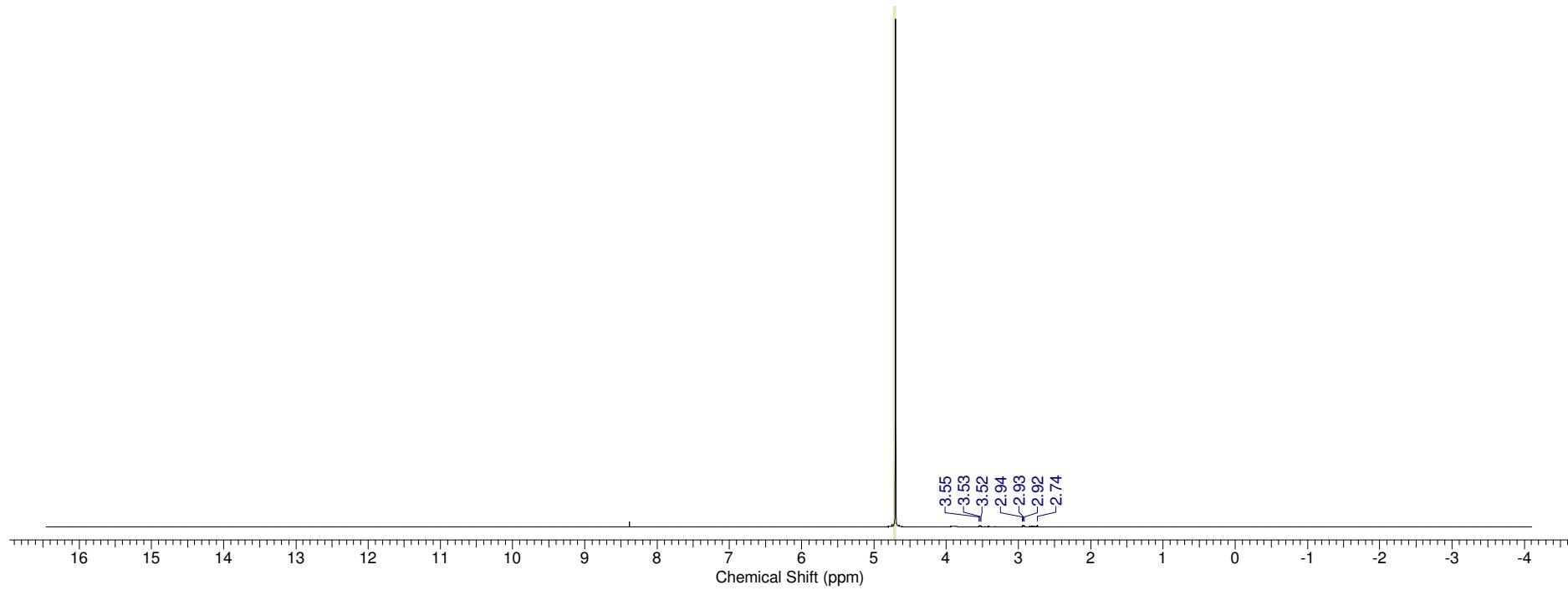


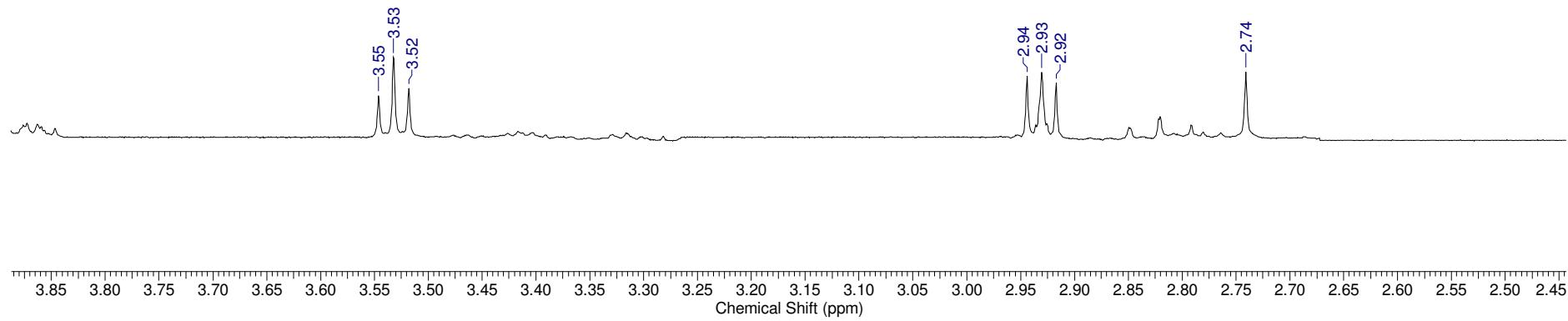


7.18.1 Espectro de RMN de ^{13}C da 1,3,5-N,N',N''-(propil-di-hidrogenofosfato)-triazinana (17) D_2O

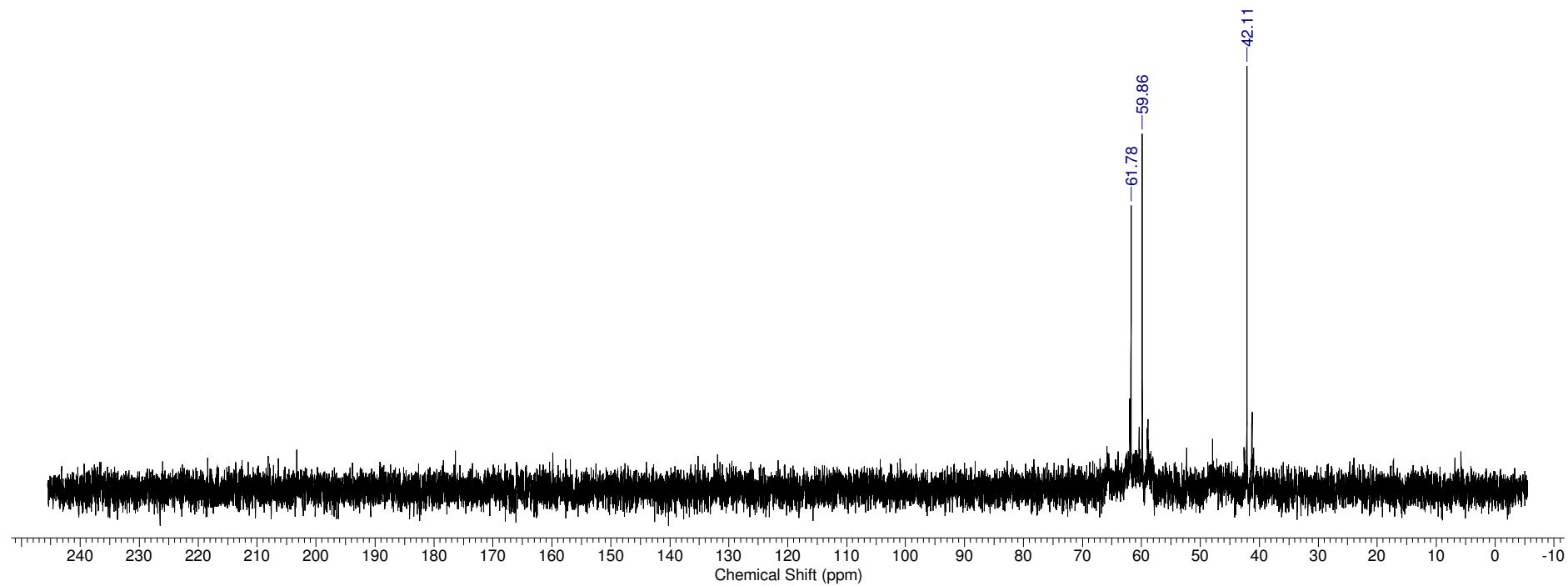


7.19 Espectro de RMN de ^1H do sal sódico da 1,3,5-N,N',N''-(etil-di-hidrogenofosfato)-triazinana (18) D_2O

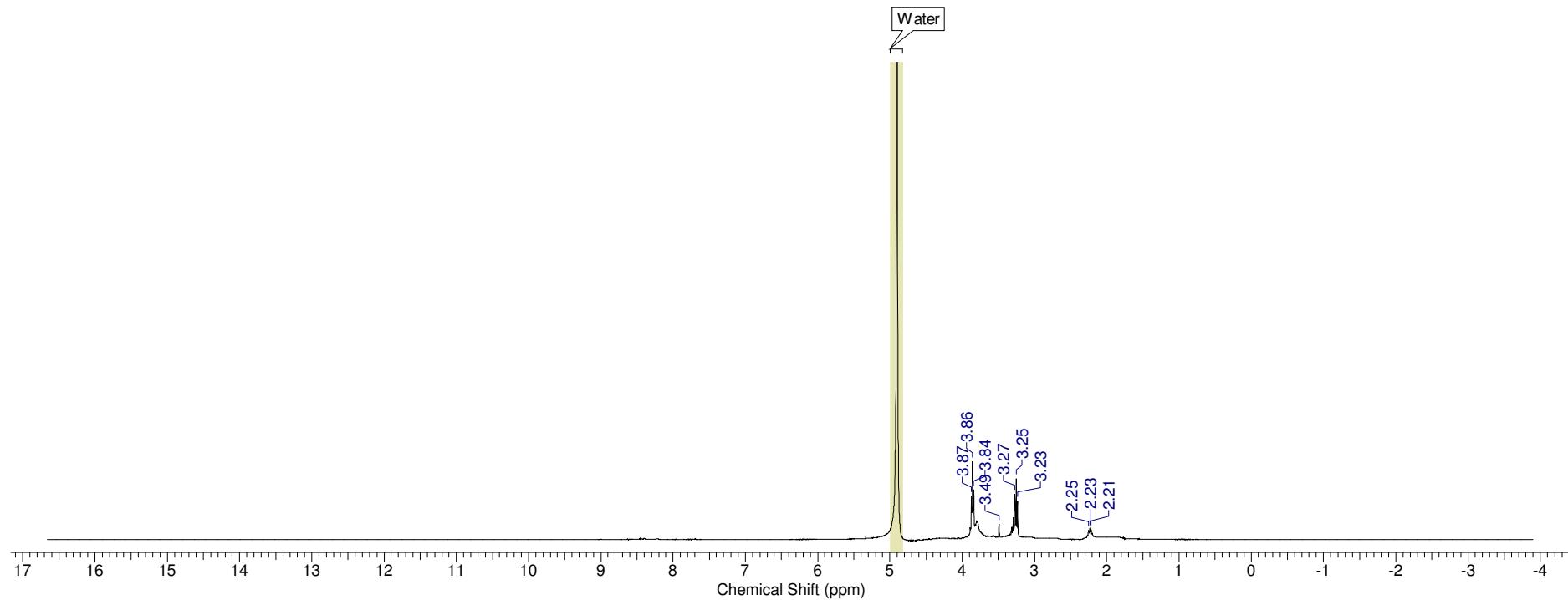


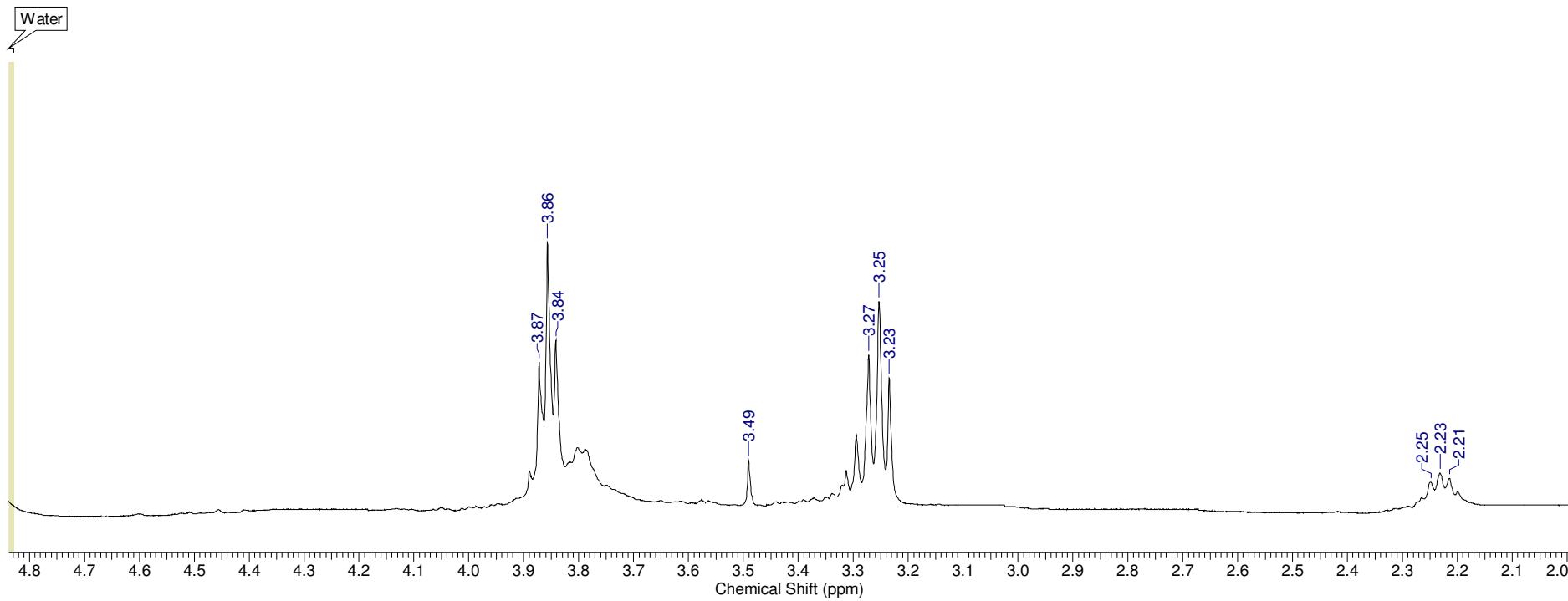


7.19.1 Espectro de RMN de ^{13}C do sal sódico da 1,3,5-N,N',N"- (etil-di-hidrogenofosfato)-triazinana (18) D_2O

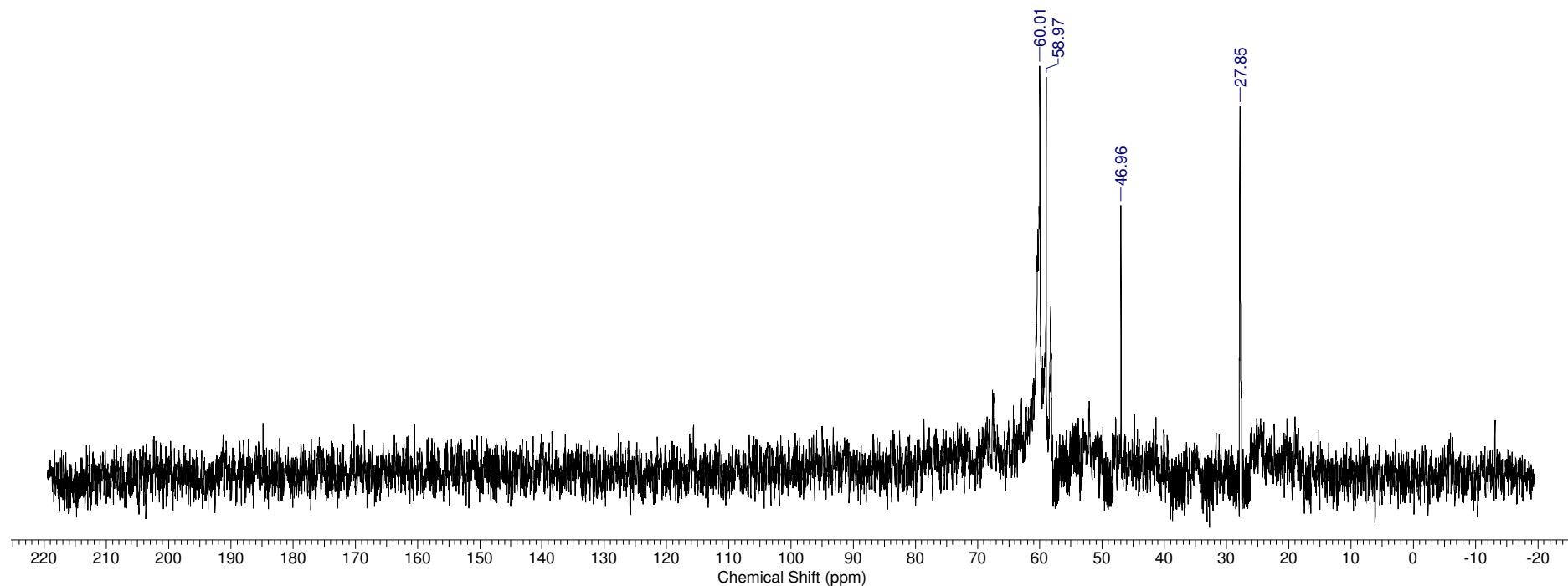


7.20 Espectro de RMN de ^1H do sal sódico da 1,3,5-N,N',N"- (propil-di-hidrogenofosfato)-triazinana (19) D_2O

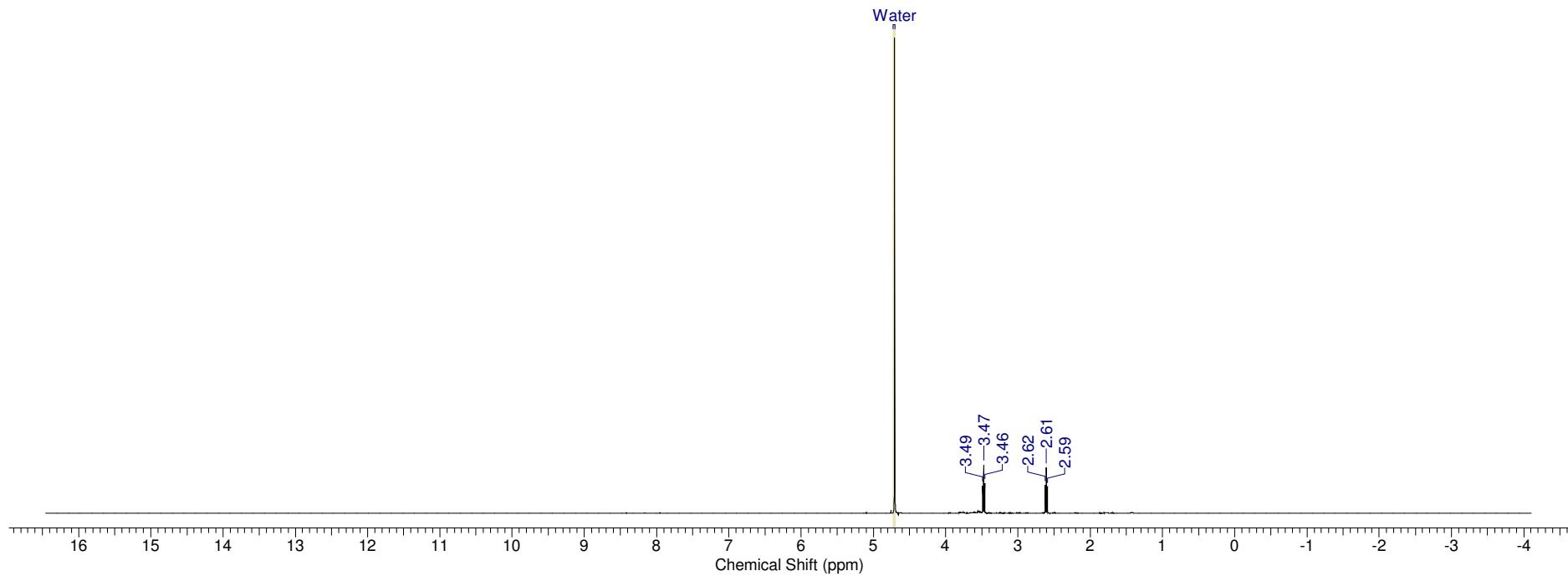




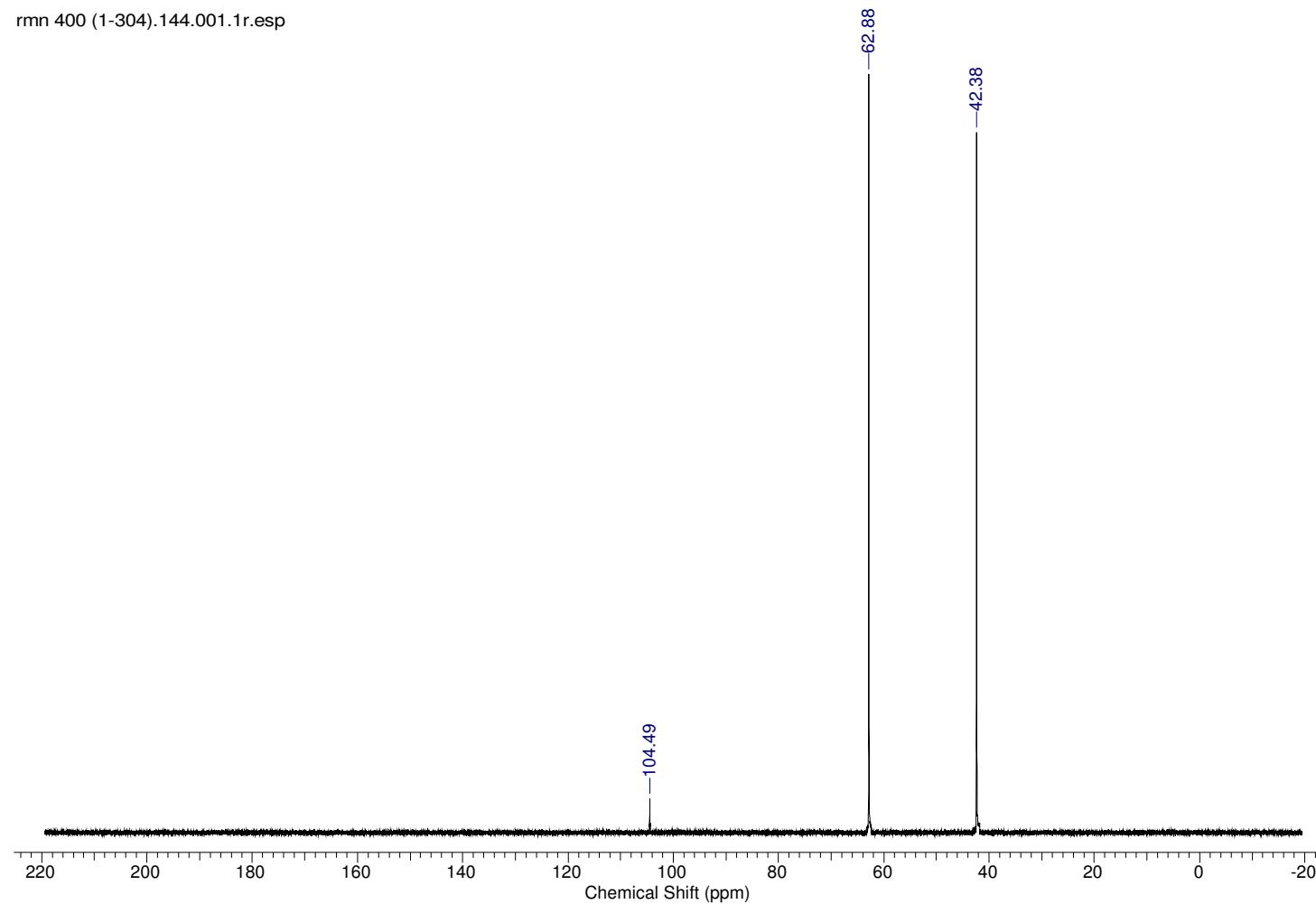
7.20.1 Espectro de RMN de ^1H do sal sódico da 1,3,5-N,N',N"- (propil-di-hidrogenofosfato)-triazinana (19) D_2O



