

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO FUNGICIDA DE 1,2,3-TRIAZÓIS NO CONTROLE DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO

Aidene de Fátima Camilo Faria¹, Gisely Ferreira Moura¹, Mariana Belizário de Oliveira², Tatiane Paulino da Cruz³, Vagner Tebaldi de Queiroz¹, Willian Bucker Moraes³, Adilson Vidal Costa¹.

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde/ Departamento de Química e Física, Alto Universitário, S/N, Guararema – 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, aidenecfaria@gmail.com, gisely.m.ferreira@gmail.com, vagner.queiroz@ufes.br, avcosta@hotmail.com.

²Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas/Departamento de Química, Avenida Fernando Ferrari, 29075-910 – Vitória-ES, Brasil, belizmary@hotmail.com.

³Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alto universitário s/n, 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, agronomapaulino@gmail.com, willian.fito@gmail.com.

Resumo

O café é uma das culturas mais importantes do país e, dentre as diversas doenças que acometem sua produção, a ferrugem do cafeeiro, cujo agente etiológico *Hemileia vastatrix*, é mais prejudicial. Uma das principais formas de controle utilizadas são os fungicidas sistêmicos feitos à base de triazóis. Em virtude disso, objetivou-se sintetizar 1,2,3-triazóis (**4e-4h**) derivados do glicerol, um subproduto do biodiesel, e avaliar sua atividade antifúngica frente a inibição do desenvolvimento de *H. vastatrix*. Os compostos foram sintetizados por uma rota sintética executada em quatro rápidas etapas, sendo obtidos com rendimentos satisfatórios (65%-84%) e caracterizados pelos métodos de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e de ¹³C. Os derivados foram avaliados quanto ao potencial antifúngico na inibição de germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix*, nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 ppm, numa série de cinco repetições. O DMSO foi utilizado como controle negativo. Os triazóis **4e**, **4g** e **4h** foram mais eficientes na redução do número de uredíniosporos de *H. vastatrix*, sendo promissores no manejo da ferrugem do cafeeiro.

Palavras-chave: Café. *Hemileia vastatrix*. “click chemistry”.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra - Química.

Introdução

A cafeicultura representa um papel importante no Brasil, uma vez que o país está entre os maiores produtores, exportadores e consumidores dessa *commodity* no mundo. As duas espécies mais cultivadas e de maior importância e interesse econômico são a *Coffea arábica* L. e a *Coffea canephora*, popularmente conhecidas por café arábica e café conilon, respectivamente (Alfonsi *et al.*, 2019; IBGE, 2022). O café é produzido em mais de 70 países e é fundamental para a subsistência de milhares de pessoas. No Brasil, a cafeicultura é um setor econômico que representa importância significativa para a formação do Produto Interno Bruto (PIB) nacional, colaborando com a geração de empregos e movimentando significativamente a economia brasileira (Navarro *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2019).

A produção de café pode ser acometida por uma série de doenças e pragas que afetam os frutos e podem levar a perdas substanciais. A ferrugem do cafeeiro é considerada a doença principal e mais prejudicial que pode ocorrer à cafeicultura. Causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, a doença pode reduzir a produção em mais de 50% e se manifesta através de necrose por manchas marrons circundadas por halo de cor amarela na parte superior das folhas, e pústulas de coloração amarelo-alaranjada na parte inferior (Alfonsi *et al.*, 2019; Gichuru *et al.*, 2021).

Os métodos de controle da ferrugem do cafeeiro visam impedir o progresso da doença e que ocorram danos prejudiciais. São realizados principalmente através da aplicação de fungicidas sistêmicos à base de cobre, triazóis e estrobilurinas (Belan *et al.*, 2020; Hinnah *et al.*, 2020). Os triazóis são o maior e principal grupo de compostos utilizados para o controle da doença, dada sua alta

estabilidade química e fitoquímica e baixa biodegradabilidade, características que possibilitam seu amplo uso na agricultura (Li *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2020).

