

SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DE 1,2,3-TRIAZÓIS OBTIDOS VIA CLICK CHEMISTRY CONTRA *Hemileia vastatrix*

Gisely Ferreira Moura¹, Aidene de Fátima Camilo Faria¹, Mariana Belizario 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, gisely.m.ferreira@gmail.com, aidenecfaria@gmail.com, vagner.queiroz@ufes.br, avcosta@hotmail.com.

²Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas/Departamento 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

A ocorrência de doenças fúngicas em culturas agrícolas representa uma ameaça significativa à produção global de diferentes commodities, como o café, acometido pela ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*. O controle desta doença pode ser feito com fungicidas contendo porção 1,2,3-triazólica, devido a ampla bioatividade que apresentam. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi sintetizar quatro novos 1,2,3-triazóis (4a-4d) derivados do glicerol e avaliar a atividade antifúngica contra a germinação de *H. vastatrix*. Os quatro 1,2,3-triazóis foram obtidos por uma rota sintética simples e de fácil execução, com rendimentos superiores a 65%. Os derivados foram submetidos a ensaios *in vitro* para verificar a inibição de uredíniosporos de *H. vastatrix*. Na maior concentração (100 ppm), o derivado 4c mostrou-se mais eficiente, exibindo percentual de inibição na germinação de 82,61%. Na avaliação dos valores de DE₅₀, o triazol 4b foi o composto mais eficaz (DE₅₀= 1 ppm), apresentando potencial fungistático para o manejo alternativo de *H. vastatrix*, a fim de garantir a qualidade na produção do cafeeiro.

Palavras-chave: Heterociclos nitrogenados. Ferrugem do cafeeiro. 1,2,3-Propanotriol.

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

Introdução

A ocorrência de diferentes doenças fúngicas em culturas agrícolas brasileiras representa uma ameaça significativa à produção global de diferentes *commodities*, como o café, podendo ocasionar déficits econômicos significativos, além de perdas na produção e qualidade do produto (Guimarães *et al.*, 2019). A cafeicultura é uma atividade econômica de extrema importância tanto no cenário nacional quanto internacional. O Brasil se destaca como uma grande potência cafeeira, liderando o ranking de maior produtor e exportador de café, contribuindo com uma produção equivalente a 36,8% do total produzido (OIC, 2024; USDA, 2023). A produção nacional se concentra principalmente na região Sudeste, com destaque para o estado do Espírito Santo, reconhecido como um grande produtor e exportador do produto (CONAB, 2024; INCAPER, 2024; Soela *et al.*, 2020).

A principal doença que afeta o cultivo do café é a ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo *H. vastatrix*. A ferrugem se manifesta inicialmente através de manchas amarelas nas folhas que evoluem para pústulas com esporos de coloração alaranjada, podendo causar queda prematura das folhas e na secagem dos ramos (Belan *et al.*, 2020; Talhinhos *et al.*, 2017; Ventura *et al.*, 2017). O manejo integrado dessa doença é comumente feito através do controle químico, devido ao seu relativo baixo custo e facilidade de implementação, sendo feito através da aplicação de fungicidas sistêmicos à base de cobre, triazóis e estrobilurinas nas lavouras (Belan *et al.*, 2020; Hinnah *et al.*, 2020).

Os triazóis, devido à alta estabilidade química e fitoquímica e baixa biodegradabilidade, são o principal e maior grupo de compostos utilizados para o controle da ferrugem, fazendo-se necessária uma busca contínua de novas alternativas para síntese de novos compostos contendo fragmento