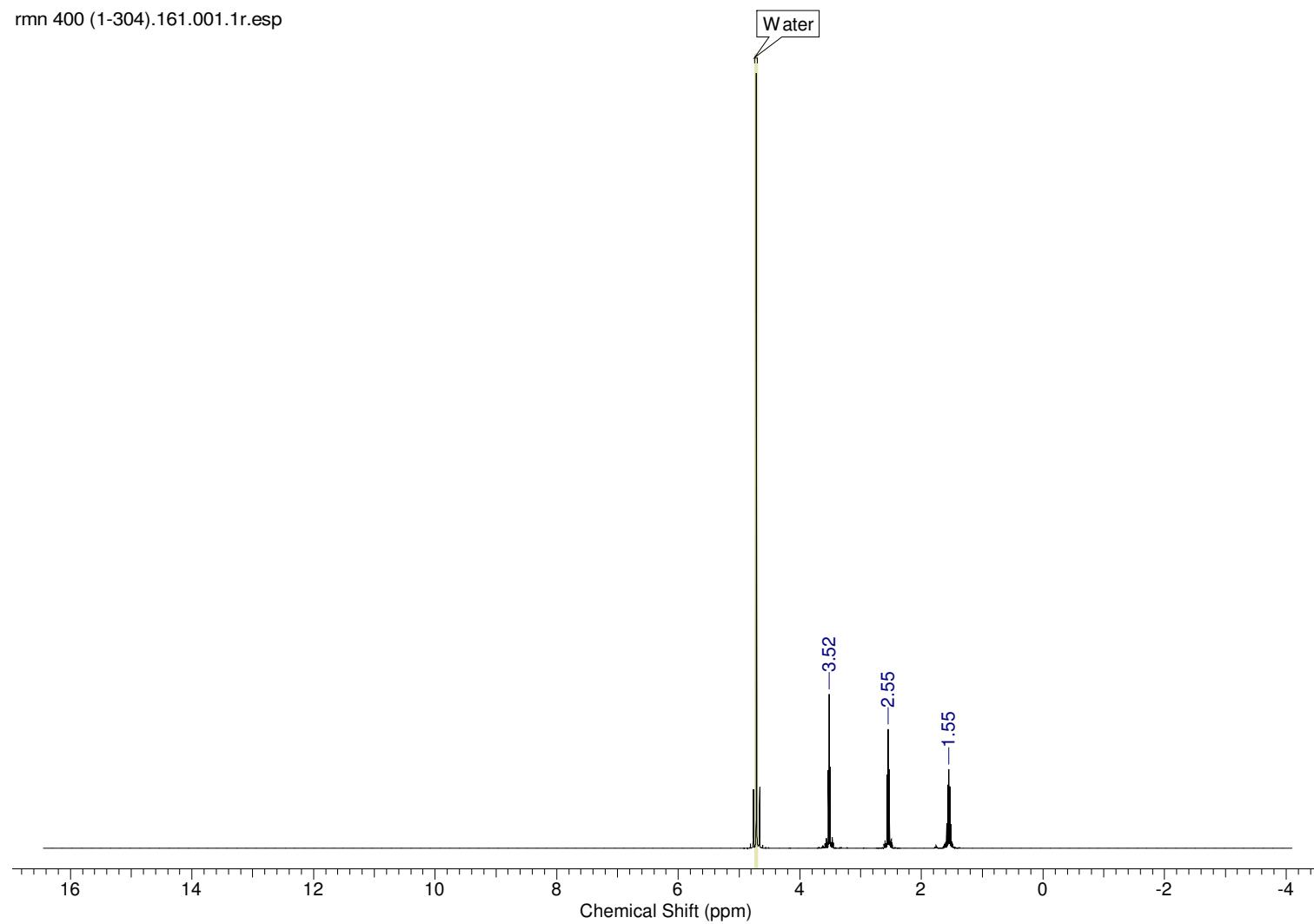
7.21 Espectro de RMN de ^1H da 2,4,6-triamino-(2,2',2''- trietanol)-1,3,5-Triazina (21) D_2O



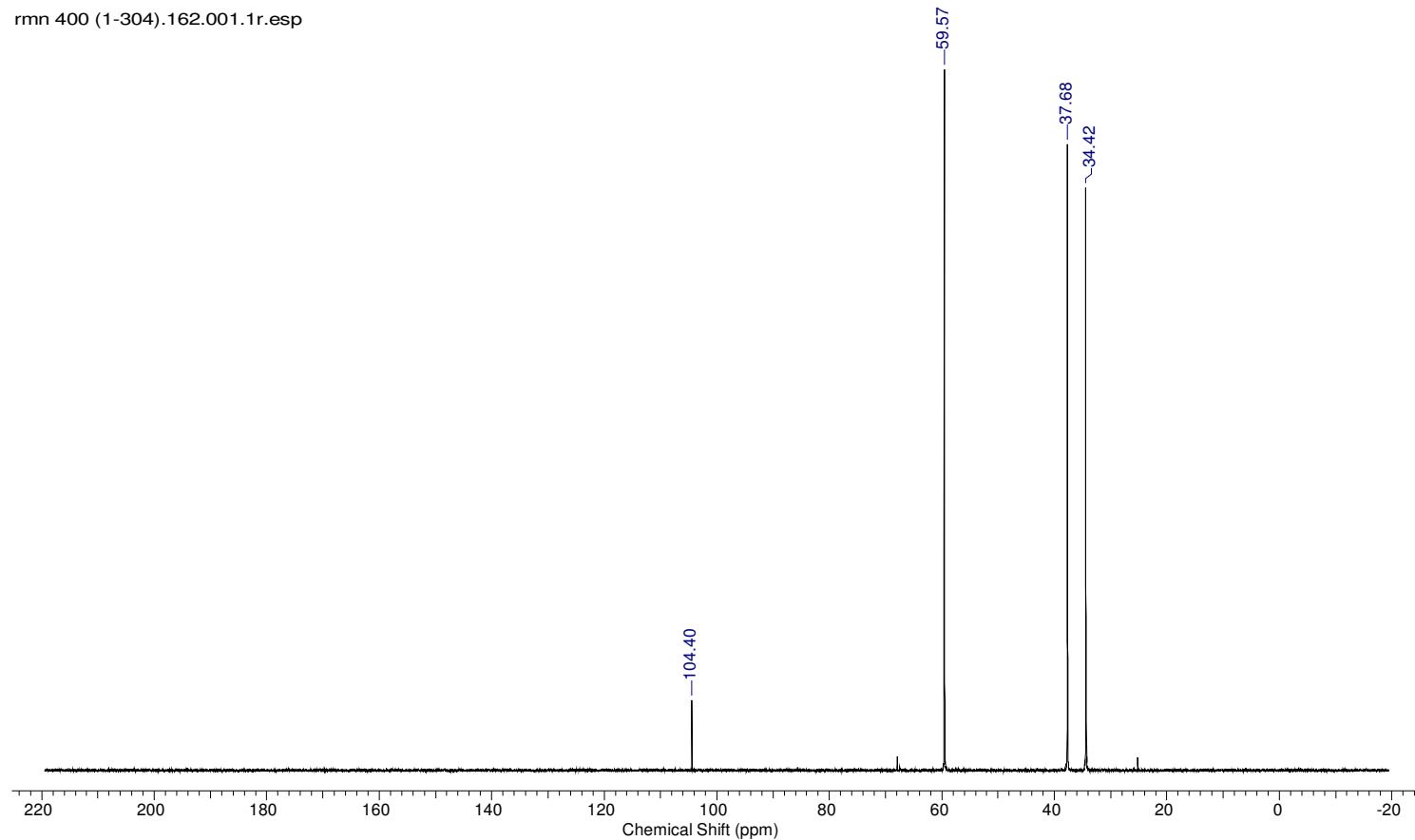
7.21.1 Espectro de RMN de ^{13}C da 2,4,6-triamino-(2,2',2''- trietanol)-1,3,5-Triazina (21) D_2O



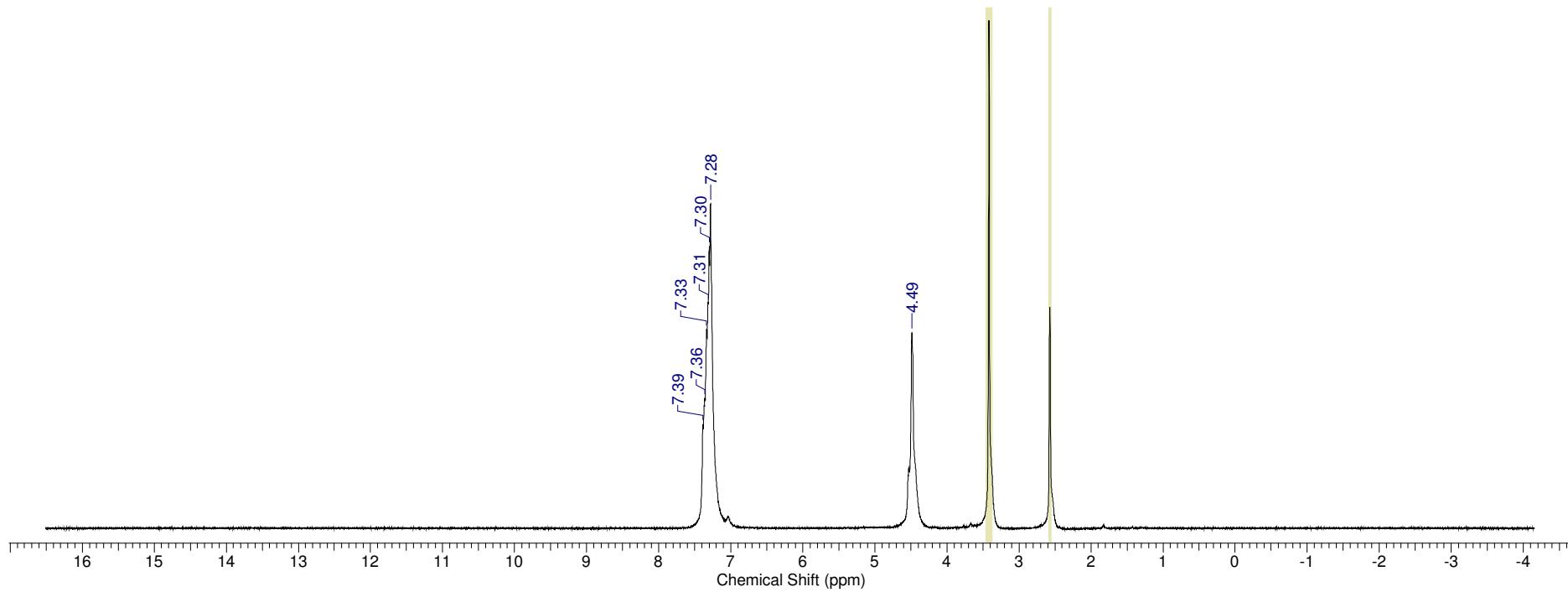
7.22 Espectro de RMN de ^1H da 2,4,6-triamino-(3,3',3''- tripropanol)-1,3,5-Triazina (22) D_2O



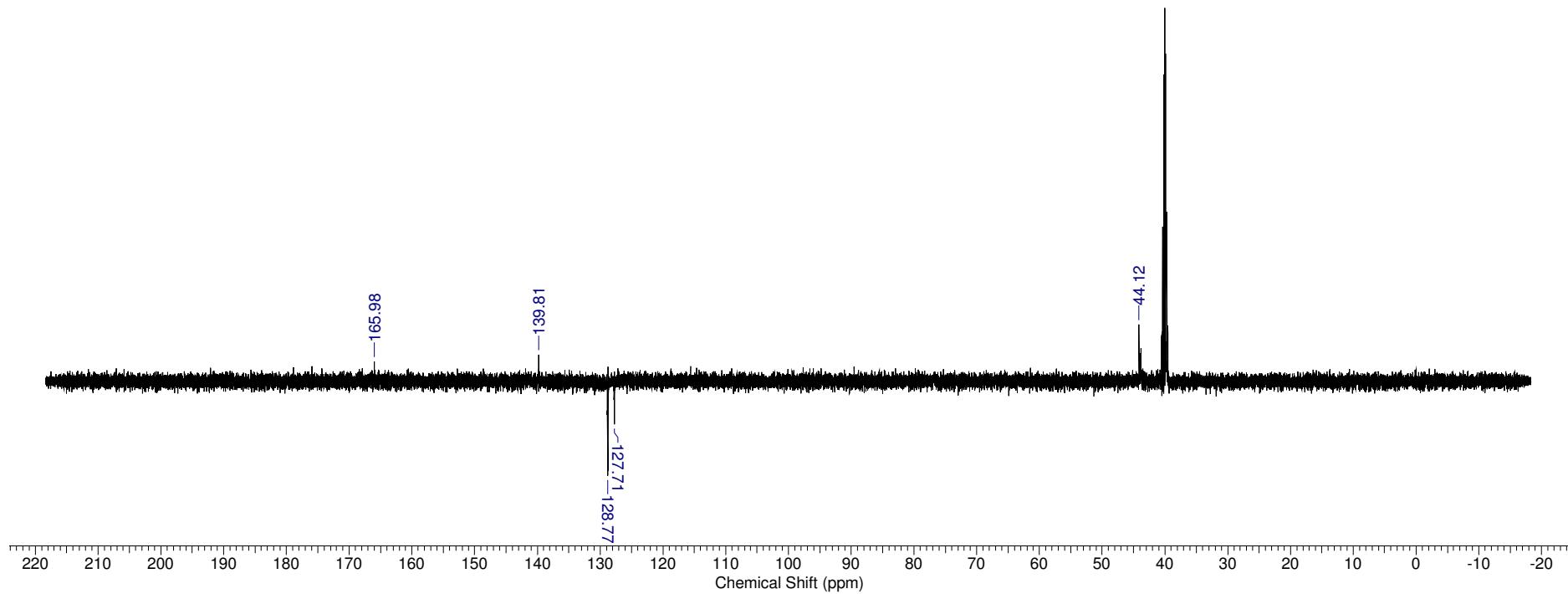
7.22.1 Espectro de RMN de ^{13}C da 2,4,6-triamino-(3,3',3''- tripropanol)-1,3,5-Triazina (22) D_2O

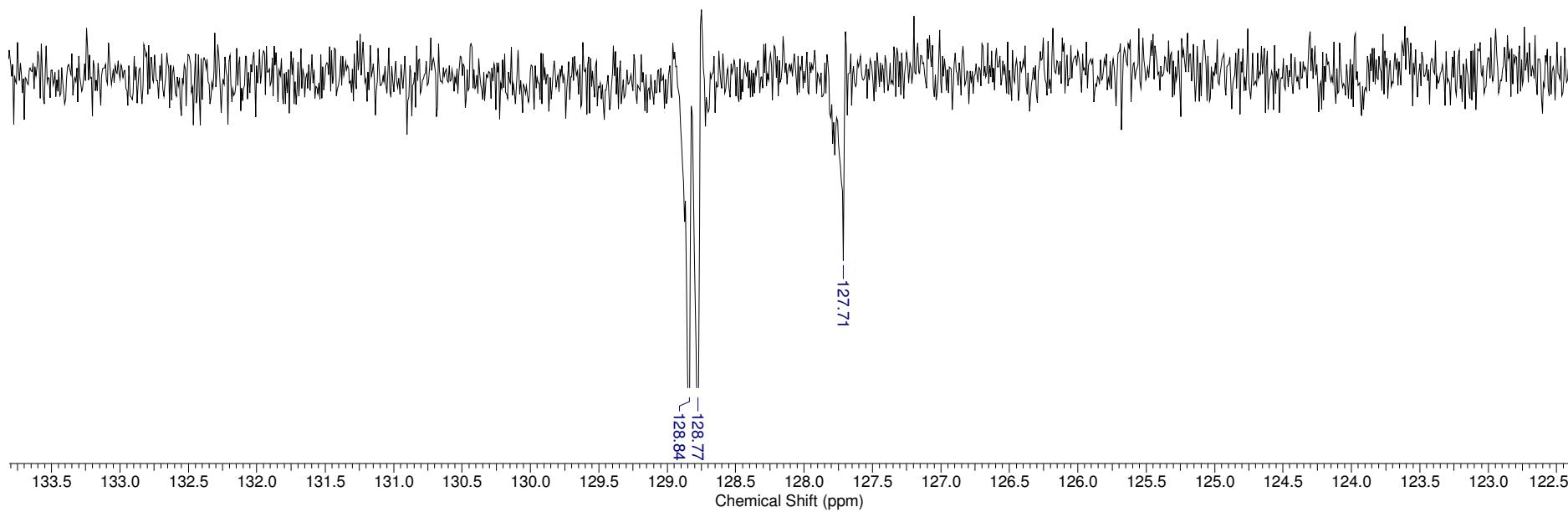


7.23 Espectro de RMN de ^1H da 2,4,6-triamino-N,N',N"-tribenzil-1,3,5-Triazina (23) DMSO

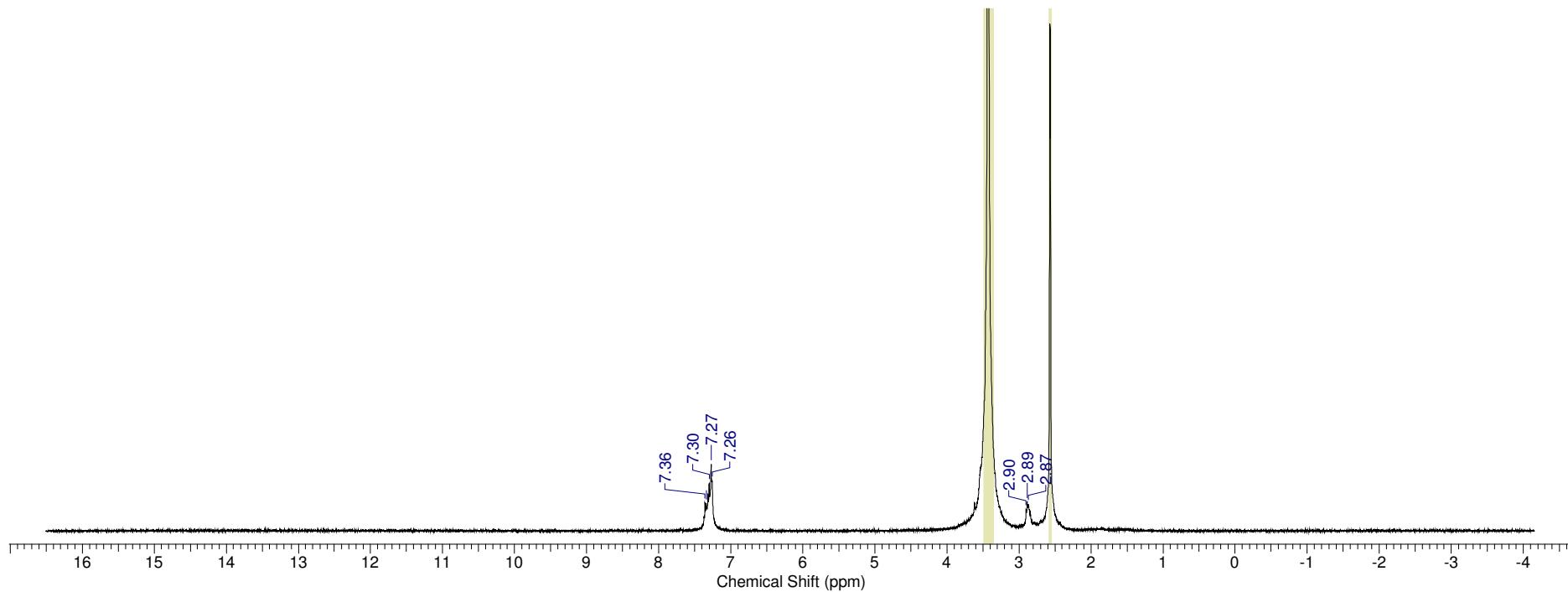


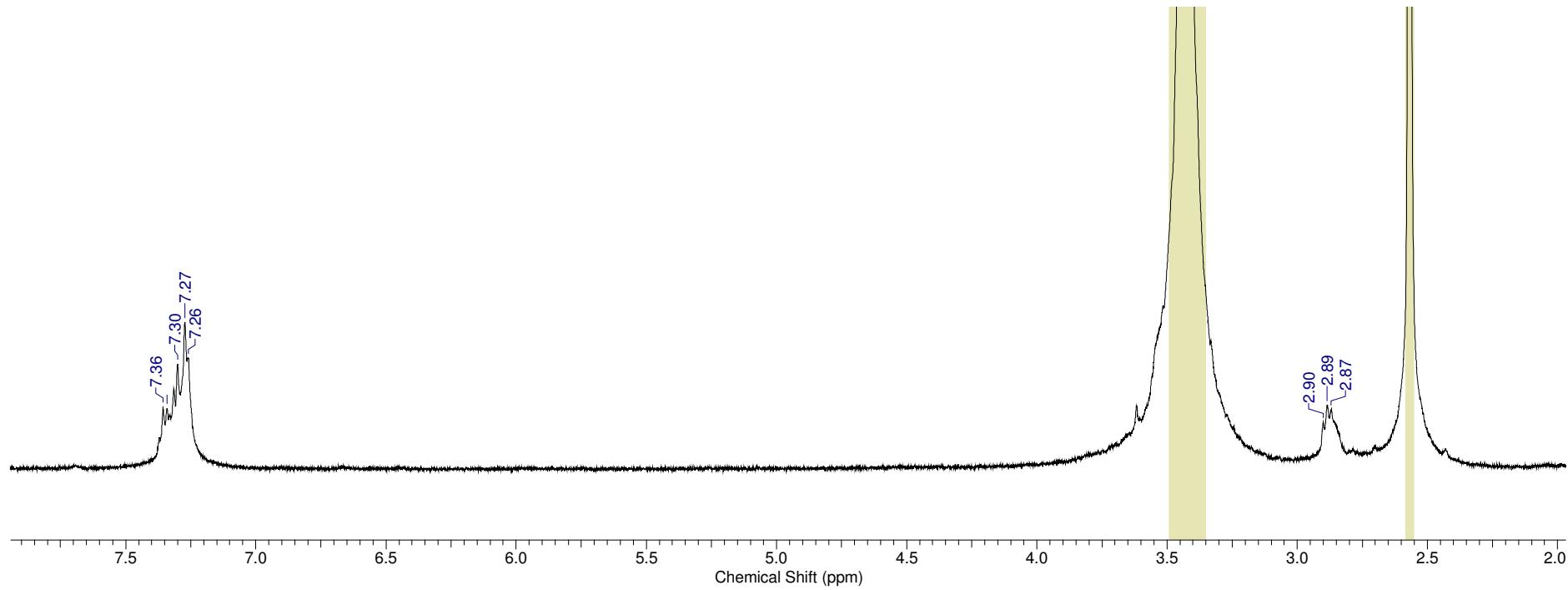
7.23.1 Espectro de RMN de ^{13}C da 2,4,6-triamino-N,N',N"- tribenzil-1,3,5-Triazina (23) DMSO



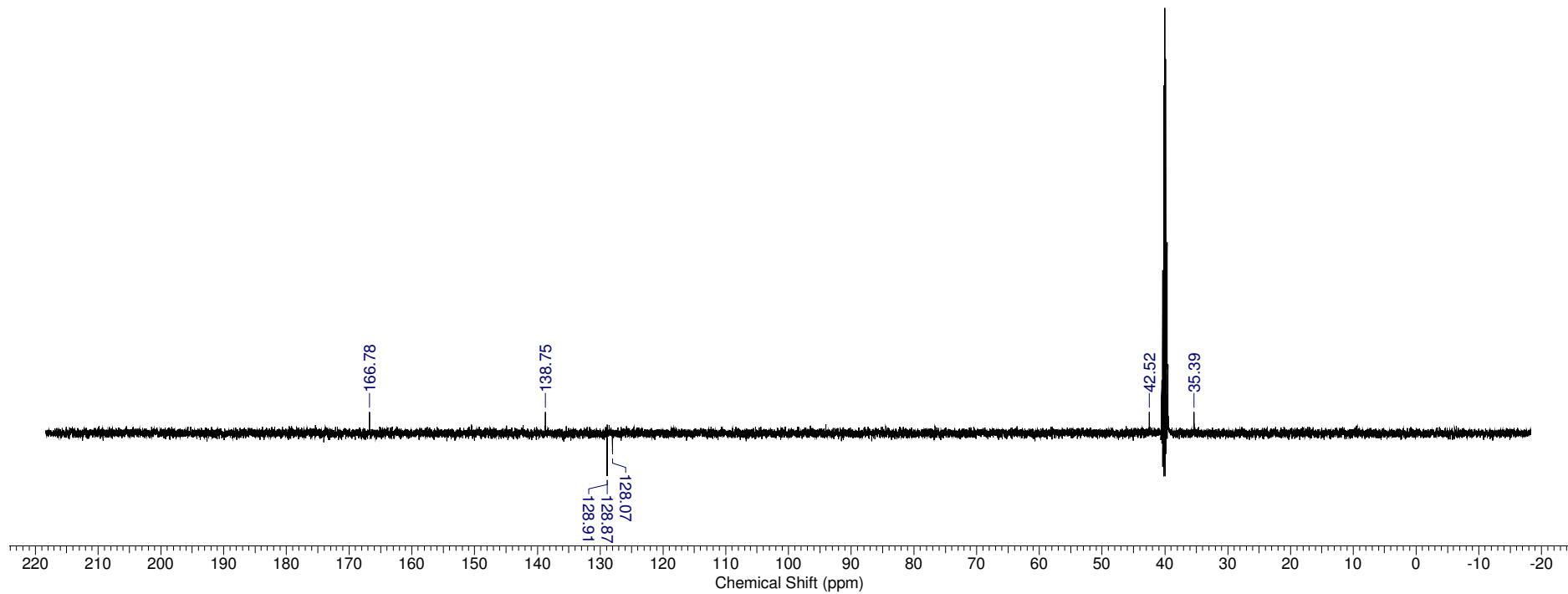


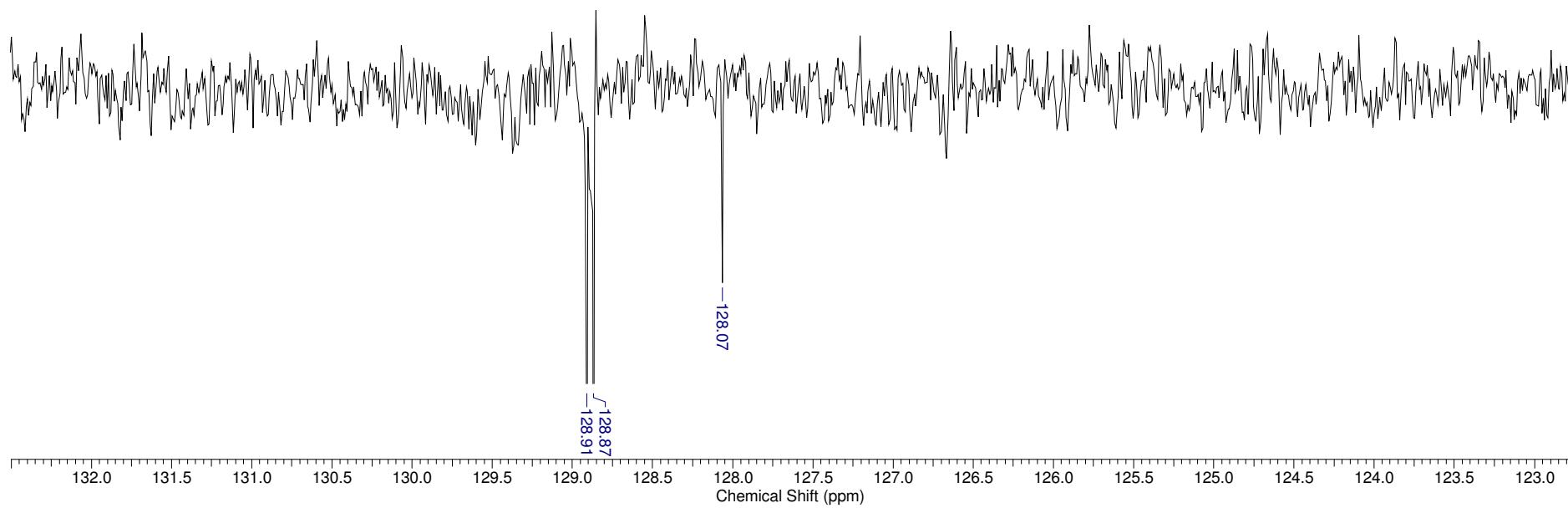
7.24 Espectro de RMN de ^1H da 2,4,6-triamino-N,N',N''-trifenetil-1,3,5-Triazina (24) DMSO