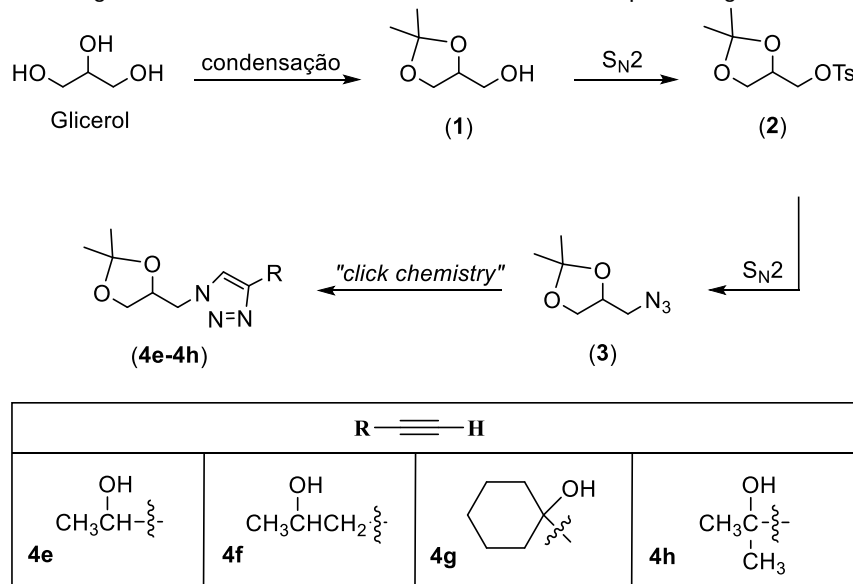
Os triazóis possuem diversas atividades biológicas que os tornam moléculas promissoras para o manejo de diferentes organismos, como antimalárica, antitubercular, anticancerígena, antiviral, analgésica, fungicida, antimicrobiana e anticonvulsivante (Costa *et al.*, 2017, 2020; Dheer; Singh; Shankar, 2017). Os fungicidas à base de triazóis agem através da inibição da síntese do ergosterol e são considerados mais eficientes por atuarem tanto como protetores, ao exercer ação tóxica sobre a formação do tubo germinativo e apressório do fungo, quanto como efeito curativo ao impedir o desenvolvimento haustório e crescimento micelial (Forcellini *et al.*, 2001; Zambolim *et al.*, 2007; Berry e Spink, 2009; Zamani-Noor e Knüfer, 2018).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi sintetizar quatro novos 1,2,3-triazóis a partir do glicerol como matéria prima, um álcool que é gerado como subproduto na produção do biodiesel, e avaliar a atividade antifúngica frente ao crescimento de *Hemileia vastatrix*.

Metodologia

A síntese dos quatro novos 1,2,3-triazóis (**4e-4h**) foi a partir do glicerol como matéria prima, um álcool gerado como subproduto em excesso na produção do biodiesel. A rota de síntese utilizada consistiu em quatro etapas, na qual a etapa principal para obtenção dos derivados triazólicos foi a reação "click" de cicloadição 1,3-dipolar entre um alcino e uma azida catalisada por cobre (Figura 1) (Costa *et al.*, 2020).

Figura 1 – Rota sintética dos derivados triazólicos a partir do glicerol.



Fonte: Próprio autor.

Após a síntese e caracterização química, os quatro novos compostos foram submetidos aos ensaios biológicos para avaliar sua atividade antifúngica frente a *Hemileia vastatrix*. Os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e água nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 ppm, e testados numa série de cinco repetições. Como controle negativo foi utilizado o DMSO e como controle positivo o fungicida sistêmico comercial Flutriafol, na concentração recomendada pelo fabricante.