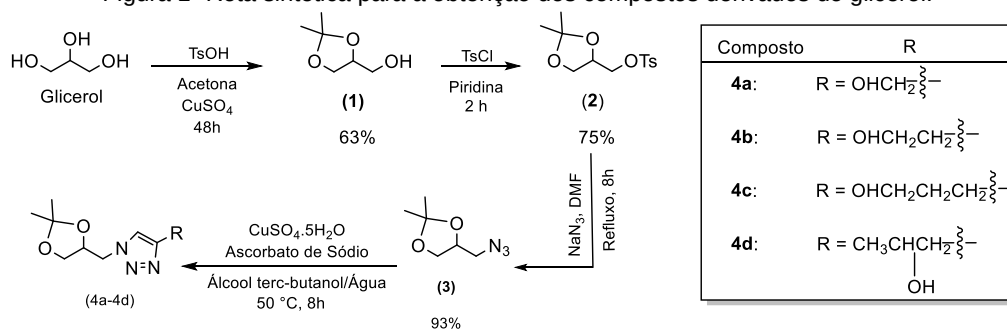
triazólico (Jiang *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2018). Os triazóis, que podem existir de duas formas distintas 1,2,3-triazóis e 1,2,4-triazóis, apresentam ampla bioatividade, incluindo a fungicida, sendo considerados compostos promissores para o controle de diversos patógenos.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar quatro 1,2,3-triazóis derivados do glicerol (4a-4d), empregando a reação *click chemistry*, e avaliar a atividade antifúngica contra a germinação de *H. vastatrix*, agente causador da ferrugem em café conilon.

Metodologia

Os quatro 1,2,3-triazóis (4a-4d) utilizados para a realização do presente trabalho foram obtidos por uma rota sintética simples e de fácil execução, realizada em 4 etapas e utilizando o glicerol, um subproduto da produção de biodiesel, como material de partida, como relatado na literatura por Costa *et al.*, (2017) (Figura 1).

Figura 1- Rota sintética para a obtenção dos compostos derivados do glicerol.



Fonte: Os autores.

Para obtenção dos derivados triazólicos, foram adicionados a um balão de fundo redondo a azida (1,00 g, 6,40 mmol), com os diferentes alcinos terminais (9,60 mmol), em solução aquosa de álcool terc-butilico (1:1 v v⁻¹), solução aquosa de CuSO₄.5H₂O (0,100 mol L⁻¹, 1,00 mL, 0,0960 mmol) e ascorbato de sódio (0,0600 g, 0,288 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação à 50 °C durante um período de 8 horas. Após o fim da reação, a fase orgânica foi extraída a partir de lavagens com diclorometano (20,0 mL) e os 1,2,3-triazóis (4a, 4b, 4c e 4d) obtidos foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel. Posteriormente, as estruturas foram elucidadas pela análise dos espectros de infravermelho, massas e RMN de ¹H e ¹³C.

Em seguida, os derivados triazólicos foram submetidos a ensaios *in vitro* para verificar a sua atividade antifúngica contra a germinação de *H. vastatrix*, nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 ppm. A metodologia foi adaptada de acordo com Capucho *et al.* (2012) e Pierozzi (2013). Para análise da inibição da porcentagem de germinação, foram utilizadas placas de petri contendo meio de cultura ágar-água e os derivados triazólicos. Após a aplicação das dosagens, as placas foram levadas para BOD a 22 °C ± 1,1 °C na ausência de luz. Após um período de 48 h foi realizada a contagem dos urediniosporos germinados. O procedimento foi repetido para cada composto sintetizado.