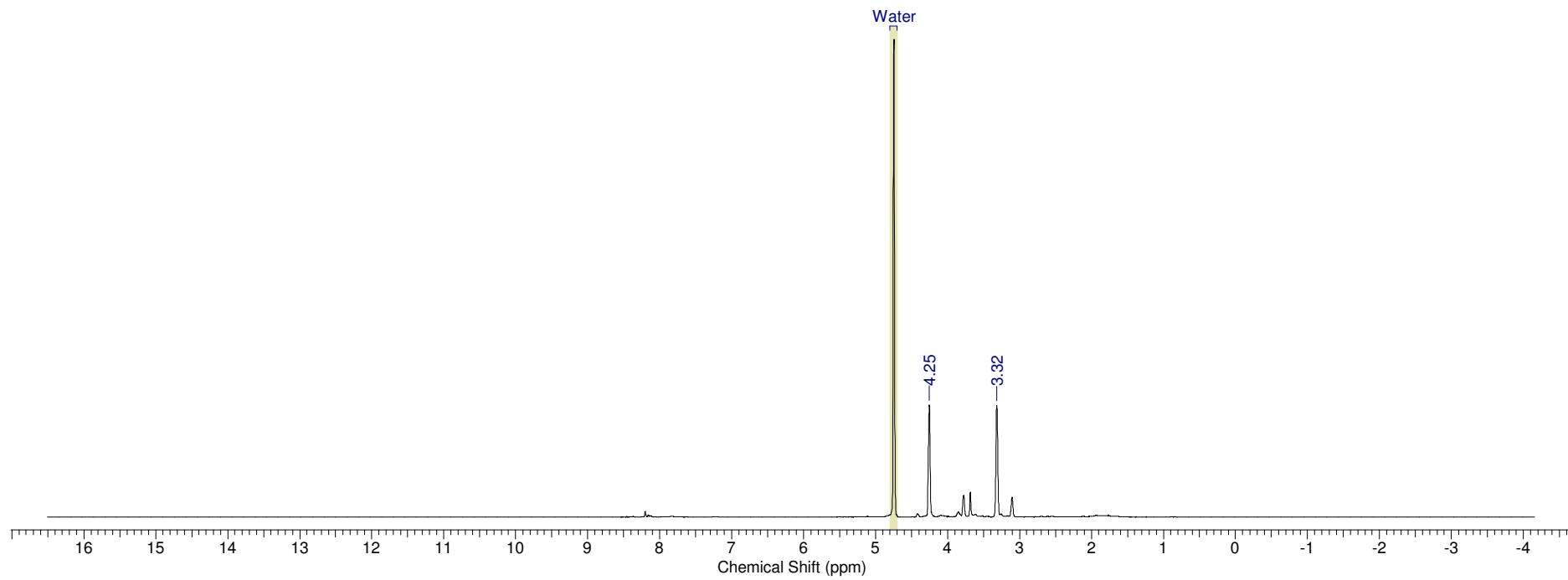


7.24.1 Espectro de RMN de ^{13}C da 2,4,6-triamino-N,N',N"-trifenetil-1,3,5-Triazina (24) DMSO

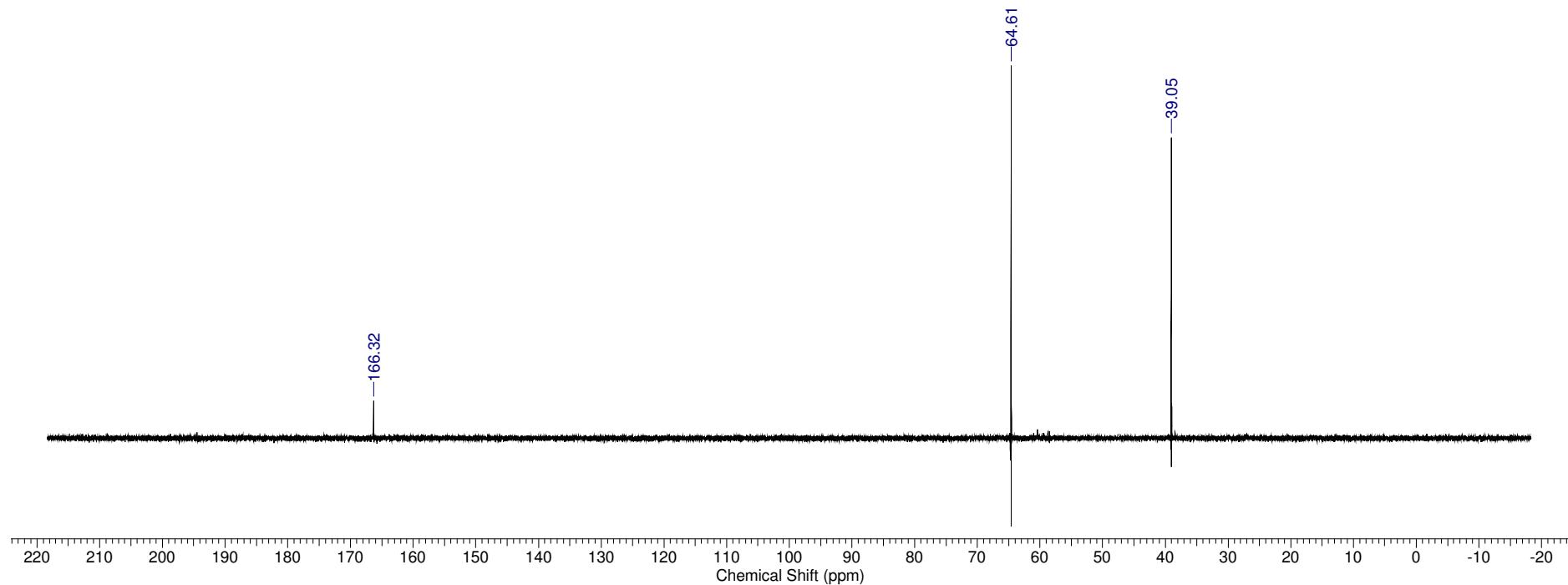




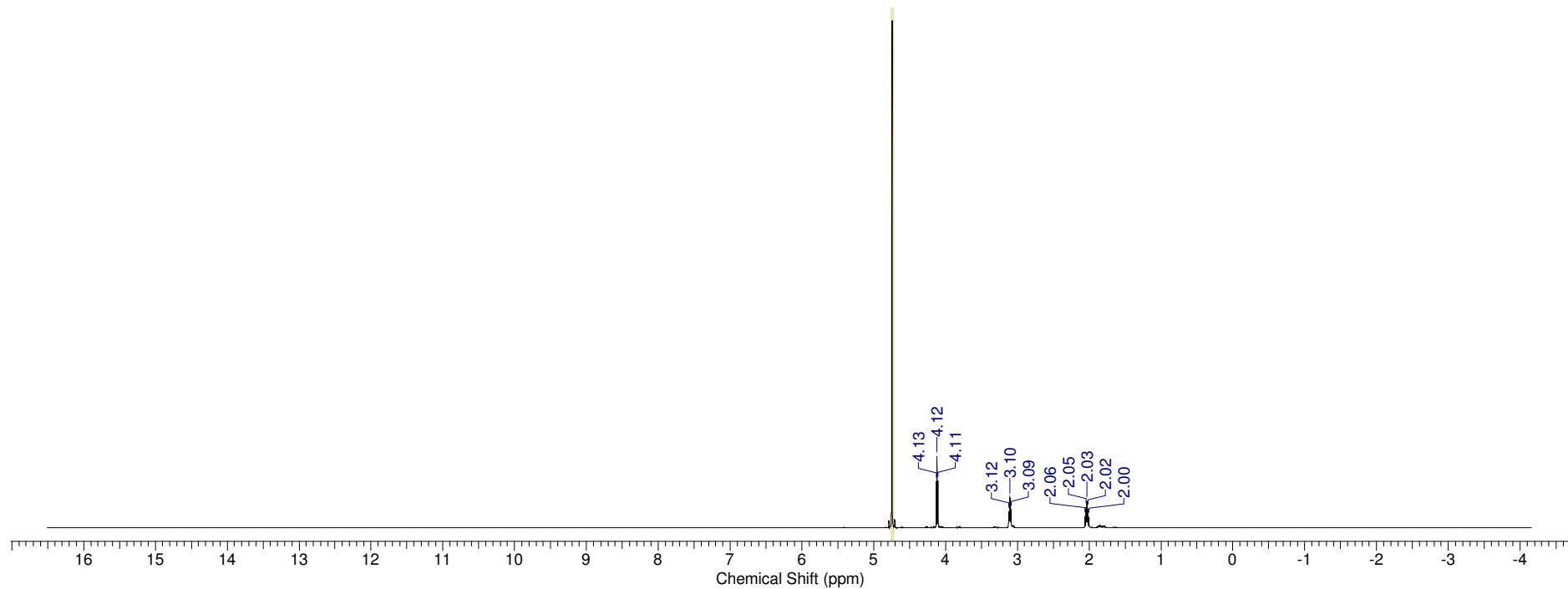
7.25 Espectro de RMN de ^1H da 2,4,6-triamino-(trietyl-hidrogenosulfato)-1,3,5-Triazina (25) D_2O



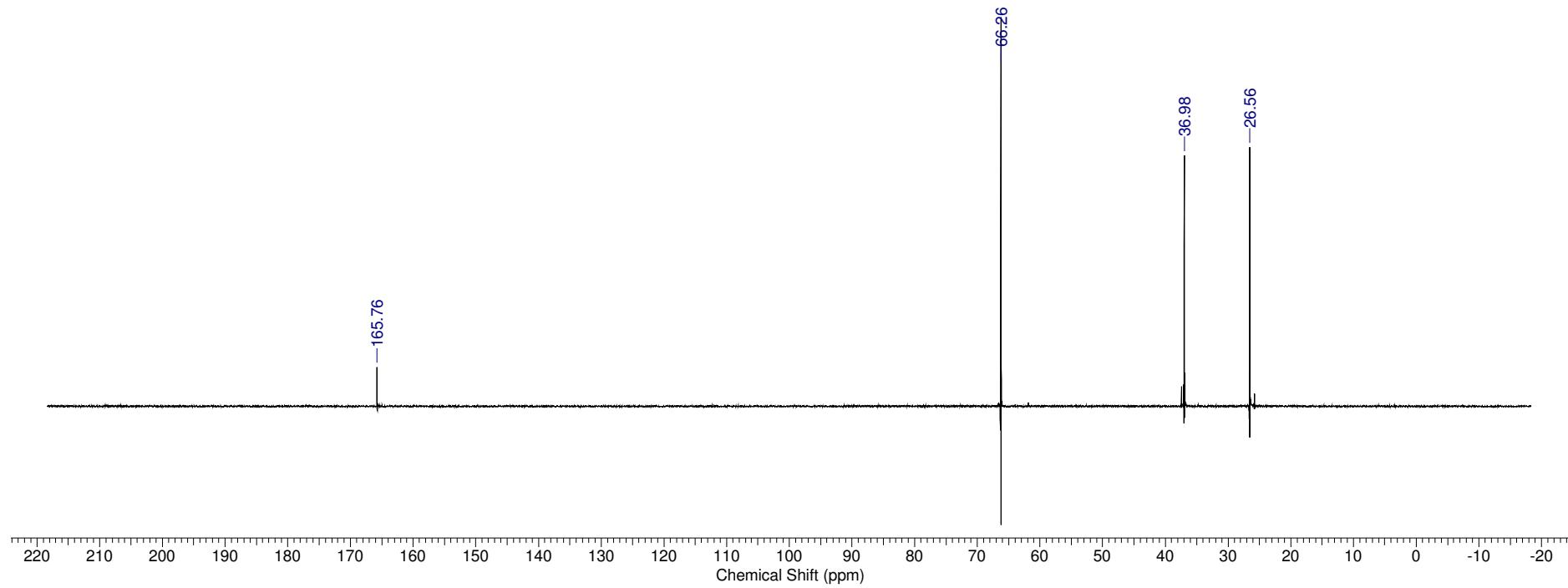
7.25.1 Espectro de RMN de ^{13}C da 2,4,6-triamino-(trietyl-hidrogenosulfato)-1,3,5-Triazina (25) D_2O



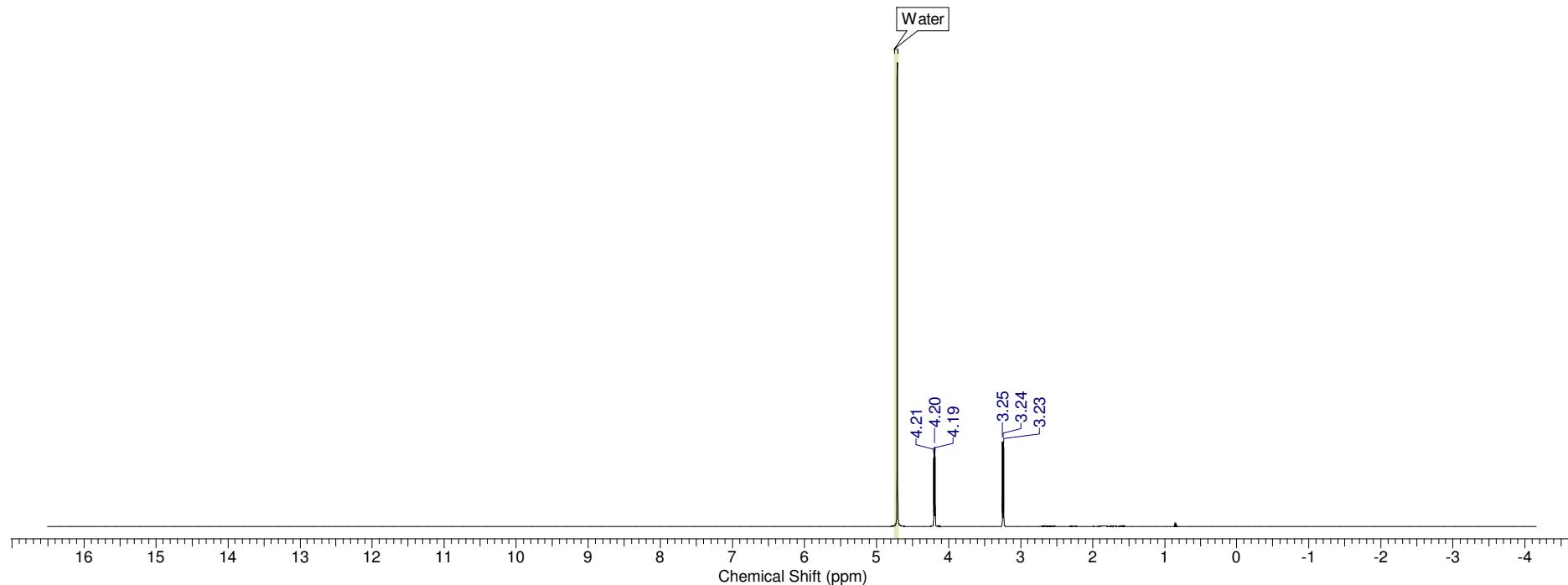
7.26 Espectro de RMN de ^1H da 2,4,6-triamino-(tripropil-hidrogenosulfato)-1,3,5-Triazina (26) D_2O