Para avaliar o potencial dos derivados triazólicos na inibição de germinação de urediniosporos de *H. vastatrix* a metodologia foi ajustada de acordo com Capucho *et al.* (2012). Placas de petri com meio de cultura ágar-água e placas contendo o meio de cultura e os triazóis foram preparadas. Posteriormente, foram feitos discos de 5mm de diâmetro contendo o meio de cultura ágar-água e triazol que foram depositados nas placas contendo o meio de cultura ágar-água. Foram pipetados e depositados 20 μL de uma suspensão contendo 5×10^4 urediniosporos/mL de *H. vastatrix* em cada um dos discos. As placas foram seladas e acondicionadas em estufa de tipo BOD à 22°C por 48 horas, na

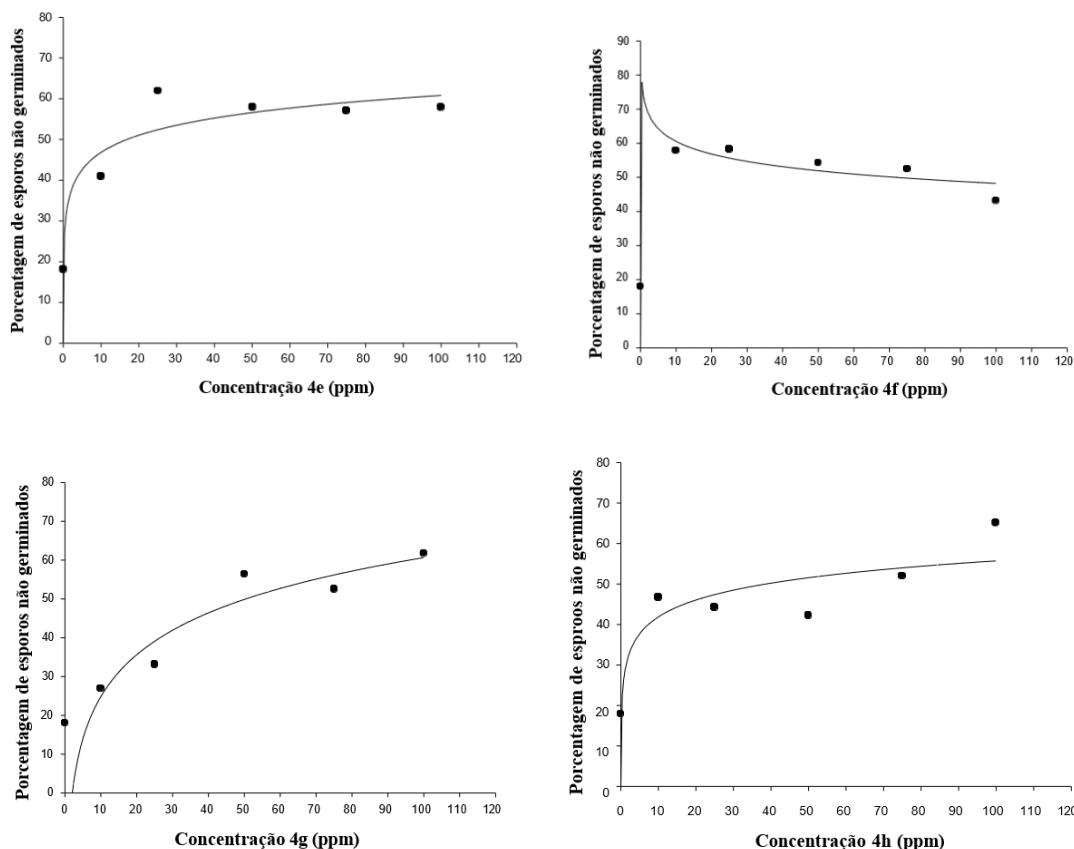
ausência de luz. Após as 48 horas, a avaliação foi feita através da contagem dos urediniosporos em um microscópio óptico (BN500, LEICA, Alemanha). O procedimento foi repetido para cada composto sintetizado.