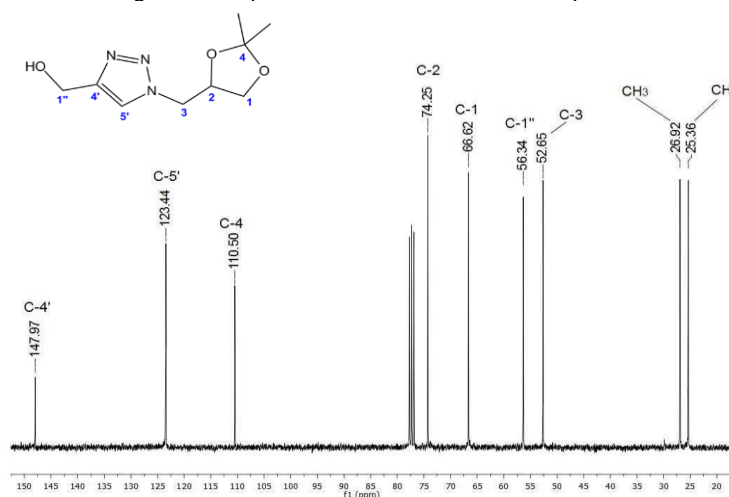
Resultados

Os 1,2,3-triazóis (4a-4d) foram sintetizados a partir do glicerol através de uma rota sintética rápida, barata e de fácil execução (Figura 1). Na primeira etapa reacional foi realizada a condensação do glicerol, em meio ácido, sulfato de cobre anidro e acetona como solvente da reação para formação produto formado (1) com rendimento de 63%. Em seguida, o composto (2) foi obtido com rendimento de 75% a partir da reação entre cloreto de tosila e (1), utilizando piridina como solvente. Na terceira etapa, ocorreu a reação de formação da azida (3), a partir da interação entre azida de sódio e (2) na presença de cloreto de amônio e dimetilformamida, sendo obtida com rendimento de 93%. A quarta e última etapa retrata o preparo dos derivados triazólicos (4a-4d) através da reação de cicloadição 1,3-dipolar entre a azida (3) e quatro alcinos terminais distintos, utilizando-se álcool *t*-butilico e água como

solvente, sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) como catalisador e ascorbato de sódio como agente redutor. Os 1,2,3-triazóis (4a-4d) foram obtidos com rendimentos superiores à 60% (Figura 1).

Todos os compostos sintetizados tiveram suas estruturas confirmadas por métodos espectroscópicos de Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C e Espectrometria de Massa. Na Figura 2 está representado o espectro de RMN de ^{13}C do triazol 4a.

Figura 2 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4a.

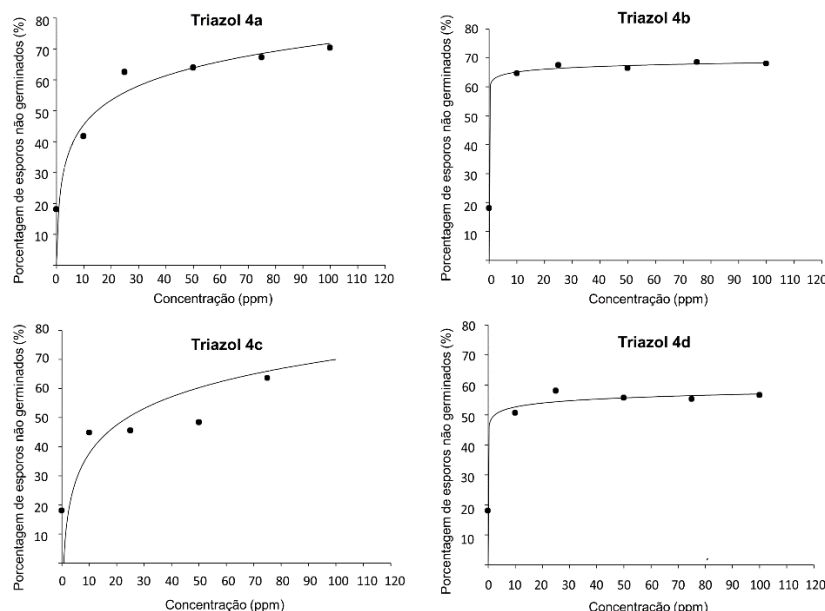


Fonte: Os autores.

Com base neste espectro de RMN de ^{13}C , observou-se que o número de sinais apresentados está em total acordo com o número de carbonos da estrutura proposta para o composto 4a. Além disso, identificou-se os sinais referentes aos carbonos do anel triazólico, representados em δ_{C} 123,6 e δ_{C} 148,0 e atribuídos aos carbonos C-5 e C-4, e o sinal referente ao C-1', ligado diretamente a hidroxila, pode ser evidenciado em δ_{C} 56,34, indicando a presença do grupo substituinte no anel triazólico.

Uma vez sintetizados e inequivocamente caracterizados, os compostos triazólicos (4a-4d) foram submetidos a ensaios *in vitro* a fim de verificar a inibição do crescimento de urediniósporos de *H. vastatrix*, nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 ppm, por um período de 48h (Figura 3).