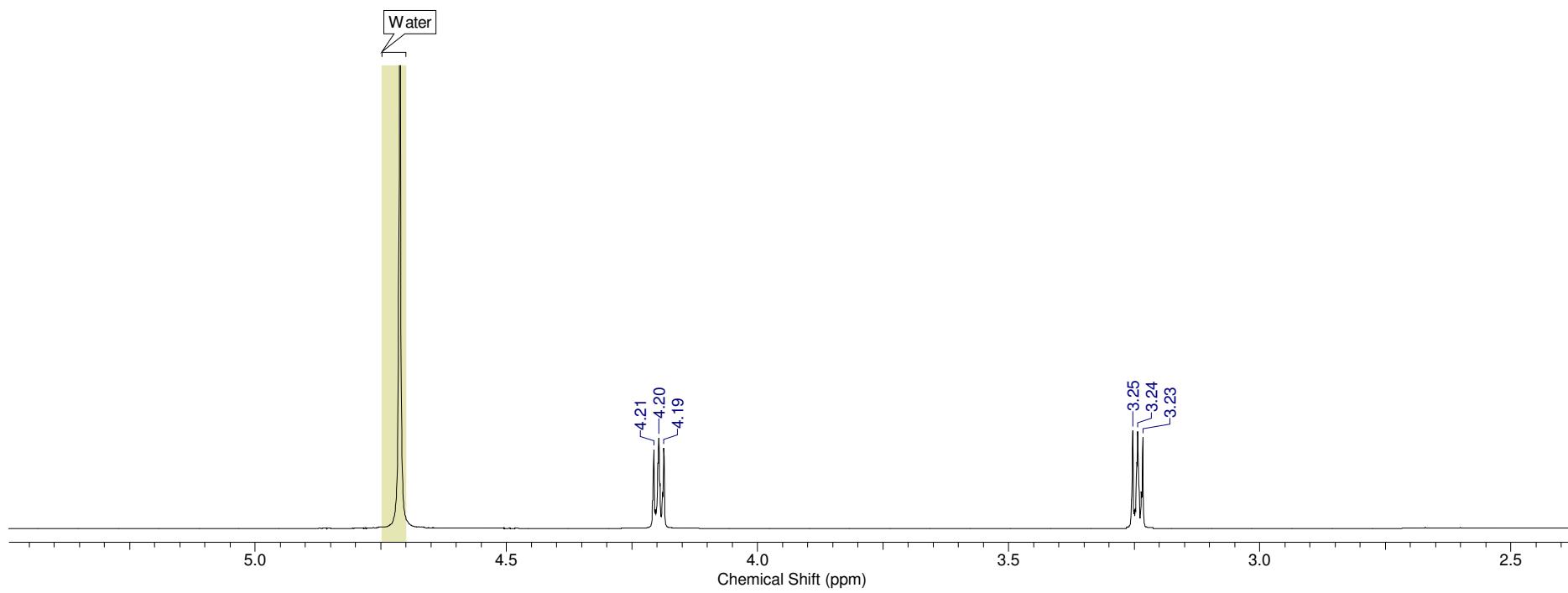


7.26.1 Espectro de RMN de ^{13}C da 2,4,6-triamino-(tripropil-hidrogenosulfato)-1,3,5-Triazina (26) D_2O

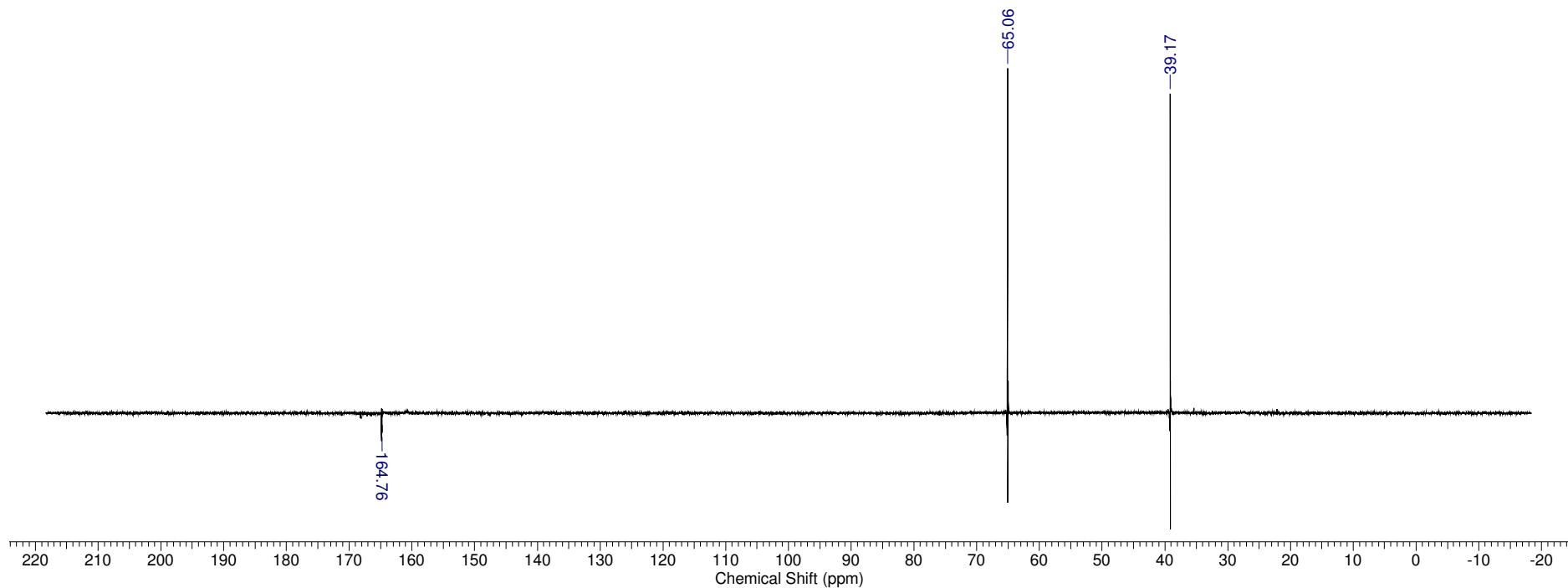


7.27 Espectro de RMN de ^1H do sal de sódio da 2,4,6-triamino-(trietyl-hidrogenosulfato)-1,3,5-Triazina (27) D_2O

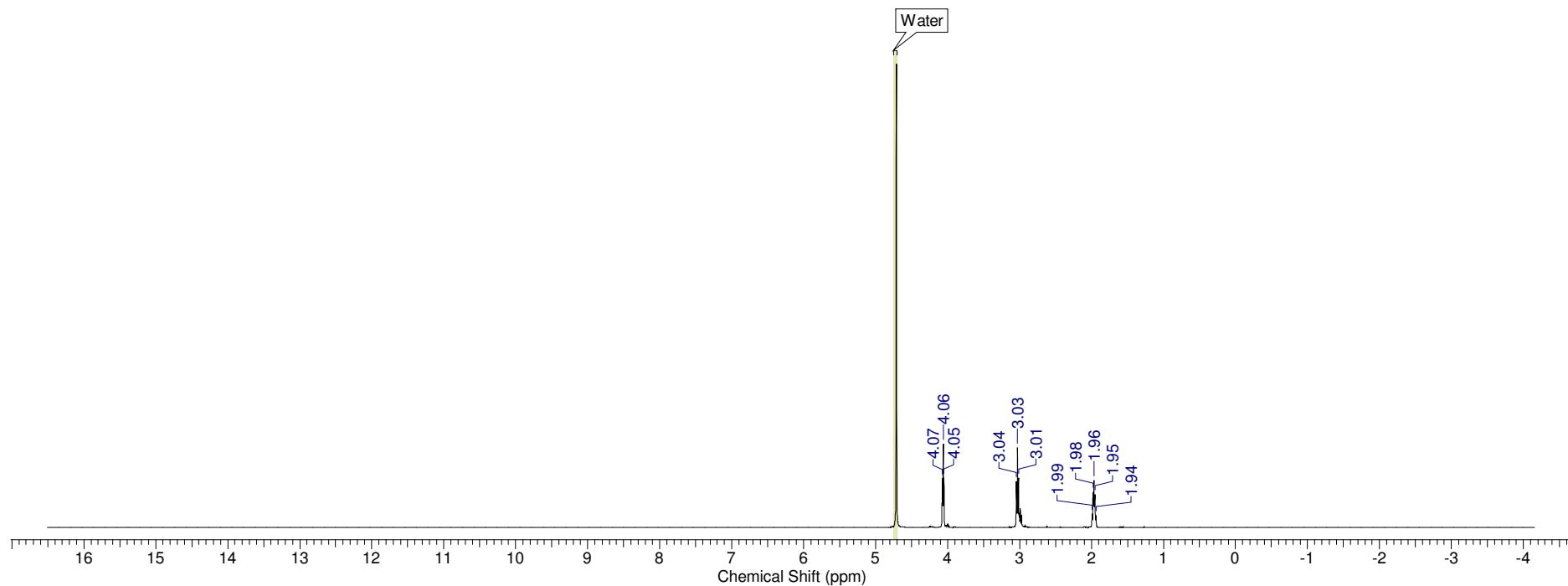


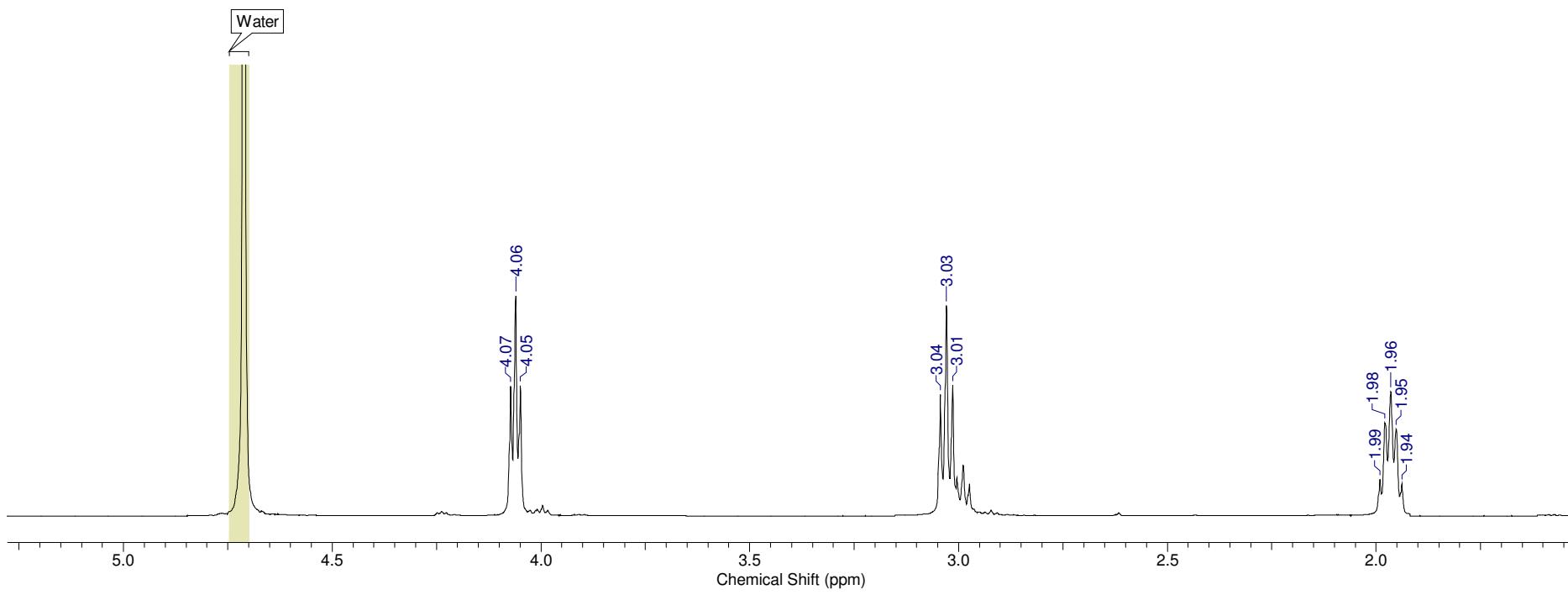


7.27.1 Espectro de RMN de ^{13}C do sal de sódio da 2,4,6-triamino-(trietyl-hidrogenosulfato)-1,3,5-Triazina (27) D_2O

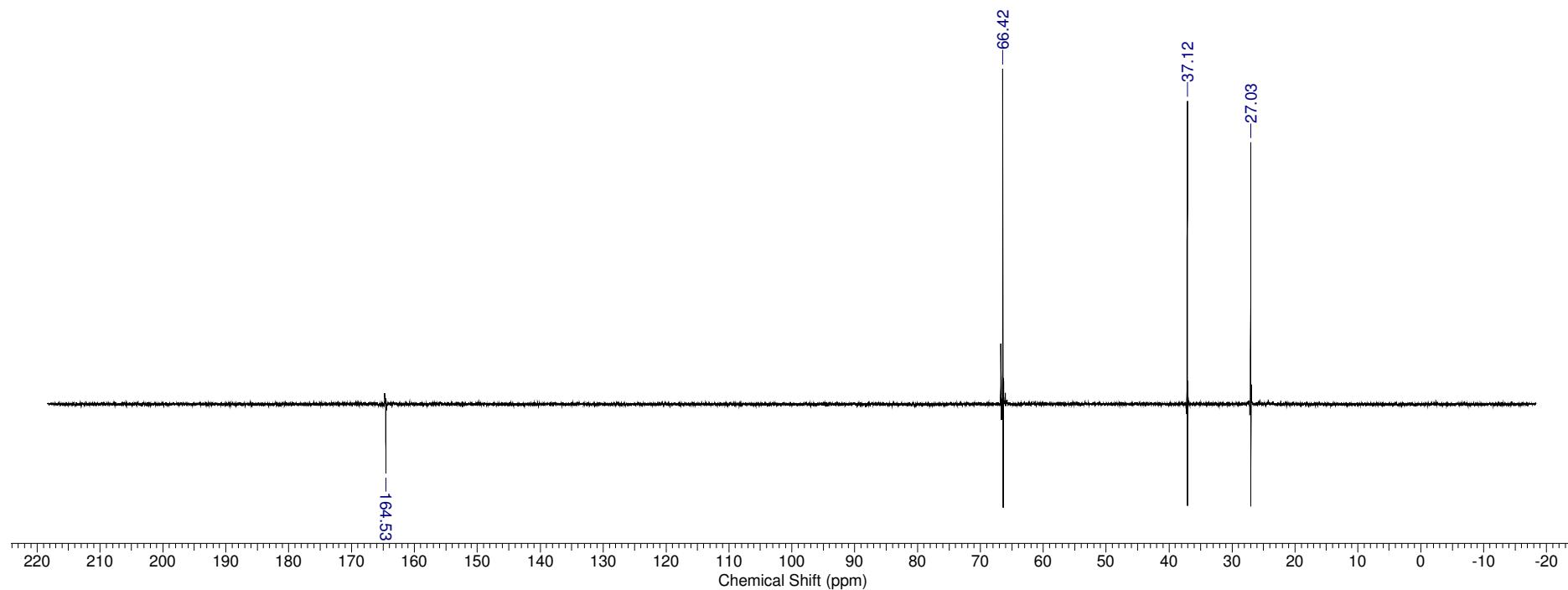


7.28 Espectro de RMN de ^1H do sal de sódio da 2,4,6-triamino-(tripropil-hidrogenosulfato)-1,3,5-Tiazina (28) D_2O

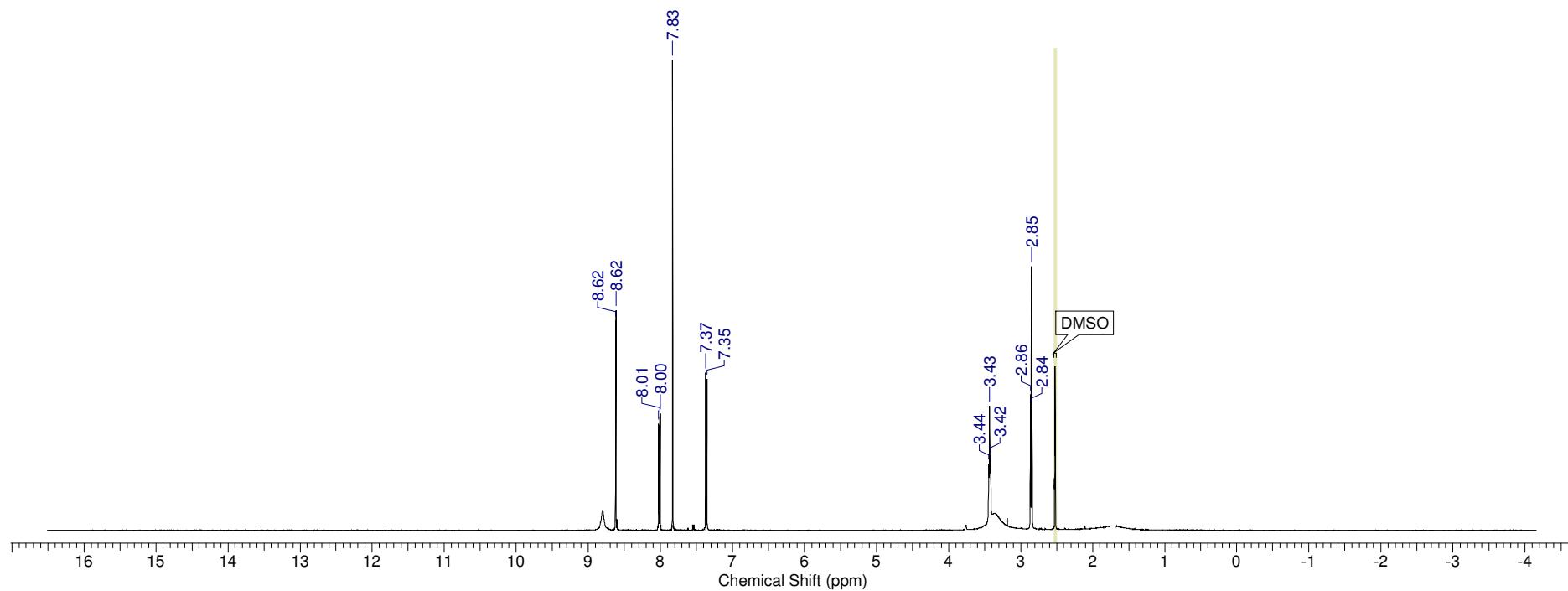


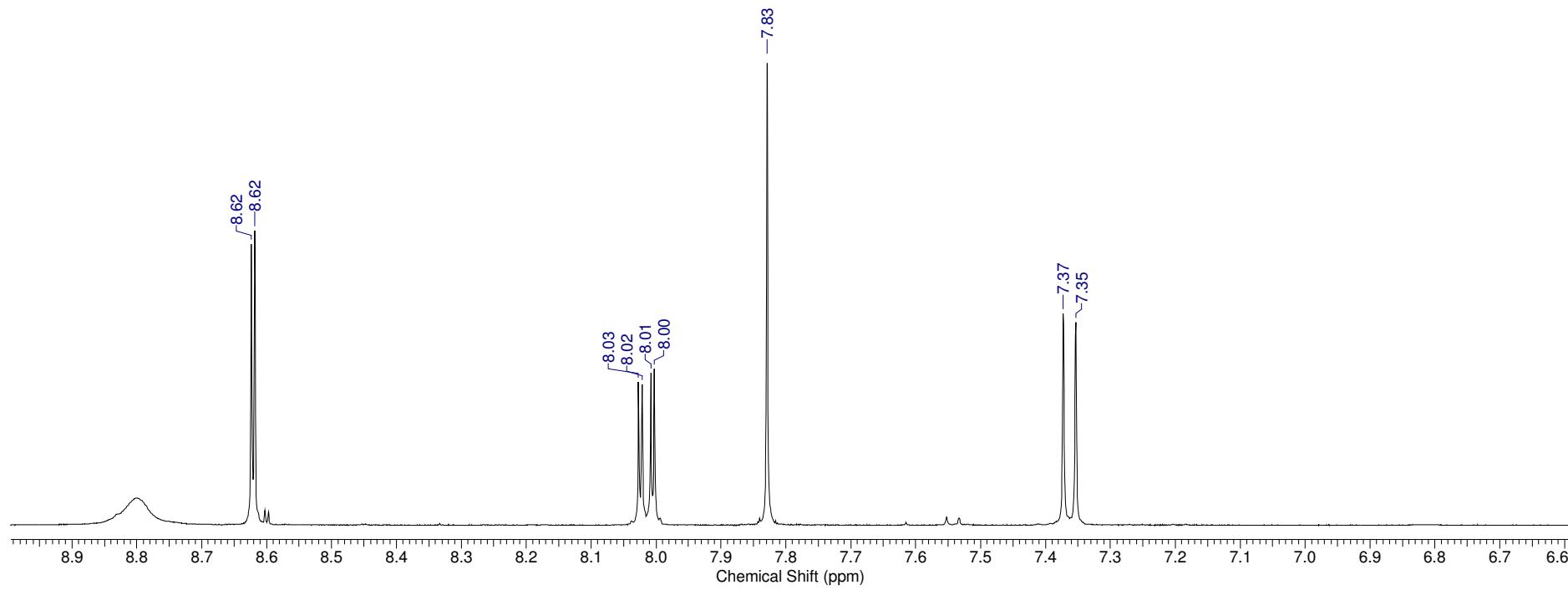


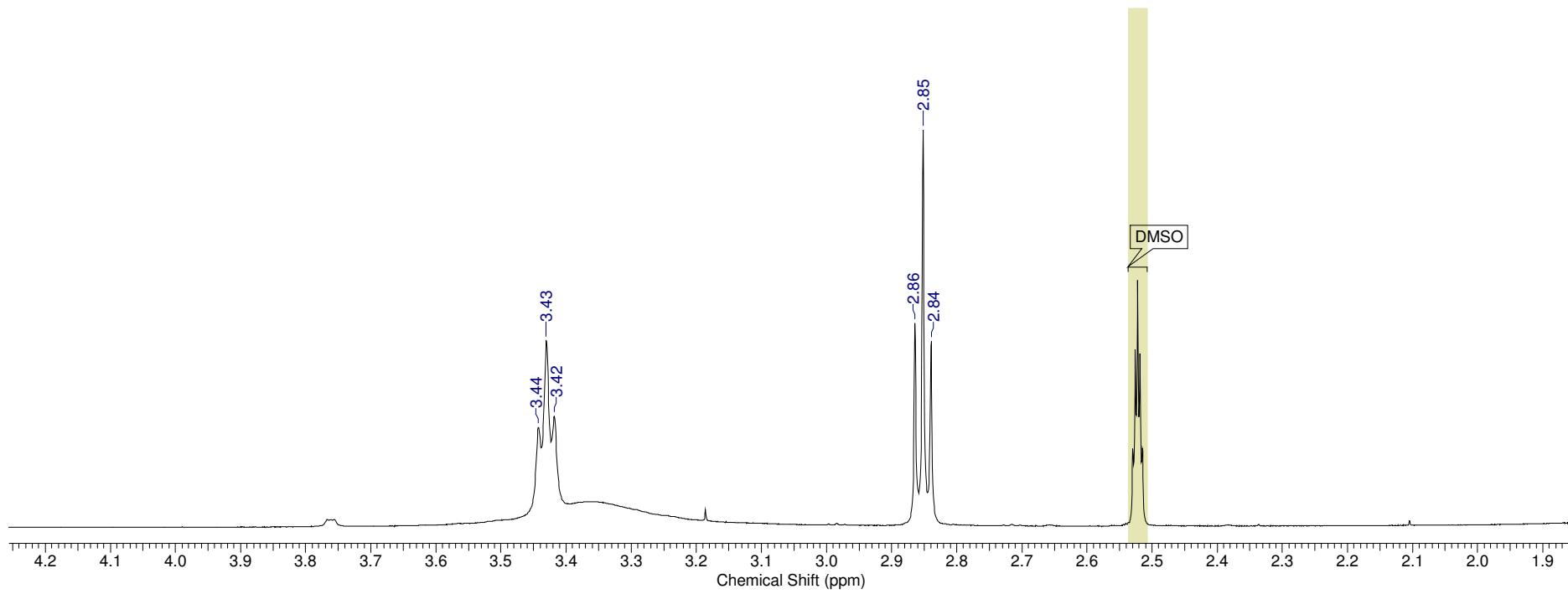
7.28.1 Espectro de RMN de ^{13}C do sal de sódio da 2,4,6-triamino-(tripropil-hidrogenosulfato)-1,3,5-Triazina (28) D_2O



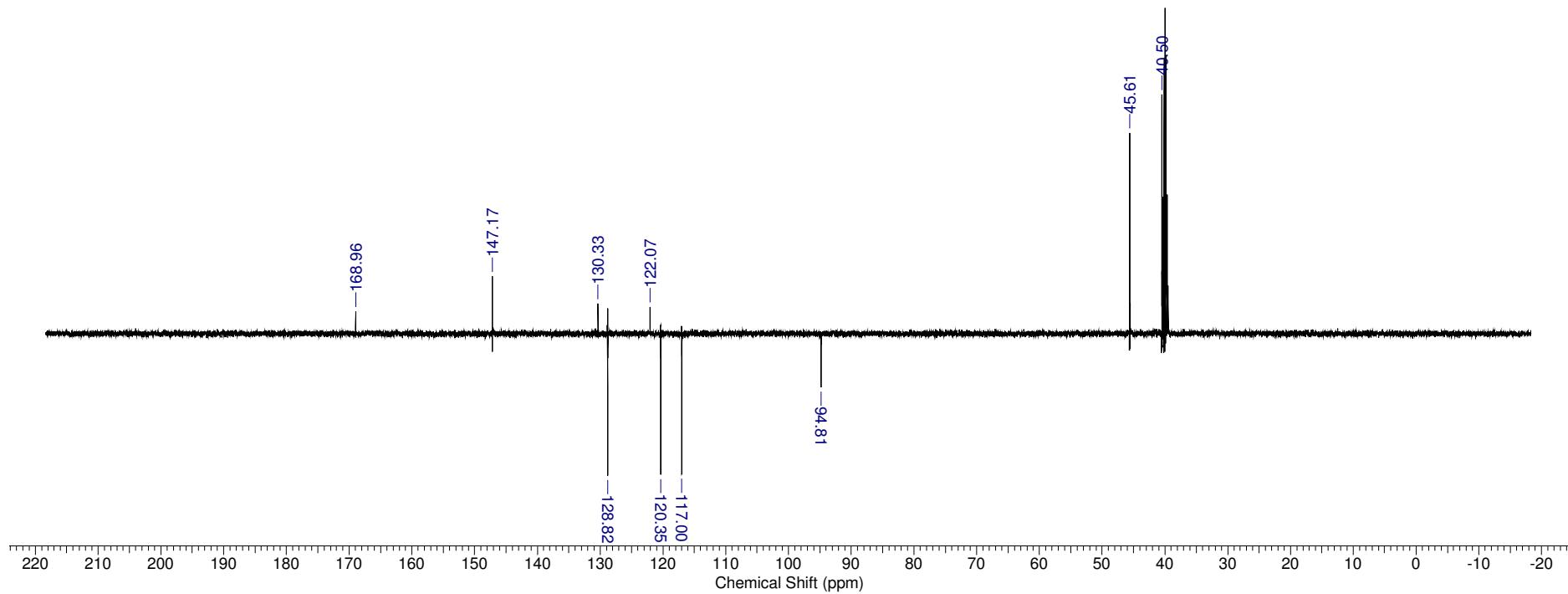
7.29 Espectro de RMN de ^1H da 3-{4-[(2-aminoetil)amino]-3-nitrofenil}-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olato (35) DMSO



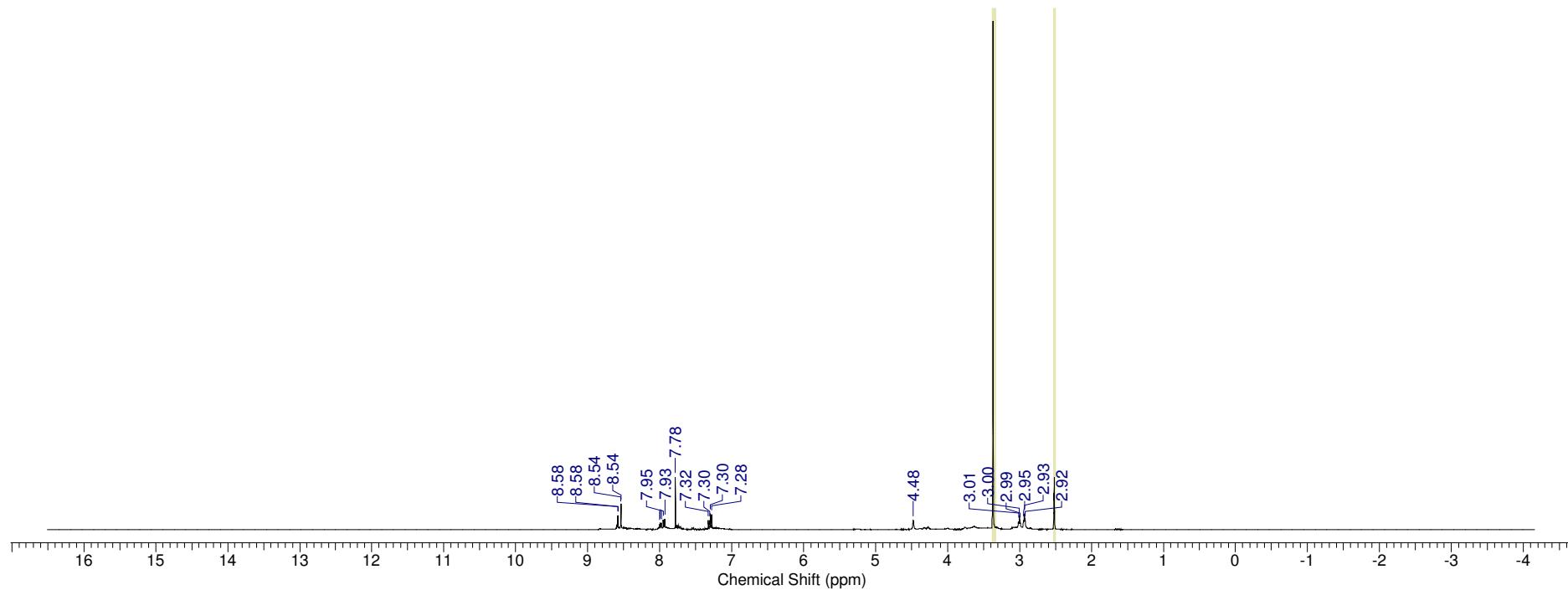


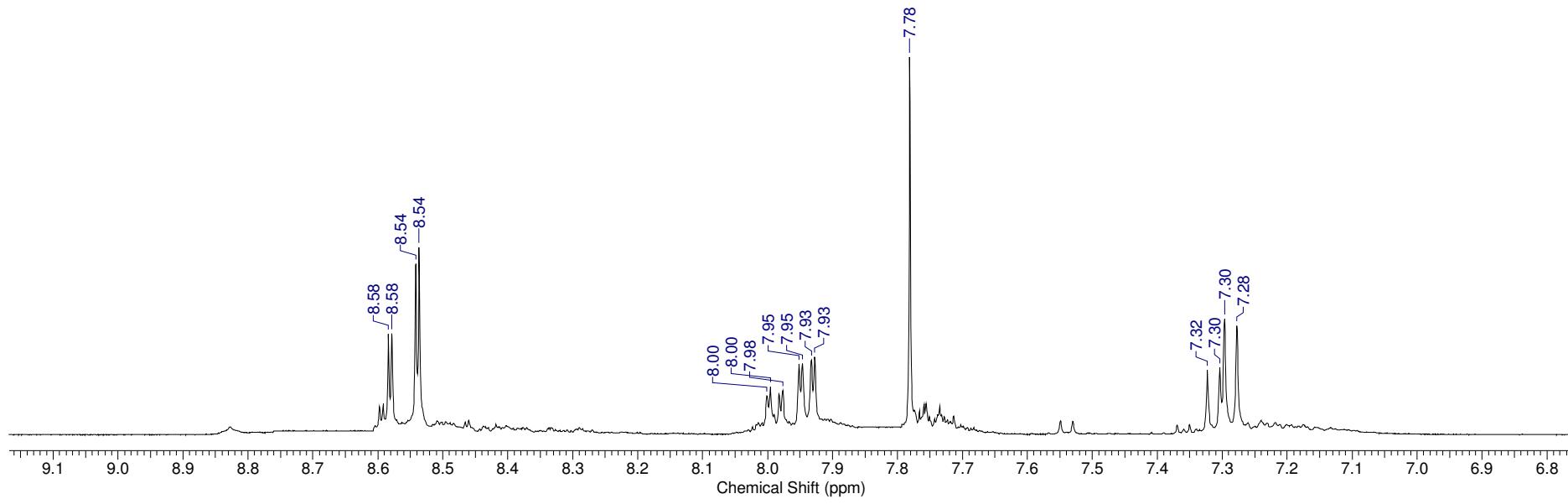


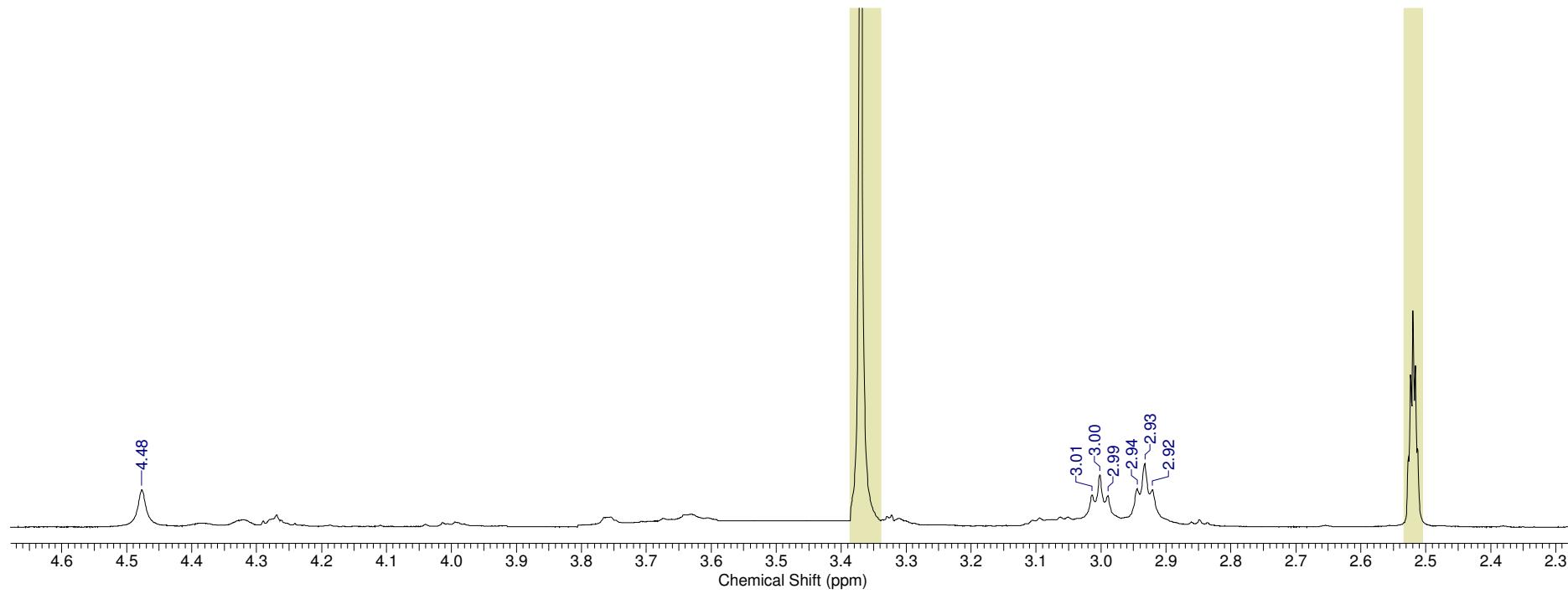
7.29.1 Espectro de RMN de ^{13}C da 3-{4-[(2-aminoetil)amino]-3-nitrofenil}-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olato (35) DMSO