Resultados

A síntese dos novos derivados triazólicos ocorreu em quatro etapas, de acordo com a rota de síntese apresentada na Figura 1, na qual o glicerol foi utilizado como material de partida. A etapa chave para a síntese dos compostos foi através da reação de cicloadição 1,3-dipolar entre uma azida orgânica e um alcino terminal catalisada por cobre (I), que levou à obtenção dos 1,2,3-triazóis-1,4-disubstituídos de interesse (**4e**, **4f**, **4g** e **4h**) com rendimentos satisfatórios de 75%, 84%, 65% e 73%, respectivamente. Após sintetizados, todos os compostos foram quimicamente identificados por métodos espectroscópicos via Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C (Costa *et al.*, 2017).

Os derivados triazólicos **4e-4h** apresentados na Figura 1 foram avaliados quanto a atividade fungicida na inibição da germinação dos urediniosporos de *H. vastatrix*. As moléculas **4e**, **4g** e **4h** demonstraram eficácia satisfatória na inibição da germinação. Na Figura 2 estão demonstrados os valores de porcentagem de esporos não germinados para cada tratamento testado.

Figura 2 – Curva de inibição da germinação de urediniosporos de *Hemileia vastatrix* após 48 h de exposição às moléculas **4e**, **4f**, **4g**, e **4h** nas concentrações 0, 10, 25, 50, 75 e 100 ppm.



Fonte: Próprio autor.

Para este teste, o incremento da concentração favoreceu uma redução na porcentagem de esporos germinados, com valores de redução superiores à 50%, sendo o efeito mais pronunciado para os triazóis **4h** e **4g**.

Os compostos sintetizados também foram avaliados em relação aos valores de DE_{50} , que caracteriza a dose efetiva para inibir 50% da germinação de *H. vastatrix*, sendo apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Dose efetiva (DE₅₀) para reduzir 50% da germinação dos urediniósporos de *Hemileia vastatrix*.

Triazol	Equação	R ²	DE ₅₀ (ppm)
4e	Y = 32,6582+6,1031lnx	0,8193	16,10
4f	Y = 72,9025-5,3531lnx	0,8256	1,23
4g	Y = -10,9853+15,5728lnx	0,8575	50
4h	Y = 28,0118+6,0182lnx	0,7424	36

Fonte: Próprio autor.

De acordo com os dados apresentados, todos os triazóis testados apresentaram concentração ≤ 50 ppm para inibir 50% o crescimento de *H. vastatrix*, com destaque para o triazol **4f** que exibiu valor de DE₅₀ equivalente à 1,23 ppm, seguido pelo **4e** com valor de DE₅₀ de 16,10 ppm.

Discussão

A rota sintética empregada levou à obtenção dos intermediários (**1**), (**2**) e (**3**) com rendimentos satisfatórios de 63%, 75% e 93%, respectivamente, conforme descrito previamente na literatura (Costa *et al.*, 2017; 2020). A quarta e última etapa da síntese consistiu no preparo dos compostos 1,2,3-triazólicos derivados do glicerol **4e**, **4f**, **4g** e **4h**, via reação “click chemistry” entre a azida orgânica (**3**) e quatro alcinos terminais distintos, utilizando-se os solventes álcool *t*-butílico e água, sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄.5H₂O) como catalisador e ascorbato de sódio como agente redutor.

Na literatura há diversas metodologias descritas para a síntese de derivados 1,2,3-triazólicos. No presente trabalho foi adotada a reação de cicloadição inserida no conceito de reação “click”. Essa metodologia é a mais empregada por ser simples, rápida, facilmente executada em laboratório, possuir altos rendimentos e levar à formação exclusiva do regioisômero 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído (Lima, 2020). Estudos realizados demonstraram que essas características estão associadas ao emprego de sais de cobre (I) ou (II) na reação, uma vez que este catalisador é responsável por acelerar a reação numa escala de 10⁷ vezes em relação ao processo não catalisado. As características desta reação e sua aplicação no presente trabalho demonstram seu potencial promissor para obtenção de 1,2,3-triazóis (Fichtali *et al.*, 2016; Konwar *et al.*, 2016).