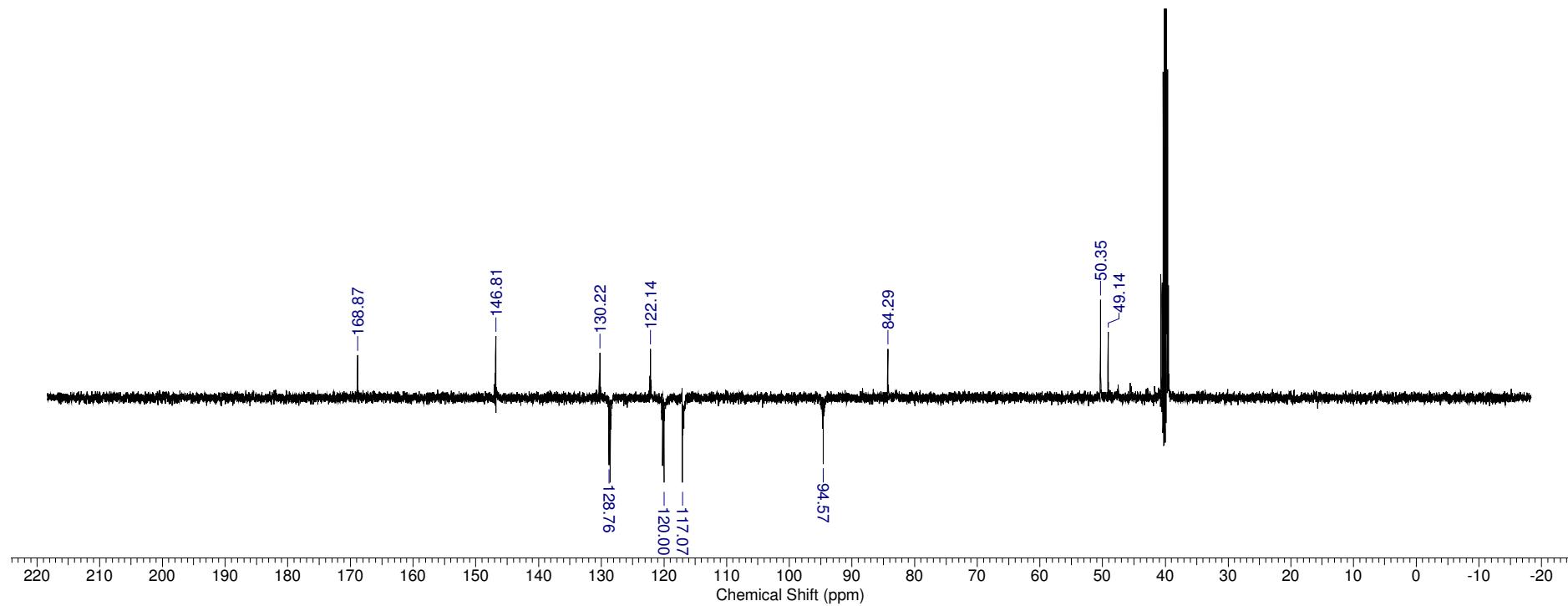
7.30 Espectro de RMN de ^1H da N,N',N"-{3-[4-(aminoetil)-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olato}-1,3,5-triazinana (36) DMSO







7.30.1 Espectro de RMN de ^{13}C da N,N',N"-{3-[4-(aminoetil)-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olato}-1,3,5-triazinana (36) DMSO



8. TRABALHOS E ARTIGOS PUBLICADOS

Effect of sydnone SYD-1 on certain functions of LPS-stimulated macrophages

Eduardo Luis Bizetto · Guilhermina Rodrigues Noleto ·
Aurea Echevarria · André Vinicius Canuto ·
Silvia Maria Suter Correia Cadena

Received: 6 April 2011 / Accepted: 13 August 2011 / Published online: 30 August 2011
Springer Science+Business Media, LLC, 2011

Abstract In an earlier article, we demonstrated that sydnone SYD-1 (3-[4-chloro-3-nitrophenyl]-1,2,3-oxadiazolium-5-olate) inhibits electron transport in the respiratory chain and uncouples oxidative phosphorylation, and postulated that these effects are probably involved in its anti-tumor activity. We now report the effect of SYD-1 on certain macrophage functions, considering the important role of these cells in inflammatory response and also the relevant anti-inflammatory activity reported for some sydnones. Incubation of macrophages with SYD-1 (5–100 **1M**) for 48 h did not affect the cell viability up to a concentration of 50 **1M**. However, at the highest concentration (100 **1M**), the compound decreased macrophage viability by \approx 20%. In assays involving 2 h and 24 h of incubation, SYD-1 (5–100 **1M**) did not affect the cell viability. The incubation of macrophages with the compound for 2 h promoted a dose-dependent reduction of phagocytic activity of up to \approx 65% (100 **1M**). SYD-1 (100 **1M**) was also able to increase the production of superoxide anion (\approx 50%). In the absence of LPS, SYD-1 decreased NO production dose-dependently by up to \approx 80% (100 **1M**). When SYD-1 and LPS were incubated concomitantly, the decrease of NO promoted by SYD was the most pronounced, reaching up to \approx 98% at the same concentration (50 **1M**). SYD-1 dose-

dependently suppressed IL-6 secretion by LPS-stimulated macrophages, reaching up to \approx 90% of inhibition at the highest concentration (100 **1M**). These results indicate that SYD-1 promotes effects similar to those described for anti-inflammatory and immunosuppressive drugs, thus motivating further studies to clarify the mechanisms involved in this activity.

Keywords Mesoionic compound Sydnones
Macrophage Nitric oxide Interleukin-6 Phagocytosis

Introduction

Mesoionic compounds are a special class of heterocyclic compounds with a potential therapeutic application due to their chemical properties. Possessing a betaine-like character with a partial positive charge in the heterocyclic ring balanced by a negative charge of an atom or exocyclic group, they are able to interact with biomolecules such as proteins and DNA. In addition, their overall neutrality enables them to cross biological membranes [1, 2]. Several biological activities have been attributed to different classes of mesoionic compounds (sydnones, sydnonymines, and mesoionic 1,3,4-thiadiazoles), such as anti-inflammatory, analgesic, antibacterial [3–5], antiplatelet, fibrinolytic, thrombolytic, broncholytic effects [6] and anticancer agents [7–11]. Sydnones were the first synthesized mesoionic class for which important biological activities have been described [3, 7, 12, 13]. Among the compounds of this class, SYD-1 (3-[4-chloro-3-nitrophenyl]-1,2,3-oxadiazolium-5-olate) (Fig. 1) have shown an important anti-tumor effect against Ehrlich carcinoma and Sarcoma 180 [7]. Previously, we have shown that SYD-1 was able to inhibit the respiratory chain and uncouple oxidative

E. L. Bizetto and G. R. Noleto contributed equally to this study.

E. L. Bizetto G. R. Noleto S. M. S. C. Cadena (&)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de
Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Universidade Federal
do Paraná, C.P. 19046, CEP 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil
e-mail: silvia.cadena@ufpr.br

A. Echevarria A. V. Canuto
Department of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

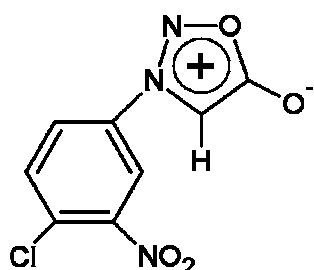


Fig. 1 Chemical structure of 3-[4-chloro-3-nitrophenyl]-1,2,3-oxadiazolium-5-olate—SYD-1

phosphorylation, and suggested that these effects could be involved in its antitumor activity [14].

Macrophages and monocytes play a key role in inflammatory response, being the major source of pro-inflammatory cytokines including TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, and IL-18 [15–17], in addition to enzymes as cyclooxygenases-2 (COX-2) and nitric oxide synthase (NOS) [18]. Although they are produced by other types of cells, macrophages and monocytes are the main source of IL-6 which is considered to be a major immune and inflammatory mediator [15, 19]. IL-6 production is tightly regulated and expressed at low levels, except during infection, trauma, cancer, or other disorders [19]. Nitric oxide (NO) is also involved in an inflammatory process as well as in cancer, and in activated macrophages it is produced by an inducible isoform of NOS (iNOS). The uncontrolled production of IL-6 and NO can lead to an exaggerated inflammatory reaction, which can cause severe damage [20]. Considering the significant involvement of NO and IL-6 in an inflammatory response in cancer, they have been referenced as attractive therapeutic targets for inflammation-related diseases.

In the presence of lypopolysaccharide (LPS), an endotoxin present in the cell membrane of Gram-negative bacteria, macrophages trigger signaling pathways to produce pro-inflammatory mediators, such as IL-6, NO, and superoxide anion, among other molecules [21, 22].

Considering the important role of macrophages in inflammatory response and the fact that sydnone have shown considerable anti-inflammatory activity [3, 23–25], we now report the effect of SYD-1 on certain macrophage functions, namely, phagocytic activity, superoxide anion, nitric oxide, and interleukin-6 production.

Materials and methods

Chemicals

Phorbol 12 myristate 13-acetate (PMA); lipopolysaccharide (LPS) from *E. Coli*; N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES); ferricytochrome c, (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium

bromide) (MTT); sulfanilamide; and naphthyl ethylene-diamide were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Eagle medium (MEM) and fetal bovine serum were supplied by Cultilab (Brazil), and enzyme immunoassay kits (ELISA) by eBioscience. All the other commercially available chemi-cals were of the highest purity.

SYD-1 (3-[4-chloro-3-nitrophenyl]-1,2,3-oxadiazolium-5-olate) was synthesized by the Department of Chemistry of the Federal Rural University of Rio de Janeiro, Brazil, and its structure was confirmed by $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, and mass spectrometry [7]. For its current use, the SYD-1 was dissolved in DMSO and then further diluted with the assay medium. Controls with DMSO were carried out in each assay.

Animals

Albino Swiss mice (8-week-old) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Paraná (PR, Brazil). The animals were housed at 22 ± 1 °C under a 12-h light-dark cycle, and were given free access to standard laboratory food (Purina) and tap water. The experiments were conducted in line with the Brazilian Federal Law 6638 of 05 Nov 1979 for the scientific management of animals, and the procedures were approved by the university's Animal Ethics Committee.

Peritoneal macrophage preparation

Peritoneal macrophages from mice were collected by infusing their peritoneal cavity with 10 ml of ice-cold sterile phosphate-buffered saline (PBS). The animals were subjected to a vigorous massage of the peritoneal area before the collection of cells. After centrifugation at 10809 g for 10 min at 4 °C, the cell pellet was resuspended in a culture medium (MEM, 5% fetal bovine serum and antibiotics) or Hank's buffered salt solution (HBSS). The cells were counted using a Neubauer hemocytometer, plated on tissue culture plates according to the experimental condition and incubated at 37 °C in a humid atmosphere for 2 h in an incubator with 5% CO₂. After 2 h, non-adherent cells were removed by washing with PBS at 37 °C [26].

Cell viability assay

Adherent macrophages were incubated for 2, 24, and 48 h in the standard medium in the absence (control) or presence of SYD-1 (5–100 μM) at 37 °C under 5% CO₂. Cytotoxicity was evaluated using MTT reagent, as described by Reilly et al. [27].

Measurement of superoxide anion (O_2^{-}) production

Adherent macrophages (5×10^5 cells/well) were plated on tissue culture plates (96 wells) and incubated in a standard reaction mixture consisting of HBSS containing ferricytochrome c (80 **1M**) in the presence or absence of PMA (1 **1g/ml**). SYD-1 (10–100 **1M**) was added to the standard reaction mixture. Absorbance was measured at 550 nm, and the molar extinction coefficient $e = 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was used to determine the reduced cytochrome c [26]. The results are expressed as 1mol O_2^{-} produced per mg of cell protein.

Measurement of nitric oxide (NO) production

To measure NO production, adherent macrophages (5×10^5 cells/well) were plated in a 96-well culture dish and incubated with SYD-1 (10–100 **1M**) in the presence or absence of LPS (50 ng/ml). Controls without SYD-1 and/or LPS were also performed. After 48 h, NO production was assessed by measuring nitrite in the culture medium using the Griess reagent [28]. Absorbance was measured at 550 nm on a microplate reader (BIO-RAD). The nitrite concentration was calculated from a standard NaNO_2 curve (10–100 **1M**). The results are expressed as 1mol nitrite produced per mg of cell protein.

Phagocytic activity assay

Phagocytic activity was assayed using yeast as phagocytosing particles, as described by Ramesh et al. [29] and Buchi et al. [30]. In brief, a macrophage monolayer (5×10^5 cells/well) adhering on glass coverslips, contained on a tissue culture plate (24-wells), was incubated with the standard medium in the absence (control) or presence of varying concentrations of SYD-1 (25, 50, and 100 **1M**). After 2 h at 37 °C under 5% CO_2 , the cells were washed three times with the MEM medium and the yeast (ratio of macrophages to yeast, 1:10) was added, followed by incubation under the same conditions for up to 60 min. After each incubation time, non-phagocytosed yeasts were removed by rinsing with PBS. The coverslips were then fixed with Bouin's fixative, stained with Giemsa for 2 h, dehydrated in acetone, and slides were mounted with Entellan and examined microscopically. A minimum of 200 cells per glass coverslip were counted and the mean number of intracellular particles per macrophage was determined.

Quantification of Interleukin-6 (IL-6)

Adherent macrophages (5×10^5 cells/well), plated on a

concentrations of SYD-1 (25–100 **1M**) in the presence or absence of LPS (50 ng/ml). After 18 h at 37 °C under 5% CO_2 , the supernatants were centrifuged at 500×g for 10 min. The inflammatory cytokine in the supernatants was determined by direct double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as specified by the manufacturers. The results are expressed in IL-6 nanograms/ml. None of the components of the culture medium showed immunoreactivity to the cytokine under study.

Protein determination

After removing the reaction mixture, the cells were washed 24-well culture plate, were incubated with varying three times with PBS at 37 °C. The protein content was determined by the Bradford method, using bovine serum albumin as standard [31].

Statistical analysis

The data were analyzed statistically by variance analysis and Tukey's test for the comparison of averages. Mean values \pm SD were used, and values were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Effects of SYD-1 on macrophage viability

Figure 2 shows the effect of SYD-1 on the viability of murine macrophages which was evaluated 48 h after treatment with different concentrations of the mesoionic compound (5–100 **1M**). As seen in the figure, SYD-1 did not affect cell viability up to a concentration of 50 **1M**. However, at the highest concentration (100 **1M**), the compound decreased the macrophage viability by $\approx 20\%$. Viability assays were also carried out by 2 and 24 h of incubation with SYD-1. In these experimental situations, SYD-1 (5–100 **1M**) did not decrease macrophage viability (data not shown). Based on these results, the concentrations for the subsequent experiments were established as 5–100 **1M**.

Effects of SYD-1 on phagocytic activity

Figure 3 shows the effects of SYD-1 on the phagocytic activity of macrophages, which was evaluated by incubating these cells with yeast for 30 and 60 min. The pre-treatment of macrophages with SYD-1 for 2 h promoted a dose-dependent reduction of phagocytic activity, which reached up to $\approx 65\%$ at the highest concentration of the compound (100 **1M**). This figure also shows that similar results were obtained with 30 and 60 min of incubation.

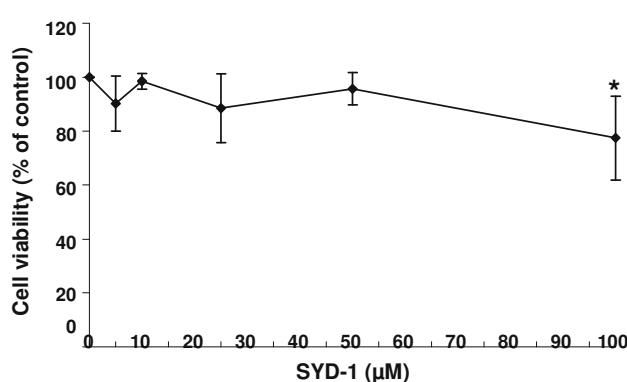


Fig. 2 Effects of SYD-1 on macrophages viability. Adherent macrophages were incubated with different concentrations of SYD-1, as indicated. After 48 h, the medium was removed, and the MTT reagent was added, followed by incubation for 3 h. Excess MTT was removed, and formazan crystals were dissolved by the addition of DMSO. Absorbance was measured at 550 nm. The values are the mean \pm SD of three independent experiments, each performed in triplicate. *Significantly different from control, $p < 0.05$. Control (100%) corresponds to the medium in the absence of SYD-1

Effects of SYD-1 on superoxide anion and NO production

SYD-1 was able to increase the production of superoxide anion to $\approx 150\%$ at the highest concentration (100 **1M**), when compared with medium (Fig. 4).

NO production from SYD-1 (10–100 **1M**)-treated cells was evaluated in the presence or absence of LPS (50 ng/ml), for 48 h (Fig. 5a–b). It was found that, in the absence of LPS, SYD-1 decreased NO production, with the

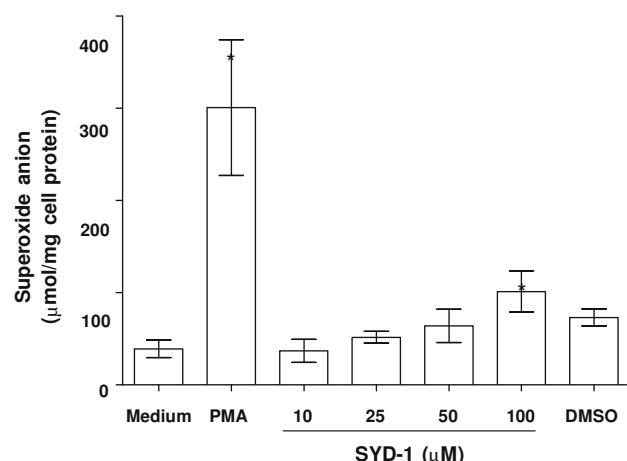


Fig. 4 Effect of SYD-1 on superoxide anion production by macrophages. Adherent macrophages were incubated in a mixture of Hank's buffered salt solution (HBSS) containing ferricytochrome c (80 **1M**) and the SYD-1 compound. As positive control, the cells were incubated with PMA (1 **1g/ml**). After 2 h, the supernatant was transferred to another plate, and the absorbance was measured at 550 nm to identify the O_2^- production. The values are the mean \pm SD of three independent experiments, each performed in triplicate. *Significantly different from control (medium), $p < 0.05$

decrease reaching up to $\approx 80\%$ at a concentration of 100 **1M** when compared with untreated cells (Fig. 5a). When SYD-1 and LPS were incubated concomitantly (Fig. 5b), the decrease of NO promoted by SYD was the most marked, with the decrease reaching up to $\approx 98\%$ at the same concentration as that of the mesoionic compound (100 **1M**). The vehicle control (DMSO) did not affect NO production in the presence or absence of LPS.

Effects of SYD-1 on IL-6 production

The effect of SYD-1 on the production of IL-6 by LPS-stimulated macrophages was determined in supernatants of peritoneal macrophage cultures treated for 24 h with different concentrations of SYD-1 in the presence of LPS. As Fig. 6 shows, SYD-1 suppressed the secretion of IL-6 by LPS-stimulated macrophages and the effect was dose dependent, reaching an inhibition of $\approx 90\%$ at the highest concentration (100 **1M**), when compared with the control group (LPS). The vehicle control (DMSO) did not interfere in IL-6 production.

Discussion

Several biological activities have been attributed to sydnone; however, the molecular mechanisms involved in these activities have not yet been entirely clarified. SYD-1 has been found to have important antitumor activity against Ehrlich carcinoma and Sarcoma 180 [7]. With the aim of

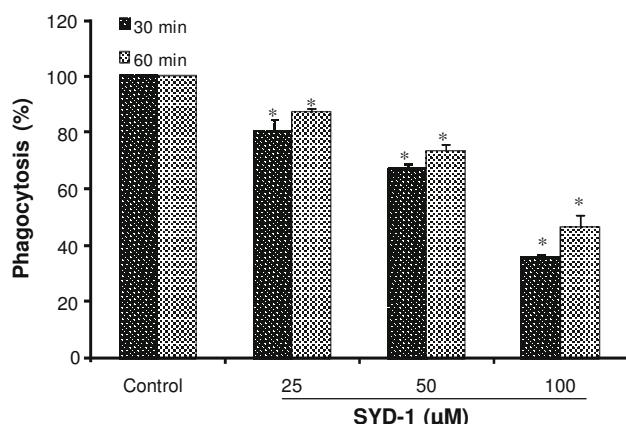


Fig. 3 Phagocytic activity of macrophages treated with SYD-1. Macrophages were cultivated in the absence (control) or presence of SYD-1 for 2 h, after which the medium was removed and yeasts (1:10) were added, followed by incubation for 30 and 60 min. The values are the mean \pm SD of three independent experiments, each performed in triplicate. *Significantly different from control, $p < 0.05$. The phagocytic activity was calculated as a percentage of the phagocytosing cells in relation to the control (100%)

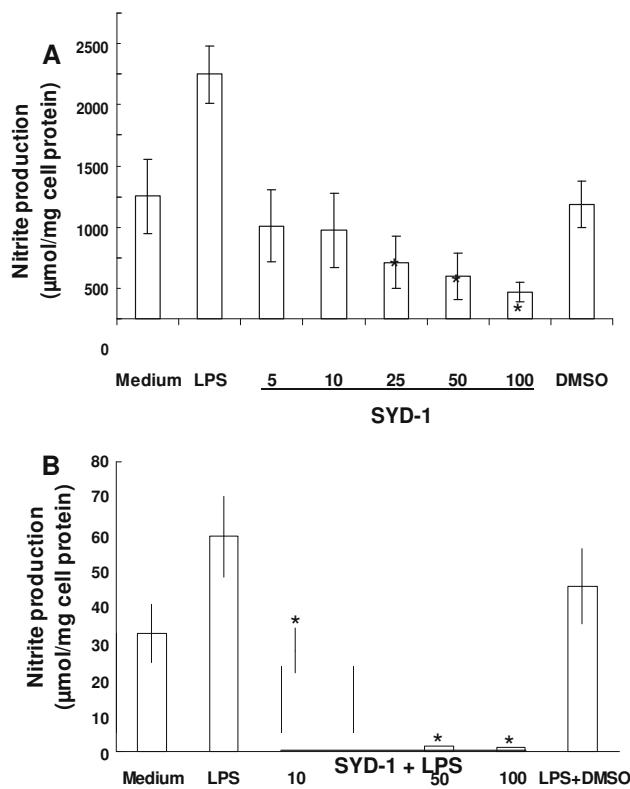


Fig. 5 Effect of SYD-1 on nitric oxide production by macrophages. Adherent macrophages were incubated with SYD-1 for 48 h in the absence (a) or presence (b) of LPS (50 ng/ml). LPS was used as a control for NO production. NO accumulation was measured in the supernatant, using the Griess reaction, and was calculated as 1 mol nitrite/mg cell protein. The values are the mean \pm SD of three independent experiments, each performed in triplicate. *Significantly different from control (medium \neq LPS), $p < 0.05$

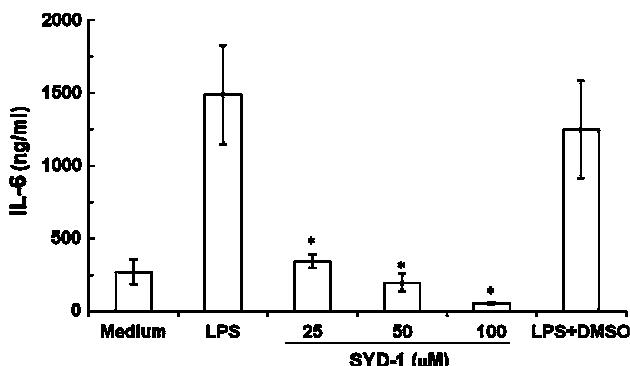


Fig. 6 IL-6 production in LPS-stimulated macrophages treated with SYD-1. Adherent macrophages were incubated with SYD-1 for 24 h in the presence of LPS (50 ng/ml). Cellular supernatants were collected, and IL-6 was detected by ELISA. IL-6 production in culture supernatants was measured and expressed as the mean of triplicate samples. *Significantly different from control (medium \neq LPS), $p < 0.05$

identifying the mechanisms of antitumor activity of SYD-1 and considering the involvement of mitochondria in cell death pathways, we have previously shown the effects of

this mesoionic compound on mitochondrial bioenergetics [14]. SYD-1 was able to depress the oxidative phosphorylation, which may be ascribed to its antitumor activity.

In the present study, we evaluated the effects of SYD-1 on certain functions of LPS-stimulated macrophages, taking into account the observation of the previous studies of anti-inflammatory activities attributed to the sydnone and the involvement of these cells in the inflammatory process [3, 25].

Macrophages are multifunctional cells that perform different processes in the presence of foreign microorganisms or an activator. Their most important function is phagocytosis, which may or may not be accompanied by the generation of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion. In the activation process, these cells also produce nitric oxide (NO) and secrete many cytokines and other mediators involved in the inflammatory reaction and immune response [32]. Lypopolysaccharide (LPS), a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, exhibits strong immunostimulatory activity, and is considered as one of the main inflammatory inducers. The presence of LPS activates macrophages, which trigger such as NO, O_2^- and IL-6 [33], which were measured different signalling pathways releasing several mediators, in the present study. The anti-inflammatory effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) can be evaluated using LPS-stimulated macrophages as an experimental model, through the determination of these mediators [18]. We used the phagocytic activity of macrophages as an indicator of the activation of the immune function. In the present study, SYD-1 inhibited phagocytic activity (by $\approx 20\%$ and $\approx 65\%$ at 25 μ M and 100 μ M, respectively—Fig. 3), which is a level of inhibition not shown by the most commercially available NSAIDs [34]. Inhibition of phagocytic activity and superoxide anion by glucocorticoids has been observed at 30 min [35], which the authors suggest as being a nongenomic mechanism.

As for the production of inflammatory mediators, SYD-1 was able to increase the production of superoxide anion by $\approx 150\%$ at 100 μ M. This effect differs from that of NSAIDs such as nimesulide, which, in the absence of LPS, was found not to interfere with the superoxide anion in alveolar macrophages [18]. The effects of SYD-1 on the nitric oxide pathway were also evaluated in this study. SYD-1 was able to significantly decrease NO production in LPS-stimulated macrophages, reaching an inhibition of up to $\approx 98\%$ at the highest concentration (100 μ M—Fig. 4b). Although SYD-1 decreased the cell viability at the same concentration (100 μ M—Fig. 2), this decrease was only $\approx 30\%$, which is negligible when compared to its $\approx 98\%$ inhibition of NO production. Moreover, even at the concentration of 10 μ M, at which cell viability remained $\approx 100\%$ (Fig. 2), the inhibition of NO production

was $\approx 45\%$. In a similar context, Cho et al. [34], who studied the immunomodulatory effects of several NSAIDs, including aspirin, indomethacin, diclofenac, and phenylbutazone, showed that they were able to inhibit NO production in a range of 10% (diclofenac)—50% (phenylbutazone). Nimesulide has also been described, *in vitro*, as an inhibitor of NO and superoxide anion production, as well as of lipid peroxidation by LPS-stimulated alveolar macrophages [18]. Also in this context, immunosuppressive drugs, such as rapamycin, cyclosporine, and corticosteroids such as hydrocortisone also inhibit NO production in LPS-stimulated macrophages within a range of 37% (cyclosporine A)—55% (rapamycin) [36]. Interestingly, there are common points connecting SYD-1 to NSAIDs and immunosuppressive drugs. In addition to inhibiting NO production, they also depress the efficiency of oxidative phosphorylation [13]. The immunosuppressant cyclosporine A, in particular, impairs the phenomenon of mitochondrial permeability transition involved in the process of apoptosis [37, 38]. In this sense, the evaluation of the effects of SYD-1 on the mitochondrial permeability transition is an attractive possibility which is currently under investigation in our laboratory.

In this study, SYD-1 promoted a significant decrease (of up to $\approx 90\%$ at 100 **1M**—Fig. 6) in interleukin-6 levels, a critical mediator of inflammation and of other processes such as cancer. The antiinflammatory properties of different classes of natural and synthetic compounds are attributed to their interference in the production of interleukins due to their inhibitory effect on the NF-**κB**-activating pathway [39]. Although our data do not clarify the pathway by which the mesoionic compound decreases IL-6 levels, they motivate the researchers to carry out further investigations of this phenomenon.

Taken together, our results show a differential immunomodulatory profile for SYD-1. The mesoionic compound shares some of the effects of the NSAIDs, glucocorticoids, and immunosuppressants that act upon the immune system. However, the intracellular mechanisms whereby SYD-1 exerts its effects are still to be investigated. This article offers the first report about the sydnone-mediated inhibition of the production of proinflammatory mediators in LPS-induced macrophages. Albeit very promising, our results require further experiments, which have already been planned. The potential immunosuppressive activity of SYD-1 should be evaluated *in vitro* to assess the compound's effect on NF-**κB** expression and proliferation of T lymphocytes. Another interesting possibility is to evaluate the analgesic, antipyretic, and anti-inflammatory activities of SYD-1 in *in vivo* experiments. In this sense, in an earlier article we have shown that MI-D, a mesoionic compound

of the 1,3,4-thiadiazolium class, possesses antiinflammatory activity similar to that of NSAIDs [4].

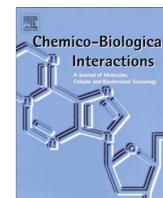
The results of this study lead us to conclude that the mesoionic compound SYD-1 reduces phagocytic activity, increases superoxide anion production, inhibits the production of nitric oxide, and decreases IL-6 levels in peritoneal macrophages of mice. SYD-1 promotes effects similar to those described for anti-inflammatory and immunosuppressive drugs, thus motivating the researchers to carry out further studies to clarify the mechanisms involved in this activity.

Acknowledgments This investigation was supported by the Brazilian research funding agencies CNPq and CAPES.

References

1. Ollis WD, Ramsden CA (1976) Meso-ionic compounds. *Adv Heterocycl Chem* 19:1–121
2. Newton CG, Ramsden CA (1982) Meso-ionic heterocycles. *Tetrahedron* 38:2965–3011
3. Satyanarayana K, Rao MNA (1995) Synthesis and antiinflammatory, analgesic and antipyretic testing of 4-[1-oxo-(3-substituted aryl)-2-propenyl]-3-phenylsydnone and 3-[4-(3-(substituted aryl)-1-oxo-2-propenyl) phenyl] sydnone. *J Pharm Sci* 84:263–266
4. Cardoso JC, Cadena SMSC, Zampiro A, Arruda AMS, Carnieri EGS, Echevarria A, Constantin A, Bracht A, Oliveira MBM (2004) Effects of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound, MI-D, on the acute inflammatory response. *Drug Dev Res* 61:207–217
5. Montanari CA, Beezer AE, Sandal JPB, Montanar MCL, Miller J, Giesbrecht AM (1992) On the interaction of some mesoionic compounds with *Saccharomyces cerevisiae* by biological microcalorimetry. *Rev Microbiol* 23:274–278
6. Corell T, Pedersen SB, Lissau B, Moilanen E, Metsä-Ketälä T, Kankaanranta H, Vuorinen P, Vapaatalo P, Rydell E, Andersson R, Marcinkiewicz E, Korbut R, Gryglewski RJ (1994) Pharmacology of mesoionic oxatriazole derivatives in blood, cardiovascular and respiratory systems. *Pol J Pharm* 46:553–566
7. Grynberg N, Gomes R, Shinzato T, Echevarria A, Miller J (1992) Some new aryl-sydnone: effects on murine tumours. *Anticancer Res* 12:1025–1028
8. Grynberg N, Santos AC, Echevarria A (1997) Synthesis and *in vivo* antitumor activity of new heterocyclic derivatives of the 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class. *Anti-Cancer Drug* 8:88–91
9. Senff-Ribeiro A, Echevarria A, Silva EF, Veiga SS, Oliveira MBM (2003) Effects of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16-F10 murine melanoma. *Melanoma Res* 13:465–472
10. Senff-Ribeiro A, Echevarria A, Silva EF, Veiga SS, Oliveira MBM (2004) Antimelanoma activity of 1,3,4-thiadiazolium mesoionics: a structure-activity relationship study. *Anti-Cancer Drugs* 15:269–275
11. Senff-Ribeiro A, Echevarria A, Silva EF, Veiga SS, Oliveira MBM (2004) Cytotoxic effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on cell lines of human melanoma. *Brit J Cancer* 91:297–304
12. Moustafa MAA, Eisa HM (1992) Synthesis and antimicrobial activity of 3-(substituted-phenyl)—sydnone. *Arch Pharm* 325:397–401
13. Dunkley CS, Thoman CJ (2003) Synthesis and biological evaluation of a novel phenyl substituted sydnone series as potential antitumor agents. *Bioorg Med Chem Lett* 13:2899–2901

14. Halila GC, Oliveira MB, Echevarria A, Belém AC, Rocha ME, Carnieri EG, Martinez GR, Noleto GR, Cadena SM (2007) Effect of sydnone SYD-1, a mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria. *Chem Biol Interact* 169(3):160–170
15. Bukke B, Lewis CE (2002) The macrophages. Oxford University Press, London
16. Akira S (2000) The role of IL-18 in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 12:59–63
17. Sinigaglia F, D' Ambrosio D, Panina-ordignon P, ordignon P, Rogge L (1997) Regulation of the IL-12/IL-12R axis: a critical step in T-help cell differentiation and effector function. *Immunol Rev* 170:65–72
18. Khanduja KL, Sohi KK, Pathak CM, Kaushik G (2006) Nimesulide inhibits lipopolysaccharide-induced production of superoxide anions and nitric oxide and iNOS expression in alveolar macrophages. *Life Sci* 78:1662–1669
19. Kishimoto T (2006) Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther* 8:1–6
20. Min KR, Lee H, Kim BH, Chung E, Cho SM, Kim Y (2005) Inhibitory effect of 6-hydroxy-7-methoxychroman-2-carboxylic acid phenylamide on nitric oxide and interleukin-6 production in macrophages. *Life Sci* 77:3247–3257
21. Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T (2002) A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 44(2):143–161
22. Verma N, Tripathi SK, Sahu D, Das HR, Das RH (2010) Evaluation of inhibitory activities of plant extracts on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in J774 murine macrophages. *Mol Cell Biochem* 336:127–135
23. Wagner H, Hill JB (1974) Anti-inflammatory sydnone. 1. *J Med Chem* 17(12):1337–1338
24. Hill JB, Ray RE, Wagner H, Aspinall R (1975) Antiinflammatory sydnone. 2. *J Med Chem* 18(1):50–53
25. Satyanarayana K, Rao MNA (1995) Synthesis of 4-[5-(substituted aryl)-4,5-dihydro-¹H-pyrazol-3-yl]-3-phenyl-sydnone as anti-inflammatory, antiarthritic and analgesic agents. *Eur J Med Chem* 30:641–645
26. Sasada M, Pabst MJ, Johnston JRB (1983) Activation of mouse peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. *J Biol Chem* 258(16):9631–9635
27. Reilly TP, Bellevue FHIII, Worster PM, Svesson CK (1998) Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. *Biochem Pharmacol* 55:803–808
28. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrates] in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131–138
29. Ramesh HP, Yamaki K, Tsushida T (2002) Effects of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. *Carbohydr Polym* 50:79–83
30. Buchi DF, Souza W (1993) Internalization of surface components during Fc-receptor mediated phagocytosis. *Cell Struct Funct* 18:399–407
31. Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
32. Mosser DM (2003) The many faces of macrophages activation. *J Leukocyte Biol* 73:209–212
33. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H (2003) Molecular mechanisms of macrophages activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Therapeut* 100:171–194
34. Cho JY (2007) Immunomodulatory Effect of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) at clinically available doses. *Arch Pharm Res* 30(1):64–74
35. Long F, Wang Y-X, Liu L, Zhou J, Cui R-Y, Jiang C-L (2005) Rapid nongenomic inhibitory effects of glucocorticoids on phagocytosis and superoxide anion production by macrophages. *Steroids* 70:55–61
36. Attur MG, Patel R, Thakker G, Vyas P, levartovsky D, Patel P, Naqvi S, Raza R, Patel K, Abramson D, Bruno G, Abramson SB, Amin AR (2000) Differential anti-inflammatory effects of immunosuppressive drugs: cyclosporin, rapamycin and FK-506 on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, cyclooxygenase-2 and PGE2 production. *Inflamm Res* 49:020–026
37. Petronilli V, Nicolli A, Costantini A, Colonna R (1994) Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biochim Biophys Acta* 1187:255–259
38. Kim J, He L, Lemasters JJ (2003) Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304:463–470
39. Shin H-M, Lee YR, Chang YS, Lee J-Y, Kim BH, Min KR, Kim Y (2006) Suppression of interleukin-6 production in macrophages by furonaphthoquinone NFD-37. *Int Immunopharmacol* 6:916–923



The antioxidant effect of the mesoionic compound SYD-1 in mitochondria

Q1 Gustavo Jabor Gozzi ^a, Amanda do Rocio Andrade Pires ^a, Glaucia Regina Martinez ^a,
 Maria Eliane Merlin Rocha ^a, Guilhermina Rodrigues Noleto ^a, Aurea Echevarria ^b, André Vinicius Canuto ^b,
 Sílvia Maria Suter Correia Cadena ^{a,†}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

article info

Article history:

Received 21 March 2013

Received in revised form 13 June 2013

Accepted 5 July 2013

Available online xxxx

Keywords:

Mesoionic compounds

Syndones

Oxidative stress

Mitochondrial permeability transition

abstract

The sydnone SYD-1 (3-[4-chloro-3-nitrophenyl]-1,2,3-oxadiazolium-5-olate) possesses important antitumor activity against Sarcoma 180 and Ehrlich tumors. We previously showed that SYD-1 depresses mitochondrial phosphorylation efficiency, which could be involved in its antitumoral activity. Considering the important role of mitochondria in the generation of reactive oxygen species (ROS) and the involvement of ROS in cell death mechanisms, we evaluated the effects of SYD-1 on oxidative stress parameters in rat liver mitochondria. SYD-1 (0.5 and 0.75 μ mol mg⁻¹ protein) inhibited the lipoperoxidation induced by Fe³⁺/ADP-oxoglutarate by approximately 75% and promoted total inhibition at the highest concentration tested (1.0 μ mol mg⁻¹ protein). However, SYD-1 did not affect lipoperoxidation started by peroxyl radicals generated by α - α '-azodiisobutyramidine dihydrochloride. The mesoionic compound (0.25–1.0 μ mol mg⁻¹ protein) demonstrated an ability to scavenge superoxide radicals, decreasing their levels by 9–19%. The activities of catalase and superoxide dismutase did not change in the presence of SYD-1 (0.25–1.0 μ mol mg⁻¹ protein). SYD-1 inhibited mitochondrial swelling dependent on the formation/opening of the permeability transition pore induced by Ca²⁺/phosphate by approximately 30% (1.0 μ mol mg⁻¹ protein). When Ca²⁺/H₂O₂ were used as inducers, SYD-1 inhibited swelling only by approximately 12% at the same concentration. NADPH oxidation was also inhibited by SYD-1 (1.0 μ mol mg⁻¹ protein) by approximately 48%. These results show that SYD-1 is able to prevent oxidative stress in isolated mitochondria and suggest that the antitumoral activity of SYD-1 is not mediated by the increasing generation of ROS.

2013 Published by Elsevier Ireland Ltd.

49

Abbreviations: AAPH, α - α '-azodiisobutyramidine dihydrochloride; BHT, butylhydroxytoluene; BSA, bovine serum albumin; CAT, catalase; CsA, cyclosporine A; DMSO, dimethylsulfoxide; EGTA, ethylene glycol-bis(b-aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; FCCP, p-trifluoro-methoxycarbonylcyanide phenylhydrazone; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid; MI-D, (4-phenyl-5-(4-nitrocinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride); MI-SOD, manganese superoxide dismutase; MI-J, 4-phenyl-5-(4-hydroxycinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides; MI-4F, 4-phenyl-5-(4-chlorocinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides; MI-2,4diF, 4-phenyl-5-(2,4-chlorocinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides; NBT, nitroblue tetrazolium; PMS, phenazine methosulfate; PTP, permeability transition pore; ROS, reactive oxygen species; SYD-1, 3-[4-chloro-3-nitrophenyl]-1,2,3-oxadiazolium-5-olate; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; TRIS, tris(hydroxymethyl)-aminomethane.

† Corresponding author. Address: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Coronel Francisco H. dos Santos, C. Postal 19046, Curitiba 81531-990, Paraná, Brazil. Tel.: +55 41 33611535; fax: +55 41 3266 2042.

E-mail address: silvia.cadena@ufpr.br (S.M.S.C. Cadena).

0009-2797/\$ - see front matter 2013 Published by Elsevier Ireland Ltd.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2013.07.004>

1. Introduction

The potential biological activities of mesoionic compounds, which are associated with their chemical properties, have motivated the synthesis of several mesoionic compounds within the last few decades [1–4]. These compounds possess a five member heterocyclic ring that cannot be represented by a covalent or polar structure. The negative charge present in an atom or an exocyclic group with which the ring associates is balanced by the positively charged ring, resulting in an overall neutral molecule. These properties allow mesoionic compounds to cross biological membranes and to interact with biomolecules such as DNA and proteins [4]. Several biological activities have been attributed to different classes of mesoionic compounds (syndones, sydnonymines, and mesoionic 1,3,4-thiadiazoles); these activities include anti-inflammatory, analgesic, antibacterial [3,5–7], antiplatelet, fibrinolytic and thrombolytic activities, as well as broncholytic and antitumor

2

G.J. Gozzi et al. / *Chemico-Biological Interactions* xxx (2013) xxx–xxx

effects [2,8–9]. Among these compounds, the sydnone SYD-1 (3-[4-chloro-3-nitrophenyl]-1,2,3-oxadiazolium-5-olate) (Fig. 1) has shown important cytotoxic and antitumor effects in vivo [10–11]. However, the molecular mechanisms involved in these effects are not known. In vitro studies suggest that alterations to the permeability of mitochondrial membranes and the consequent alteration of functions linked to energy provision may be involved in the mechanisms of cell death induction, particularly apoptosis [12]. We have shown that SYD-1 was able to promote both an important inhibition of the respiratory chain as well as the uncoupling of oxidative phosphorylation [13].

Several studies have shown that electron transport chain inhibitors can induce ROS overproduction and promote apoptosis (intrinsic pathway) in tumor cells [14–16]. The key event in this process is the permeabilization of the mitochondrial membrane and the release of pro-apoptotic factors into the cytoplasm. These pro-apoptotic factors can activate caspases responsible for the process of cell death. The disruption of the mitochondrial membrane is usually caused by BAX activation or calcium-mediated permeability transition pore formation. These events are normally accompanied by the dissipation of the mitochondrial membrane potential [17]. It has been demonstrated that lipid peroxidation, a process that can be initiated by oxidative stress, promotes mitochondrial membrane permeabilization and induces apoptosis through the modulation of PTP constituents [18].

To contribute to the understanding of the molecular pathways involved in the biological action of SYD-1, we investigated in this work the effects of SYD-1 on redox parameters that may be related to the mitochondrial dysfunction, cytotoxicity and antitumoral activity previously attributed to this mesoionic compound.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

D-mannitol, HEPES, EGTA, rotenone, BSA, glutamic acid, ADP, NADH, NBT, PMS, BHT and succinic acid were obtained from Sigma. Monobasic potassium phosphate and trichloroacetic acid were obtained from Synth. AAPH was purchased from Fluka. All other chemicals used were of the highest commercially available purity. SYD-1 was synthesized by the Department of Chemistry of the Federal Rural University of Rio de Janeiro, Brazil and its structure was confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and mass spectrometry [10]. For use in assays, the compound was dissolved in DMSO and then further diluted with the assay medium. The mesoionic compound was incubated for two min with mitochondrial preparations before assays began. To validate each assay, duplicate controls with DMSO were included at the concentrations used in the experiments. DMSO had no effect on the parameters analyzed.

2.2. Animals

Male Wistar rats (180–200 g) were obtained from the Central Animal House of Federal University of Paraná (PR, Brazil). They were housed at 22 ± 1 °C under a 12 h light–12 h dark cycle (lights

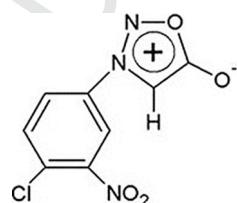


Fig. 1. Chemical structure of 3-[4-chloro-3-nitrophenyl]-1,2,3-oxadiazolium-5-olate] (SYD-1).

on at 08:00 h) with free access to standard laboratory food (Purina) and tap water. The animals were starved for 12 h and then killed by decapitation. Experiments were conducted following the recommendations of Brazilian Law 11.794, 08/10/2008 for the scientific management of animals and procedures and were approved by the institution's Animal Ethics Committee.

2.3. Isolation of rat liver mitochondria

Mitochondria were isolated from rat liver by differential centrifugation [19] using an extraction medium consisting of 250 mM D-mannitol, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.2), 1 mM EGTA, and 0.1% BSA. Specifically for mitochondrial permeability transitions and the oxidation of pyridine nucleotides induced by calcium the last centrifugation was performed in the absence of EGTA. Disrupted mitochondria were obtained by freeze–thawing and were used to determine Mn-SOD activity.

2.4. Oxygen uptake

Oxygen uptake of intact mitochondria was evaluated at 28 °C in a 1.3 mL closed, thermostatically controlled water-jacketed chamber under magnetic stirring. Oxygen consumption was measured polarographically using a Clark-type electrode connected to a Gilson oxygraph [20–21] and a standard medium containing 125 mM D-mannitol, 65 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.2) and 0.1% BSA. The medium was supplemented with 1.0 mM Pi, 0.1 mM ADP, 5 mM sodium glutamate, 0.5 mM sodium malate and 1.5 mg mL⁻¹ of mitochondrial protein. State 3 and 4 respiration rates were measured after the addition of substrates in the presence (state 3) and after exhaustion (state 4) of ADP. The respiratory control coefficient was calculated as the ratio of state 3 respiration to state 4 respiration [22]. Only mitochondrial preparations with respiratory controls above 4 were used (data not shown).