No ensaio germinativo, os triazóis **4e**, **4g** e **4h** apresentaram eficácia na redução da germinação dos urediniósporos com o aumento da concentração, demonstrando uma relação de proporcionalidade entre as variáveis. Dessa forma, à medida que se aumenta a concentração do composto, há aumento da redução da porcentagem de urediniósporos germinados, sendo o efeito mais pronunciado no triazol **4h**, na concentração de 100 ppm, com valor de percentual de inibição da germinação de 57,5%, seguido pelos compostos **4g** (53,4%), **4e** (48,5%) e **4f** (30,7%). A eficiência apresentada dos compostos testados pode ser atribuída à inibição da síntese do ergosterol observada nos fungicidas à base de triazóis, componente principal da membrana fúngica, causando alteração no funcionamento da membrana de permeabilidade, sendo tóxico para o fungo, assim como atuar como protetores, uma vez que desempenham ação tóxica sobre a formação do tubo germinativo e apressório do fungo (Forcelini, 1994; Lima *et al.*, 2023).

No teste antifúngico, os compostos **4e** e **4f** foram mais eficientes em relação à DE₅₀, apresentando valores mais baixos, enquanto os valores dos compostos **4g** e **4h** os classificaram como moderadamente eficientes. Nenhum dos compostos superou a potência do fungicida comercial contendo Flutriafol. Este efeito pode ser atribuído à ação inibição de desmetilação causada pelos triazóis, uma vez que ao entrarem em contato com células fúngicas fazem com que ocorra acúmulo de esteróis, provocando a inibição do processo de desmetilação do lanosterol, composto intermediário para formação do ergosterol. Os triazóis atuam de forma diferente das estrobilurinas, pois apresentam maior poder curativo que preventivo, causando inibição no desenvolvimento do haustório e/ou do crescimento micelial do fungo nos tecidos vegetais (Forcelini, 1994).

Conclusão

A síntese dos quatro 1,2,3-triazóis-1,4-dissubstituída (**4e-4h**) ocorreu a partir de transformações de grupos funcionais no material de partida o glicerol, através da utilização da reação “click”, a etapa chave da rota utilizada, sendo obtidos com rendimentos satisfatórios. Isso indica a eficácia da abordagem sintética adotada e a realização bem-sucedida das transformações promovidas, viabilizando sua aplicação na síntese de novos compostos.

Considerando o potencial fungicida que 1,2,3-triazóis apresentam, atrelado aos resultados satisfatórios obtidos, verifica-se que os novos derivados triazólicos sintetizados a partir do glicerol são eficientes sobre a germinação dos uredinísporos de *Hemileia vastatrix*. Desta forma, conclui-se que os triazóis (**4e-4h**) são promissores para serem utilizados no manejo da ferrugem do cafeeiro, apresentando atividade fúngica eficiente frente ao patógeno sem causar fitotoxicidade às plantas. No entanto, é vital a realização de investigações futuras que avaliem o mecanismo de ação *in vivo* desses compostos, com o intuito de desenvolver uma forma alternativa de controle químico econômica e ambientalmente mais viável contra *H. vastatrix*.

Referências

ALFONSI, W. M. V. *et al.* Período de incubação da ferrugem do cafeeiro. **Summa phytopathologica**, v. 45, n. 2, p. 134-140, 2019.

BELAN, L. L. *et al.* Standard area diagram with color photographs to estimate the & severity of coffee leaf rust in *Coffea canephora*. **Crop Protection**, v. 130, p. 105077, 2020.

BERRY, P.M. e SPINK, J.H. Understanding the effect of a triazole with anti-gibberellin activity on the growth and yield of oilseed rape (*Brassica napus*). **The Journal of Agricultural Science**, v. 147, n. 3, p. 273-285, 2020.

CAPUCHO, A.S. *et al.* Climate favourability to leaf rust in Conilon coffee. **Australasian Plant Pathology**, v. 42, p. 511-514, 2013.