2.5. Determination of lipoperoxidation

Two systems were used as inducers of lipoperoxidation in intact mitochondria. One system consisted of AAPH, an inducer of free radicals in an aqueous phase at a concentration of 30 mM [23], and the other system consisted of 2 mM ADP, 0.2 mM FeCl₃ and 5 mM 2-oxoglutarate [24], which is able to induce the production of free radicals from the respiratory chain. Lipoperoxidation was performed as described by Buege and Aust [25] in medium containing mitochondrial protein (1 mg mL⁻¹), 10 mM HEPES (pH 7.2), 250 mM mannitol and a system inducer of free radicals. Lipid peroxidation was estimated by the absorbance of TBARS ($\epsilon_{535} = 1.56 \times 105 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and expressed as a percentage of control.

2.6. Superoxide radical assay

The scavenging of superoxide radicals was assessed by the method described by Nishimiki et al. [26], with some modifications. The reaction mixture consisted of 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 70 **1M** NADH, 21 **1M** NBT and 9 **1M** PMS. The reaction was followed at 560 nm for 1 min and the scavenging of superoxide radicals was calculated using the following equation [27]:

$$\text{Scavenging effect } \% = \frac{\text{Abscontrol} - \text{Abssample}}{\text{Abscontrol}} \times 100$$

2.7. Determination of mitochondrial permeability transition

The mitochondrial permeability transition was followed by analyzing the decrease in absorbance at 540 nm due to mitochondrial

171 swelling as a consequence of the formation/opening of the permeability transition pore (PTP) induced by calcium [28]. The reaction
 172 medium consisted of 250 mM D-mannitol, 10 mM HEPES (pH 7.2),
 173 5 **1M** rotenone, 0.5 mg mL⁻¹ mitochondrial protein and 40–50 **1M**
 174 CaCl₂. The final reaction volume (1 mL) was maintained at 28 °C.
 175 Swelling was initiated by the addition of 3 mM potassium succinate
 176 and 0.3 mM potassium phosphate or 5 **1M** H₂O₂. Maximal extent
 177 of swelling was determined after 10 and 15 min of reaction,
 178 when the inducers were Ca²⁺/Pi and Ca²⁺/H₂O₂, respectively.
 179 Individual additions of 1 mM EGTA and 0.5 **1M** CsA, the latter a
 180 well-known inhibitor of mitochondrial permeability transition
 181 [29], were performed to confirm that the swelling observed was
 182 due to the formation of PTP.
 183

184 2.8. Determination of the redox state of mitochondrial NADPH

185 The redox state of mitochondrial NADPH was monitored by fluo-
 186 rimetry as recommended by Pigozo et al. [30]. The reaction system
 187 consisted of 125 mM sucrose, 65 mM KCl and 10 mM HEPES-KOH
 188 (pH 7.4). The medium was supplemented with 2.5 **1M** rotenone,
 189 1 mg mL⁻¹ of mitochondrial protein and 40–50 **1M** CaCl₂. The reac-
 190 tion occurred at 30 °C and was initiated by adding 5 mM succinate
 191 potassium. Excitation and emission wavelengths of 366 and
 192 450 nm were used, respectively (slit 5.0 nm).

193 2.9. Determination of antioxidant enzymes

194 Catalase activity was accompanied by a decrease in absorbance
 195 at 240 nm as proposed by Aebi [31]. In these assays, to ensure that
 196 there was no contamination of cytoplasmic CAT, the mitochondrial
 197 suspension was purified by ultracentrifugation at 40,000g for 1 h
 198 with 30% v/v Percoll. The mitochondrial suspension was collected
 199 at a relative density of 1070–1100 g/mL and two additional centrifugations
 200 were performed at 8100g for 10 min at 4 °C [32]. The reaction system
 201 consisted of 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) and 0.5 mg/mL of
 202 mitochondrial protein. The reaction was initiated
 203 by the addition of 10 mM H₂O₂ and monitored for 60 s at 25 °C. The
 204 results were expressed as U, where 1 U corresponds to 1 **1mol** of
 205 H₂O₂ decomposed by protein milligram min⁻¹, considering a
 206 extinction coefficient of 39.4 M⁻¹ cm⁻¹. The Mn-SOD activity was
 207 assessed according to the method proposed by Nishikimi et al.
 208 [26] in disrupted mitochondria. The reaction system was main-
 209 tained at 25 °C and consisted of 10 mM TRIS-HCl (pH 8.0), 70 **1M**
 210 NADH, 21 **1M** NBT, 9 **1M** PMS and an amount of mitochondrial
 211 protein sufficient to inhibit the reduction of NBT by 50%. The
 212 reaction was initiated by the addition of NADH and monitored at
 213 560 nm for 1 min. The results were expressed as percentages
 214 relative to the control, where one unit of Mn-SOD corresponded to 50%
 215 inhibition of NBT reduction. To inactivate other SOD isoforms,
 216 samples were incubated with 6 mM KCN for 60 min at 0 °C [33].

217 2.10. Protein determination

218 Protein concentrations were determined by the method
 219 described by Lowry et al. [34].

220 2.11. Statistical analysis

221 The data were statistically analyzed by variance analysis (ANO-
 222 VA) and by Tukey's test for average comparison. Mean values \pm S.D.
 223 were used; values were considered significant when $P < 0.05$.

224 3. Results

225 3.1. Effects of SYD-1 on lipoperoxidation in mitochondria

226 To check lipoperoxidation in isolated mitochondria, two differ-
 227 ent methodologies were used. In the first, lipoperoxidation was in-
 228 duced by iron in mitochondria that were actively oxidizing
 229 substrate. In this case, the respiratory chain was responsible for
 230 the production of O₂ and OH by the Fenton reaction [35]. Thus,
 231 alterations to electron transport may reflect lipoperoxidation val-
 232 ues. The positive control (with iron addition) (Fig. 2A) represents
 233 the maximum amount of TBARS produced when iron is added to
 234 the system. The negative control (without iron addition) shows
 235 the basal level of mitochondrial lipoperoxidation (Fig. 2A). SYD-1
 236 at a lower concentration (0.25 **1mol mg⁻¹ protein**) does not affect
 237 lipoperoxidation. However, at intermediate concentrations (0.5
 238 and 0.75 **1mol mg⁻¹** protein), the mesoionic compound strongly
 239 decreased lipoperoxidation by approximately 75%, reaching total
 240

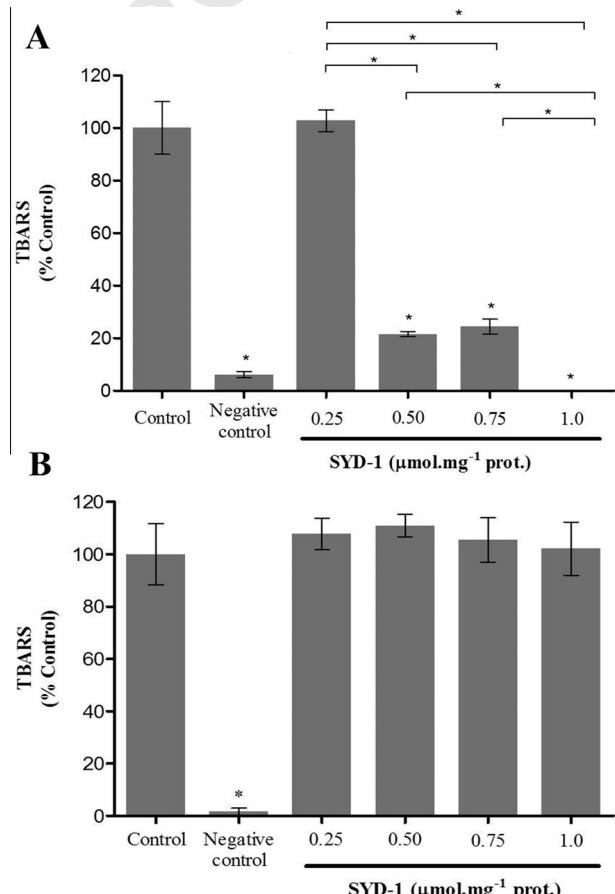


Fig. 2. Effects of SYD-1 on lipid peroxidation. (A) The incubation system containing 250 mM D-mannitol, 10 mM HEPES (pH 7.2), 0.2 mM FeCl₃, 2 mM ADP, and 1 mg mL⁻¹ mitochondrial protein was kept under stirring conditions at 37 °C. The reaction was initiated by the addition of 6 mM 2-oxoglutarate in the absence (control) and presence of SYD-1 at the concentrations indicated, or in the absence of FeCl₃ (negative control). (B) The incubation system containing 250 mM D-mannitol, 10 mM HEPES (pH 7.2) and 1 mg mL⁻¹ mitochondrial protein was kept under stirring conditions at 37 °C. The reaction was initiated by the addition of 30 mM AAPH in the absence (control) and presence of SYD-1 at the concentrations indicated, or in the absence of AAPH (negative control). Both reactions were stopped after 45 min by the addition of 0.012% BHT. 100% values correspond to 6.23 ± 0.66 and 2.76 ± 0.2 nmol (mean \pm SD) of TBARS per milligram of mitochondrial protein from three independent experiments. * Significantly different from control or between concentrations ($P < 0.05$).

4

G.J. Gozzi et al. / Chemico-Biological Interactions xxx (2013) xxx–xxx

inhibition at the highest concentration of 1.0 mol mg^{-1} protein in relation to controls (Fig. 2A).

Fig. 2B shows the results of mitochondrial lipid peroxidation initiated by alkyl radicals resulting from the decomposition of the azo compound AAPH [23]. In this assay, mitochondria were incubated in the absence of an oxidizable substrate. There was no significant alteration in peroxidation in comparison to the control. These results suggest that the inhibitory effect of SYD-1 on lipoperoxidation is a result of its uncoupling action on oxidative phosphorylation, which could promote an increase in the electron transport rate and consequently a decrease in the generation of superoxide anions and hydroxyl radicals [36], the latter of which are the primary initiator of the lipoperoxidation process.

3.2. Scavenging capacity of SYD-1

Considering the inhibitory effect of SYD-1 on iron-induced lipoperoxidation, we decided to evaluate whether SYD-1 was capable of scavenging O_2^- . For this experiment, the non-enzymatic system PMS/NADPH was used as an O_2^- generator in a mitochondria-free assay. Fig. 3 shows that SYD-1 (0.25, 0.50, 0.75 and 1.0 mol mL^{-1}) was able to scavenge approximately 9%, 14%, 13% and 19% of the available O_2^- , respectively. This scavenging ability of SYD-1 may contribute to its inhibition in iron-induced lipoperoxidation, which was total at the highest concentration used (1.0 mol mL^{-1} in Fig. 2A).

3.3. Effects of SYD-1 on mitochondrial antioxidant enzymes

Alterations of the activity of the enzymes SOD and CAT may indirectly influence Fenton's reaction and consequently control OH formation [37]. SYD-1 did not promote significant alterations to the activity of these enzymes (data not shown).

3.4. Effects of SYD-1 on mitochondrial permeability transition

ROS generation is one of the primary factors contributing to the opening/formation of PTP [38]. Considering that SYD-1 impairs

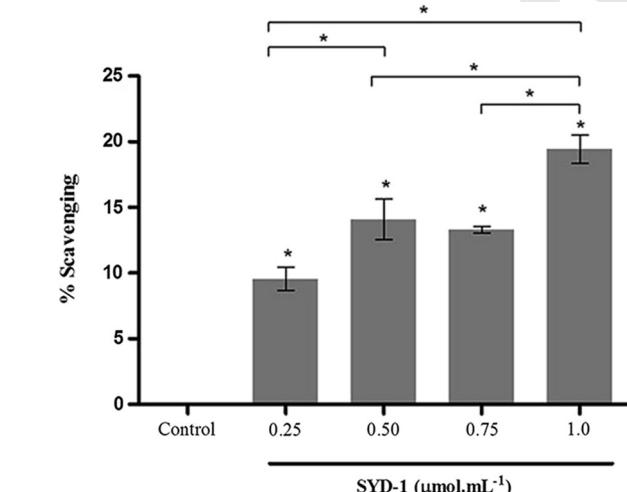


Fig. 3. Effects of SYD-1 on superoxide radical scavenging. The incubation system containing 10 mM TRIS-HCl (pH 8), 70 mM NADH, 21 mM NBT, and 9 mM PMS was kept at 25°C . The reaction was initiated by the addition of NADH and monitored at 560 nm for one min in the absence (control) and presence of SYD-1 at the concentrations indicated. Values are expressed as percentages of superoxide radicals scavenged, where each value represents the mean \pm SD of three independent experiments. Significantly different from control or between concentrations ($P < 0.05$).

mitochondrial bioenergetics [13], which could promote an increase in ROS levels, we evaluate its effects on PTP using calcium/phosphate and calcium/ H_2O_2 as inducers. In Fig. 4A, the maximum mitochondrial swelling induced by phosphate and calcium is represented by a decrease in absorbance. When mitochondria were incubated with SYD-1, a reduction of swelling by approximately 12%, 22% and 30% was observed in comparison to the control for the concentrations 0.50, 0.75 and 1.0 mol of SYD-1 by mg of protein, respectively. When calcium/ H_2O_2 were used as inducers (Fig. 4B), the mesoionic compound inhibited swelling slightly, reaching approximately 12% inhibition at the highest concentration used (1.0 mol mg^{-1} protein).

3.5. Effect of SYD-1 on the mitochondrial NADPH redox state

NADPH acts as a co-enzyme for at least two important antioxidant enzymes in the mitochondria: thioredoxin reductase and glutathione reductase [39]. Only its reduced form emits fluorescence between 420 and 480 nm, which permits the evaluation of its redox state in mitochondria [40]. In these experiments, alterations in NADPH signals were observed because the oxidation of NADH through complex I was inhibited by the addition of rotenone. In addition, succinate was used as an oxidizable substrate. In Fig. 5, a small decrease in fluorescence in the absence of calcium is observed, indicating a basal oxidation of NADPH in mitochondria. After adding calcium (control), an increase in NADPH oxidation is observed due to oxidative stress induction [40]. In this situation, the presence of SYD at 0.25, 0.50, 0.75 and 1.0 mol mg^{-1} protein promoted the reduction of NADPH oxidation by approximately 11%, 18%, 36% and 48%, respectively.

4. Discussion

We previously described the effects of SYD-1 on the energy linked functions of rat liver mitochondria [13] and suggested that these functions could be related to mesoionic antitumor activity [10–11]. In this investigation, we show the effects of SYD-1 on parameters related to oxidative stress. SYD-1 inhibited iron-induced lipoperoxidation (Fig. 2A), which may be associated with its uncoupling effect [13]. In fact, this inhibition did not occur under conditions in which the initiation of lipoperoxidation was independent of the electron transport chain (Fig. 2B). It is well known that an increase in the rate of electron transport in the respiratory chain decreases ROS production [41]. SYD-1 at 1.0 mol mg^{-1} promoted a ± 4 -fold increase in the respiratory rate during state 4 respiration, an effect comparable to that of protonophore FCCP [13]. Iron induced lipoperoxidation was also inhibited by MI-D, a different class of mesoionic compound (approximately 97% inhibition from 80 nmol mg^{-1} protein) [42]. Interestingly, while no inhibition of lipoperoxidation induced by AAPH was observed with SYD-1 (Fig. 2B), MI-D promoted the inhibition of lipoperoxidation induced by AAPH (approximately 22% inhibition from 80 nmol mg^{-1} protein), suggesting that uncoupling capacity should be a common characteristic of mesoionic compounds. On the other hand, the absence of SYD-1 effect when AAPH was used as lipoperoxidation inducer suggests that these mesoionics may act by distinct mechanisms. It is accepted that mitochondrial uncoupling can be the mechanism responsible for the antitumor action of certain compounds [43]. In addition, despite several studies that consider lipoperoxidation an important inductor of cell death by apoptosis [44], some studies indicate that protection of this process may prevent the development of tumors associated with oxidative stress [45–46]. This fact may represent an important differential in the antitumor activity of SYD-1, which also possesses O_2^- scavenging ability similar to that of another mesoionic

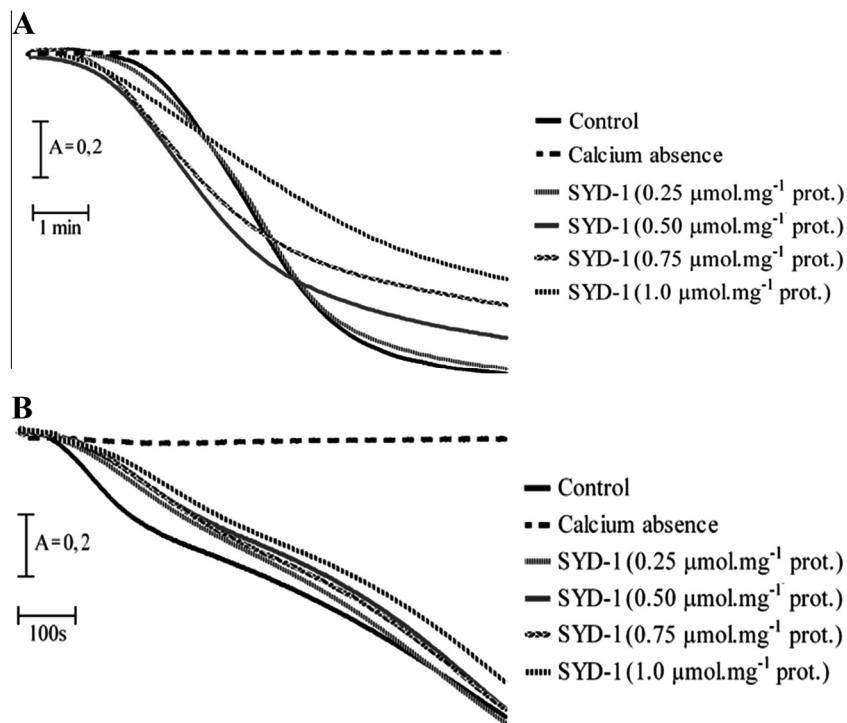


Fig. 4. Effects of SYD-1 on mitochondrial permeability transition. (A) The incubation system containing 250 mM D-mannitol, 10 mM HEPES (pH 7.2), 0.3 mM potassium phosphate, 40–50 μ M CaCl₂, 5 μ M rotenone and 0.5 mg mL⁻¹ protein was kept at 28 °C. Swelling was initiated by the addition of 3 mM potassium succinate in the absence (control) or presence of SYD-1 at the concentrations indicated or in the presence of 1 mM EGTA. The traces are representative of three independent experiments. (B) The incubation system containing 250 mM D-mannitol, 10 mM HEPES (pH 7.2), 40–50 μ M CaCl₂ (except where indicated in the legend) and 0.5 mg mL⁻¹ protein was maintained at 28 °C. The swelling was initiated by the addition of 3 mM potassium succinate and 5 μ M H₂O₂ in the absence (control) or presence of indicated concentrations of SYD-1. The traces are representative of three independent experiments.

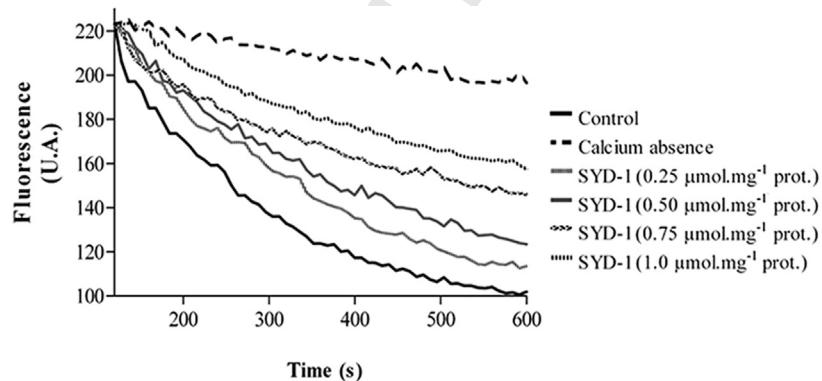


Fig. 5. Effects of SYD-1 on the oxidation of mitochondrial NADPH. The incubation system containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 2.5 μ M rotenone, 1 mg mL⁻¹ mitochondrial protein and 45–50 μ M CaCl₂ was kept under stirring conditions at 30 °C. The reaction was triggered with 5 mM potassium succinate and monitored for 10 min. at 366 nm excitation and 450 nm excitation in the absence (control) and presence of SYD-1 at the concentrations indicated. Values are expressed as arbitrary fluorescence units (AU) and the traces are representative of three independent experiments.

333 compound, MI-D [42]. The O₂ scavenging ability of SYD-1 shown
 334 in this work (Fig. 3), although weak, may also have contributed to
 335 the strong inhibition of iron-induced lipoperoxidation that we ob-
 336 served. This property of SYD-1 could be important to its clinical
 337 use, as the generation of free radicals may represent a limiting fac-
 338 tor to the use of antineoplastic agents [47].

339 Considering that oxidative stress may be a consequence of a
 340 decrease in antioxidant defenses or an increase in ROS level, the
 341 absence of SYD-1 effect on Mn-SOD and CAT (data not shown) rein-
 342 force the fact that its antioxidant properties are primarily due to
 343 the modulation of ROS production. This is in agreement with the
 344 absence of inhibition by SYD-1 of AAPH-induced lipoperoxidation,
 345 when compared with iron-induced lipoperoxidation, suggesting
 346 that SYD-1 has an effect on the initiation of lipid peroxidation.

347 In the present study, the consequences of redox alterations pro-
 348 moted by SYD-1 on the formation/opening of PTP, an important
 349 promoter of apoptosis [17], were also shown using calcium/phos-
 350 phate and calcium/H₂O₂ as inducers. Both systems of PTP induction
 351 promote an increase in ROS levels which is recognized as a primary
 352 factor for PTP opening/formation due to the oxidation of its constit-
 353 uents [38]. The common component in these systems, calcium, in-
 354 creases ROS formation by several mechanisms, including its
 355 interaction with cardiolipin, which may alter the permeability of
 356 the inner mitochondrial membrane and promote electron leakage
 357 [48]. Meanwhile, H₂O₂ and phosphate were used with the aim of
 358 amplifying the oxidative stress and PTP formation [48–49]. It is
 359 known that H₂O₂ in the presence of iron released from iron–sulfur
 360 proteins leads to OH production [40] and consequently induces

6

G.J. Gozzi et al. / *Chemico-Biological Interactions* xxx (2013) xxx–xxx

the formation of PTP in the presence of Ca^{2+} [48], while Pi increases oxidative stress for PTP formation by forming reactive aldehydes [50]. The distinct mechanisms of swelling amplification promoted by H_2O_2 and Pi are reflected on the different shapes of the lines (Fig. 4). It can be seen that the swelling induced by the presence of calcium/ H_2O_2 (Fig. 4B) occurs more slowly when compared with calcium/phosphate, as previously described [51]. Besides this kinetic difference between the inducer systems, SYD-1 was able to protect the mitochondrial swelling in both cases, although not at the same intensity. The protection provided by SYD-1 against calcium/phosphate-induced swelling (Fig. 4A) may be initially interpreted as a consequence of its uncoupling effect, which could prevent calcium uptake. In addition, decreases in levels of O_2 and consequently of H_2O_2 are also expected. The small effect of SYD-1 shown when calcium/ H_2O_2 were used as swelling inducers (Fig. 4B), in comparison to the use of calcium/phosphate (Fig. 4A), suggests that a decrease in calcium uptake is not the only means by which SYD-1 inhibited the formation of PTP. As mentioned, H_2O_2 in the presence of iron released from iron-sulfur proteins leads to OH production [40], which is essential for the production of OH by the Fenton reaction [35]. Thus, the production of OH could have been prevented. Finally, the O_2 scavenging performed by SYD-1 may also contribute to this effect.

It is also important to consider the possibility that SYD-1 can interact with the mitochondrial membrane, preventing the release of iron. This interaction was previously suggested in experiments examining swelling induced by valinomycin- K^+ in deenergized mitochondria; in these experiments SYD-1 was able to decrease the amplitude of the swelling [13]. As SYD-1 can easily react with nucleophilic groups [10–11], it could also react with membrane proteins, which are present in large amounts in the structures [52]. Another possibility is that because of its hydrophobicity, SYD-1 is able to enter the bilayer and alter its fluidity, as observed in different classes of mesoionic compounds such as MI-J, MI-4F and MI-2,4-dIF [53]. The capacity of SYD-1 to scavenge OH cannot be excluded. Although the formation/opening of PTP is a known apoptosis trigger, the induction of tumor cell death may also be a result of the closing of PTP, as observed in cyclosporin A-induced lymphoma P-388 death cell [54].

During calcium overload in mitochondria, there is an increase in O_2 formation [48] that might indirectly result in NADPH oxidation. SYD-1 was able to protect NADPH oxidation (Fig. 5), which is according to inhibition of iron-induced lipoperoxidation and its O_2 scavenging ability. It is well known that NADPH oxidation is involved in the formation/opening of PTP [55].

In conclusion, SYD-1 demonstrates antioxidant properties in isolated rat liver mitochondria including inhibition of: lipoperoxidation, formation/opening of PTP and oxidation of NADPH. These effects seem to be consequences of its uncoupling action and O_2 scavenging ability and could represent a differential mechanism of its antitumor action.