COSTA, A. V. *et al.* Synthesis of novel glycerol-derived 1,2,3-triazoles and evaluation of their fungicide, phytotoxic and cytotoxic activities. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1666-1681, 2017.

COSTA, A. V. *et al.* Synthesis of glycerol-derived 4-alkyl-substituted 1,2,3-triazoles and evaluation of their fungicidal, phytotoxic, and antiproliferative activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, p. 821-832, 2020.

DHEER, D.; SINGH, V.; SHANKAR, R. Medicinal attributes of 1, 2, 3-triazoles: Current developments. **Bioorganic Chemistry**, v. 71, p. 30-54, 2017.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds. **Phytopathology**, v. 61, n. 1, p. 42-44, 1971.

FICHTALI, I. *et al.* Synthesis, characterization and antimicrobial activity of novel benzophenone derived 1,2,3-triazoles. **Journal of Materials and Environmental Science**, v. 7, n. 5, p. 1633-1641, 2016.

FORCELINI, C. A. Resistência de fungos a fungicidas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, 1994. v. 2, p. 335-355.

FORCELLINI, C.A.; GOELLNER, C.I.; MAY-DEMIO, L.L. Fungal resistance to fungicides. **Annual Review of Plant Pathology**. v. 9, p.339-381, 2001.

GICHURU, E. *et al.* Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*) in Kenya—A Review. **Agronomy**, v. 11, n. 12, p. 2590, 2021.

HINNAH, F.D. *et al.* Performance of a weather-based forecast system for chemical control of coffee leaf rust. **Crop Protection**, v. 137, p. 105225, 2020.

IBGE – PAM. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal**. (2022). Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>. Acesso em: 28 jul. 2024.

JIANG, J. *et al.* Effects of difenoconazole on hepatotoxicity, lipid metabolism and gut microbiota in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114844, 2020.

KONWAR, M. *et al.* Fehling solution/DIPEA/hydrazine: An alternative catalytic medium for regioselective synthesis of 1,4-disubstituted-1*H*-1,2,3-triazoles using azide-alkyne cycloaddition reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 40, p. 4473-4476, 2016.

LI, H. *et al.* Developmental toxicity, oxidative stress and immunotoxicity induced by three strobilurins (pyraclostrobin, trifloxystrobin and picoxystrobin) in zebrafish embryos. **Chemosphere**, v. 207, p. 781–790, 2018.

LIMA, L. E. B. de. “Click chemistry”: síntese, relação estrutura-atividade e avaliação in vitro de compostos híbridos inéditos de derivados de 1, 2, 3-triazol contra *Trypanosoma cruzi*. 2020. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

LIMA, A. M. A. *et al.* Synthesis and Fungicide Activity on *Asperisporium caricae* of Glycerol Derivatives Bearing 1,2,3-Triazole Fragments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 18, p. 6818-6829, 2023.

NAVARRO, R. *et al.* Manejo do solo para o sistema de cultivo do café no Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v. 18, n. 38, 2021.

PERUZZOLO, M. C.; DA CRUZ, B. C. F.; RONQUI, L. Polinização e produtividade do café no Brasil. **Pubvet**, v. 13, n. 4, p. 152, 2019.

ZAMANI-NOOR, N. e KNUFER, J. Effects of host plant resistance and fungicide application on phoma stem canker, growth parameters and yield of winter oilseed rape. **Crop Protection**, v. 112, p. 313–321.

ZAMBOLIM, L. *et al.* Traceable characteristics of the integrated management of coffee diseases, in: Zambolim, L. (Ed.), **Traceability for the coffee production chain**. Viçosa: Phytopathology Department, UFV, p.85–128, 2007.

Agradecimentos

Os autores do presente trabalho agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Grupo de Estudo Aplicado em Produtos Naturais e Síntese Orgânica (GEAPS), ao Laboratório de Síntese Orgânica (LaSO) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por todo apoio.