412 5. Conflict of interest

413 The authors declare that there are no conflicts of interest.

414 References

- [1] R.F. Rodrigues, E.F. da Silva, A. Echevarria, R. Fajardo-Bonin, V.F. Amaral, L.L. Leon, M.M. Canto-Cavalheiro, A comparative study of mesoionic compounds in *Leishmania* sp and toxicity evaluation, *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 1039–1043.
- [2] N. Grynpberg, A.C. Santos, A. Echevarria, Synthesis and *in vivo* antitumor activity of new heterocyclic derivatives of the 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class, *Anticancer Drugs* 8 (1997) 88–91.
- [3] E.L. Bizzotto, G.R. Noleto, A. Echevarria, A.V. Canuto, S.M.S.C. Cadena, Effect of sydnone SYD-1 on certain functions of LPS-stimulated macrophages, *Mol. Cell. Biochem.* 360 (2012) 15–21.
- [4] C.G. Newton, C.A. Ramsden, Meso-Ionic heterocycles (1976–1980), *Tetrahedron* 38 (1982) 2965–3011.
- [5] C.S. de Oliveira, S. Falcao-Silva Vdos, J.P. Siqueira Jr., D.P. Harding, B.F. Lira, J.G. Lorenzo, J.M. Barbosa-Filho, P.F. de Athayde-Filho, Drug resistance modulation in *Staphylococcus aureus*, a new biological activity for mesoionic hydrochloride compounds, *Molecules* 16 (2011) 2023–2031.
- [6] S.R. Deshpande, K.V. Pai, R.S. Pai, Design and synthesis of certain mesoionic sydnone styrylketones as potential nonsteroidal antiinflammatory agents, *Arzneimittelforschung* 61 (2011) 180–185.
- [7] J.C. Cardoso, S. Cadena, A. Zampronio, A.M.S. Arruda, E.G.S. Carnieri, A. Echevarria, J. Constantin, A. Bracht, M.B.M. Oliveira, Effects of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound, MI-D, on the acute inflammatory response, *Drug Dev. Res.* 61 (2004) 207–217.
- [8] T. Corell, S.B. Pedersen, B. Lissau, E. Moilanen, T. Metsa-Ketela, H. Kankaanranta, P. Vuorinen, H. Vapaatalo, E. Rydell, R. Andersson, et al., Pharmacology of mesoionic oxatriazole derivatives in blood, cardiovascular and respiratory systems, *Pol. J. Pharmacol.* 46 (1994) 553–566.
- [9] A. Senff-Ribeiro, A. Echevarria, E.F. Silva, S.S. Veiga, M.B. Oliveira, Antimelanoma activity of 1,3,4-thiadiazolium mesoionics: a structure–activity relationship study, *Anticancer Drugs* 15 (2004) 269–275.
- [10] N. Grynpberg, R. Gomes, T. Shinzato, A. Echevarria, J. Miller, Some new aryl-sydones – effects on murine tumors, *Anticancer Res.* 12 (1992) 1025–1028.
- [11] C.S. Dunkley, C.J. Thoman, Synthesis and biological evaluation of a novel phenyl substituted sydnone series as potential antitumor agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 2899–2901.
- [12] N. Hail Jr., R. Lotan, Cancer chemoprevention and mitochondria: targeting apoptosis in transformed cells via the disruption of mitochondrial bioenergetics/redox state, *Mol. Nutr. Food Res.* 53 (2009) 49–67.
- [13] G.C. Halila, M.B.M. de Oliveira, A. Echevarria, A.C. Belem, M.E.M. Rocha, E.G.S. Carnieri, G.R. Martinez, G.R. Noleto, S. Cadena, Effect of sydnone SYD-1, energy-linked functions a mesoionic compound, on of rat liver mitochondria, *Chem. Biol. Interact.* 169 (2007) 160–170.
- [14] K.C. Pramanik, S.R. Boreddy, S.K. Srivastava, Role of mitochondrial electron transport chain complexes in capsaicin mediated oxidative stress leading to apoptosis in pancreatic cancer cells, *PLoS ONE* 6 (2011) e20151.
- [15] B.I. Fedele, A.Y. Zhu, K.S. Young, S.M. Hillier, K.D. Proffitt, J.M. Essigmann, R.G. Croy, Chemical genetics analysis of an aniline mustard anticancer agent reveals complex I of the electron transport chain as a target, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 33910–33920.
- [16] Y.T. Deng, H.C. Huang, J.K. Lin, Rotenone induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell-mediated ROS through JNK and p38 signaling, *Mol. Carcinog.* 49 (2010) 141–151.
- [17] J.Y. Byun, M.J. Kim, D.Y. Eum, C.H. Yoon, W.D. Seo, K.H. Park, J.W. Hyun, Y.S. Lee, J.S. Lee, M.Y. Yoon, S.J. Lee, Reactive oxygen species-dependent activation of Bax and poly(ADP-ribose) polymerase-1 is required for mitochondrial cell death induced by triterpenoid pristimerin in human cervical cancer cells, *Mol. Pharmacol.* 76 (2009) 734–744.
- [18] H.L. Vieira, A.S. Belzacq, D. Haouzi, F. Bernassola, I. Cohen, E. Jacotot, K.F. Ferri, C. El Hamel, L.M. Bartle, G. Melino, C. Brenner, V. Goldmacher, G. Kroemer, The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxyxenonone, *Oncogene* 20 (2001) 4305–4316.
- [19] D.O. Voss, A.P. Campello, M. Bacila, The respiratory chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4 (1961) 48–51.
- [20] B. Chance, G.R. Williams, Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation I. Kinetics of oxygen utilization, *J. Biol. Chem.* 217 (1955) 383–393.
- [21] D.O. Voss, J.C. Cowles, M. Bacila, A new oxygen electrode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration, *Anal. Biochem.* 6 (1963) 211–222.
- [22] R.W. Estabrook, [7] Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios, in: M.E.P. Ronald, W. Estabrook (Eds.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1967, pp. 41–47.
- [23] M.C. Hanlon, D.W. Seybert, The pH dependence of lipid peroxidation using water-soluble azo initiators, *Free Radical Biol. Med.* 23 (1997) 712–719.
- [24] R. Takayanagi, K. Takeshige, S. Minakami, NADH- and NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. Dependence on the rate of electron flow in the respiratory chain and an antioxidant role of ubiquinol, *Biochem. J.* 192 (1980) 853–860.
- [25] J.A. Buege, S.D. Aust, Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol.* 52 (1978) 302–310.
- [26] M. Nishikimi, N. Appaji, K. Yagi, The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46 (1972) 849–854.
- [27] H. Qi, Q. Zhang, T. Zhao, R. Chen, H. Zhang, X. Niu, Z. Li, Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) *in vitro*, *Int. J. Biol. Macromol.* 37 (2005) 195–199.
- [28] A.M. Davies, S. Hershman, G.J. Stabley, J.B. Hoek, J. Peterson, A. Cahill, A Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition causes complete release of rat liver endonuclease G activity from its exclusive location within the mitochondrial intermembrane space. Identification of a novel endonuclease activity residing within the mitochondrial matrix, *Nucl. Acids Res.* 31 (2003) 1364–1373.
- [29] A.P. Halestrap, A.M. Davidson, Inhibition of Ca^{2+} -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans

- 510 isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide
511 translocase, *Biochem. J.* 268 (1990) 153–160.
- 512 [30] A.A. Pigozo, S.A. Uyemura, A.C. Santos, T. Rodrigues, F.E. Mingatto, C. Curti,
513 Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on calcium efflux in
514 isolated rat renal cortex mitochondria and aspects of the mechanisms
515 involved, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30 (1998) 961–965.
- 516 [31] H. Aebi, Catalase *in vitro*, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- 517 [32] M.P. Rigobello, G. Scutari, A. Folda, A. Bindoli, Mitochondrial thioredoxin
518 reductase inhibition by gold(I) compounds and concurrent stimulation of
519 permeability transition and release of cytochrome c, *Biochem. Pharmacol.* 67
520 (2004) 689–696.
- 521 [33] O. Gonchar, Effects of intermittent hypoxia different regimes on mitochondrial
522 lipid peroxidation and glutathione-redox balance in stressed rats, *Cent. Eur. J.*
523 *Biol.* 3 (2008) 233–242.
- 524 [34] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with
525 the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- 526 [35] P. Kovacic, J.D. Jacintho, Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative
527 stress and electron transfer, *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 773–796.
- 528 [36] L.J. Toime, M.D. Brand, Uncoupling protein-3 lowers reactive oxygen species
529 production in isolated mitochondria, *Free Radical Biol. Med.* 49 (2010) 606–
530 611.
- 531 [37] C. Thomas, M.M. Mackey, A.A. Diaz, D.P. Cox, Hydroxyl radical is produced via
532 the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress:
533 implications for diseases associated with iron accumulation, *Redox Rep.* 14
534 (2009) 102–108.
- 535 [38] S. Javadov, M. Karmazyn, N. Escobales, Mitochondrial permeability transition
536 pore opening as a promising therapeutic target in cardiac diseases, *J.*
537 *Pharmacol. Exp. Ther.* 330 (2009) 670–678.
- 538 [39] M. Mari, A. Morales, A. Colell, C. Garcia-Ruiz, J.C. Fernandez-Checa,
539 Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant, *Antioxid. Redox
540 Signal.* 11 (2009) 2685–2700.
- 541 [40] E.B. Zago, R.F. Castilho, A.E. Vercesi, The redox state of endogenous pyridine
542 nucleotides can determine both the degree of mitochondrial oxidative stress
543 and the solute selectivity of the permeability transition pore, *FEBS Lett.* 478
544 (2000) 29–33.
- 545 [41] A.J. Kowaltowski, N.C. de Souza-Pinto, R.F. Castilho, A.E. Vercesi, Mitochondria
546 and reactive oxygen species, *Free Radical Biol. Med.* 47 (2009) 333–343.
- 547 [42] S.C. Mendez-Sanchez, G.R. Martinez, S. Romao, A. Echevarria, E.F. Silva, M.E.
548 Rocha, G.R. Noleto, E.G. Carnieri, S.M. Cadena, M.B. de Oliveira, The inhibition
549 of lipoperoxidation by mesoionic compound MI-D: a relationship with its
550 uncoupling effect and scavenging activity, *Chem. Biol. Interact.* 179 (2009)
551 125–130.
- 552 [43] S. Rodríguez-Enríquez, L. Hernández-Esquível, A. Marín-Hernández, L.-F. Dong,
553 E.T. Akporiaye, J. Neuzil, S.J. Ralph, R. Moreno-Sánchez, Molecular mechanism
for the selective impairment of cancer mitochondrial function by a
mitochondrially targeted vitamin E analogue, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) –
Bioenerg.* 1817 (2012) 1597–1607.
- [44] M. Maccarrone, G. Melino, A. Finazzi-Agro, Lipoxygenases and their
involvement in programmed cell death, *Cell Death Differ.* 8 (2001)
sb:pages>776–784.
- [45] H.R. Matos, P. Di Mascio, M.H.G. Medeiros, Protective effect of lycopene on
lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture, *Arch. Biochem.
Biophys.* 383 (2000) 56–59.
- [46] L. Bjorkhem-Bergman, L. Ekstrom, L.C. Eriksson, Review: exploring
anticarcinogenic agents in a rat hepatocarcinogenesis model—focus on
selenium and statins, *In Vivo* 26 (2012) 527–535.
- [47] A.-M.M. Osman, M.M. Nemnem, A.A. Abou-Bakr, O.A. Nassier, M.T. Khayyal,
Effect of methimazole treatment on doxorubicin-induced cardiotoxicity in
mice, *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 2425–2430.
- [48] A.J. Kowaltowski, R.F. Castilho, A.E. Vercesi, Mitochondrial permeability
transition and oxidative stress, *FEBS Lett.* 495 (2001) 12–15.
- [49] A. Vianello, V. Casolo, E. Petrucci, C. Peresson, S. Patui, A. Bertolini, S.
Passamonti, E. Braidot, M. Zancani, The mitochondrial permeability transition
pore (PTP) – an example of multiple molecular exaptation?, *Biochim. Biophys.
Acta* 2012 (1817) 2072–2086.
- [50] A.J. Kowaltowski, R.F. Castilho, M.T. Grijalba, E.J. Bechara, A.E. Vercesi, Effect of
inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial
membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. A proposed model for
phosphate-stimulated lipid peroxidation, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 2929–
2934.
- [51] S.J. Lee, Y. Jin, H.Y. Yoon, B.O. Choi, H.C. Kim, Y.K. Oh, H.S. Kim, W.K. Kim,
Ciclopirox protects mitochondria from hydrogen peroxide toxicity, *Br. J.
Pharmacol.* 145 (2005) 469–476.
- [52] H. Steinbrenner, H. Sies, Protection against reactive oxygen species by
selenoproteins, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gen. Subj.* 1790 (2009)
1478–1485.
- [53] A.R. Pires, G.R. Noleto, A. Echevarria, C.M. dos Reis, M.E. Rocha, E.G. Carnieri,
G.R. Martinez, S.M. Cadena, Interaction of 1,3,4-thiadiazolium mesoionic
derivatives with mitochondrial membrane and scavenging activity:
Involvement of their effects on mitochondrial energy-linked functions,
Chem. Biol. Interact. 189 (2011) 17–25.
- [54] V. Teplova, Y. Evtdienko, I. Odinokova, A. Kruglov, A. Kudrjavtsev, Suppression
of mitochondrial permeability transition pore and induction of lymphoma
P388 cell death by cyclosporin A, *IUBMB Life* 50 (2000) 75–80.
- [55] C.M. Cardoso, L.M. Almeida, J.B. Custodio, Protection of tamoxifen against
oxidation of mitochondrial thiols and NAD(P)H underlying the permeability
transition induced by prooxidants, *Chem. Biol. Interact.* 148 (2004)
149–161.



The mesoionic compound SYD-1 impairs metabolic functions linked to energy provision in HepG2 Cells.

Brandt, A.P.¹; Pires, A. R. A.¹; Noleto, G.R.¹; Rocha, M. E. M.¹; Martinez, G. R.¹
Echevarria, A²; Canuto, V.C.²; Cadena, S.M.S.C.¹

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, PR; ²Departamento de Química, UFRRJ, RJ. Brazil.

An important antitumor effect of SYD-1 (3-[4-chloro-3-nitrophenyl]-1,2,3-oxadiazolium-5-olate) has been shown. We previously reported that SYD-1 impairs oxidative phosphorylation in isolated mitochondria. Now, we evaluated the effects of this derivative on human liver carcinoma cells (HepG2) under two experimental approaches: cells in suspension and in culture. The experiments with suspension cells were carried out after incubation with SYD-1 for 2 min. The viability of these cells, evaluated by Tripan Blue, was not affected by SYD-1 (25 μ M or 50 μ M). The compound also did not affect respiratory parameters of HepG2 cells. However, SYD-1 (50 μ M) was able to decrease the levels of piruvate (~37%) and increase lactate (~17%) after 40min of incubation. In cultured cells, SYD-1 (50 μ M) reduced the viability in a time- and dose-dependent way, reaching up to ~12% decrease after 24h incubation. In this experimental situation, SYD-1 also promoted the reduction of pyruvate levels by ~ 56% and the increase in the lactate levels by ~32% (24 h incubation at 50 μ M). Morphological analysis of HepG2 cells in culture after treatment with SYD-1 (25 μ M and 50 μ M) for 24 h showed cellular injury as evidenced by the occurrence of cytoplasmic vacuolization and cell shrinking. These results show that SYD-1 impairs metabolic functions in HepG2 cells, particularly the energy-linked functions involving oxidative phosphorylation and glycolysis. The study also confirmed that SYD-1 effects were more pronounced in cultured cells. These effects may be related to the antitumour activity of the SYD-1.

Keywords: mesoionic compounds, SYD-1, HepG2 cells, respiration, glycolysis, metabolism.

Supported by: CAPES, REUNI and CNPq.

Sydnone SYD-1 affects metabolic functions in isolated rat hepatocytes.

Brandt, A.P.¹; Noleto, G.R.¹; Pires, A. R. A.¹; Rocha, M. E. M.¹; Acco, A.²; Souza, C.E.A. de²; Echevarria, A.³; Canuto, V.C.³; Cadena, S.M.S.C.¹

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, PR; ²Departamento de Farmacologia, UFPR, PR; ³Departamento de Química, UFRRJ, RJ, Brazil.

Experiments carried out in our laboratory showed that SYD-1 (3-[4-chloro-3-nitrophenyl]-1,2,3-oxadiazolium-5-olate) impairs metabolic functions linked to energy provision in hepatocarcinoma cells (HepG2). Now, we evaluated the effects of SYD-1 (25 μ M and 50 μ M) on non-tumor cells with the aim of evaluating a possible selectivity for cancer cells. Rat hepatocytes were isolated by perfusion with collagenase and were immediately used (suspension cells) or maintained in culture for 18 h. SYD-1 was incubated for 2 min with suspension cells or 18h with cultured cells. The compound (50 μ M) decreased cell viability at ~66% of cultured hepatocytes, as evaluated by MTT. Morphological changes seen in cultured cells treated with SYD-1 (50 μ M) were suggestive of cell distress. Basal and uncoupled cellular respiration were inhibited at ~79% and ~39%, respectively, by SYD-1 (50 μ M). Production of piruvate and lactate was increased in the presence of SYD (50 μ M) at ~83% and ~16%, respectively. SYD-1 (50 μ M) did not affect the viability of hepatocytes in suspension, as evaluated by Tripan Blue. However, the compound (50 μ M) inhibited the uncoupled state of respiration in these cells at ~24%. At the same concentration of SYD-1, piruvate levels decreased at ~36% whereas lactate levels increased at ~22%. These results show that SYD-1 affects important metabolic functions related to energy provision of hepatocytes and that this effect was more pronounced on cells in culture. In addition, the effects of SYD-1 on hepatocytes were observed at higher concentration (50 μ M) in comparison to HepG2 cells, whereas similar effects were observed in a lower concentration (25 μ M).

Keywords: mesoionic, SYD-1, hepatocytes, respiration, glycolysis, metabolism.

Supported by: CAPES, REUNI and CNPq

NMR spectroscopy for H₂S Scavenger Effect Evaluation

André Canuto^a, Aurea Echevarria^b

^{a-b} Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – Rio de Janeiro, Brazil.

andredarural@yahoo.com.br

Hydrogen sulfide (H₂S) is colorless, highly toxic, corrosive and denser than air. It is usually associated with oil fields, natural gas, refineries, coal mines and some industrial effluent treatments.¹ The corrosive action of H₂S on metals have shown widespread or spotted attacks, and depending on the action of mechanical stress, it can result in most cases in deterioration or fractures in the equipment being minimized or avoided through materials with special coatings or the addition of H₂S scavenging.²

The objective of this work was the development of an alternative method to evaluate the H₂S scavenging agent effect by monitoring the reaction products by ¹H NMR spectroscopy.

The H₂S scavenging agent was 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazinane, whose scavenging activity is reported in the literature.³ The measurement of scavenging effect was made by sample monitoring, at 30, 60, 90 min, containing the scavenging agent in the presence of sodium sulfide, in deuterated water as solvent.

The products of reaction between the scavenger agent and sulfide ions were quantitatively determined by ¹H NMR spectra of the samples using the signals integration, with sodium benzoate as internal standard, recorded on Bruker model BioSpin Ultrashield Plus 500 MHz with the zq30 pulse sequence, being accumulated 16 replicates for each free induced decay (FID).

Results showed that the reaction of scavenging is very fast at 20 °C; soon after the addition of sodium sulfide, the scavenger agent reacts all at once, even in high pHs. Thus, the two products of H₂S scavenger, 3,5-bis(2-hydroxyethyl)-1,3,5-thiadiazinane and 5-(2-hydroxyethyl)-1,3,5-dithiazinane, were observed.

The spectra obtained during the reaction were clear at the working temperature, demonstrating that the quantification by ¹H NMR spectroscopy can be used as a quite fast and efficient technique for H₂S scavenger evaluation.

1. F.B. MAINIER. *Engevista*, **2002**, v.4, n.6, p.16-22.
2. F.B. MAINIER., G.C. SANDRES., S.S.M. TAVARES., *8º Congresso Iberoamericano de Engenharia Mecânica*, **2007**, Rio de Janeiro.
3. J.M. BAKKE., J. BUHAUG., J. RIHA. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2001**, v. 40, p. 6051-6054.

This work has been carried out with financial aid of the Cenpes/Petrobras and CAPES

Síntese e Avaliação da Toxidez frente à *Artemia salina* de Novas 2,4,6-alquilsulfonil e alquifosfonil-1,3,5-triazinas

André Vinicius Canuto* (PG), Arthur Valbon (IC) e Aurea Echevarria (PQ)

andredarural@yahoo.com.br

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Palavras Chave: triazina, toxicidade, artemia salina.

Introdução

As triazinas são compostos heterocíclicos cuja síntese tem despertado interesse em função de suas variadas e úteis aplicações, dentre elas atividade herbicida, fungicida, bactericida e antitumoral,^{1,2} embora esses compostos ainda apresentem efeitos tóxicos.

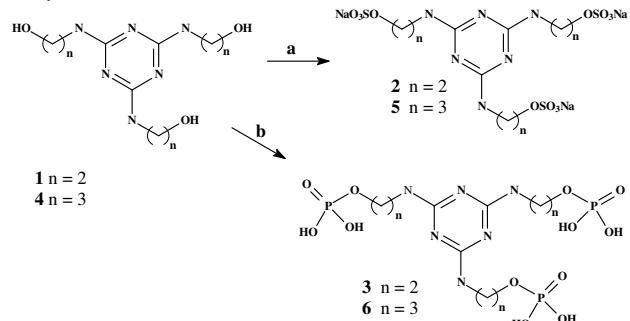
A letalidade de organismos simples tem sido usada para um monitoramento rápido e relativamente simples da resposta biológica. O ensaio de letalidade do microcrustáceo *Artemia salina* permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica.⁸

Nesta comunicação apresentamos a síntese de seis novas 1,3,5-triazinas com maior solubilidade em água, e a avaliação da toxicidade desses compostos frente à *Artemia salina* com o objetivo de se obter compostos com potenciais atividades biológicas sem serem tóxicos.

Resultados e Discussão

As triazinas **1** e **4** foram preparadas a partir do cloreto isocianúrico, conforme a literatura.² A metodologia utilizada para a obtenção dos derivados 1,3,5-triazínicos sulfonados envolveu o tratamento das correspondentes 1,3,5-triazinas na presença de CISO_3H e posterior neutralização com NaOH (*metodologia a*). Já para os derivados 1,3,5-triazínicos fosfonados foi utilizado a metodologia descrita na literatura utilizando H_3PO_4 (*metodologia b*).³ O esquema 1 mostra o esquema de síntese utilizado e os derivados que foram obtidos.

Esquema 1



a: 1) CH_2Cl_2 , CISO_3H ; 2) MeOH , NaOH

b: 1) H_3PO_4 , Py, Et_3N , Ac_2O 90 °C 2h; 2) H_2O 90 °C 1h

Os compostos 1,3,4-triazínicos foram obtidos em altos rendimentos e, caracterizados por RMN de hidrogênio e carbono.

Os espectros foram feitos em água deuterada e a diferença observada entre os deslocamentos químicos foi mais pronunciada no metileno terminal (-N-CH₂-CH₂⁺-), por exemplo, para os compostos **1**, **2** e **3** foram obtidos os respectivos deslocamentos $\delta_{\text{CH}_2^+}$ = 63, 76 e 67 ppm.

A toxicidade frente à *A. salina* foi avaliada através da dose letal de 50% (DL_{50}) para os microcrustáceos. Os derivados 1,3,5-triazínicos foram ensaiados em 4 concentrações diferentes (125 - 1000 ppm) em tubos de ensaio contendo água do mar artificial e 10 naupilis. As larvas vivas e mortas foram contadas após 24h e os valores de DL_{50} determinados a partir das equações obtidas por regressão linear. Os ensaios foram realizados em quadruplicata, assim como o ensaio controle. A Tabela 1 indica os valores de DL_{50} obtidos.

Tabela 1. Valores de DL_{50} (μM) para as triazinas.

Triazinas	Rendimento %	DL_{50} ppm (μM)
1	99	413 (1,60)
2	99	^a
3	76	^a
4	96	469 (1,56)
5	98	^a
6	68	^a

^a Não apresentaram ação tóxica até a concentração máxima testada (1000 ppm)

Os resultados obtidos para os derivados triazínicos sulfonados e fosfonados indicaram valores de $\text{DL}_{50} > 1000\text{ppm}$ sendo estes considerados não tóxicos.

Conclusões

As metodologias utilizadas para a síntese dos compostos mostraram-se muito eficientes. O ensaio de letalidade mostrou menor toxicidade para os derivados sulfonados e fosfonados quando comparados aos hidroxilados.

Agradecimentos

UFRRJ, CNPq, CAPES

¹ Baldani et al. E-Journal of Chemistry, 2009, 6(3), 673-680. ² Cavalcante et al. Química Nova 2000, 23(1), 20-22. ³ Dueymes et al. Tetrahedron Letters 2008, 49, 5300-5301.