Figura 3 - Curva de inibição da germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* após 48 h.



Fonte: Os autores.

De acordo com os dados apresentados na Figura 3, observa-se que os derivados triazólicos 4a e 4c apresentam uma redução na porcentagem de esporos germinados do fungo, conforme ocorre aumento das concentrações testadas. Já os triazóis 4b e 4d, não apresentaram diminuição expressiva na inibição da germinação com o aumento da concentração. Na concentração de 100 ppm, o triazol 4c demonstrou maior potencial fungicida, apresentando maior valor de porcentagem de inibição na germinação do fungo (82,61%), seguido pelos triazóis 4a (70,26%), 4b (68,00%) e 4d (56,58%).

Os quatro triazóis também foram avaliados quanto ao seu potencial para inibir em 50% o crescimento do fungo testado (DE₅₀) (Tabela 1). Todos os triazóis testados apresentaram valores de DE₅₀ inferiores à 24 ppm, com destaque para o triazol 4b e 4d que exibiram os menores valores de 1 e 2 ppm, respectivamente.

Tabela 1 - Dose efetiva (DE₅₀) para reduzir 50% da germinação de *H. vastatrix* de triazóis 4a-4d.

Triazol	Equação	R ²	DE ₅₀ (ppm)
4a	$Y = 19,0971 + 11,4346 \ln x$	0,9384	15,00
4b	$Y = 61,9835 + 1,3806 \ln x$	0,9152	1,00
4c	$Y = 5,5209 + 14,0152 \ln x$	0,8339	23,52
4d	$Y = 48,3303 + 1,8821 \ln x$	0,8431	2,00

Fonte: Os autores.

Discussão

De acordo com a literatura, existem várias metodologias utilizadas para obtenção de 1,2,3-triazóis. Atualmente, método mais comumente empregado envolve a reação de cicloadição 1,3-dipolar entre azidas orgânicas e alcinos terminais, uma vez que são estes são compostos de fácil preparação em laboratório, sendo capazes de aceitar diferentes grupos funcionais e condições reacionais (Costa *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2022). Esse tipo de reação é classificado como reação *click*, sendo altamente eficiente para formação regioespecífica, rápida e eficiente dos derivados triazólicos de interesse. (Dheer; Singh; Shankar, 2017). A partir do glicerol e do emprego da reação *click*, os triazóis 4a, 4b, 4c e 4d foram obtidos com rendimentos de 76%, 82%, 68% e 75%, respectivamente, demonstrando sua eficiência. Uma vez sintetizados, a caracterização química realizada por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C permitiram a elucidação estrutural de cada composto e confirmaram as estruturas esperadas, demonstrando que as substituições realizadas de fato aconteceram e foram bem sucedidas. Resultados semelhantes foram encontrados por Costa *et al.* (2017; 2020) e Lima *et al.* (2024) quando realizaram a caracterização de derivados triazólicos do glicerol e eugenol.

No intuito de desenvolver novos compostos biologicamente ativos, os triazóis formados foram submetidos a testes *in vitro* para avaliação do potencial fungistático contra a germinação de *H. vastatrix*. A avaliação *in vitro* revelou que todos os derivados apresentaram bons resultados na redução dos esporos germinados. Na maior concentração (100 ppm), o derivado 4c mostrou-se mais eficiente, exibindo percentual de inibição na germinação de 82,61%. Em relação aos valores de DE₅₀, o triazol 4b apresentou menor concentração (1 ppm) para inibir 50% do fungo, indicando a alta eficácia deste composto na diminuição da germinação de esporos *H. vastatrix* quando comparado aos demais triazóis.

De modo geral, os quatro triazóis testados foram capazes de comprometer a sobrevivência de *H. vastatrix*, possivelmente atuando como bloqueadores na conversão da enzima lanosterol 14α-desmetilase em ergosterol, causando um desequilíbrio entre os lipídios das membranas do fungo e interferindo no seu desenvolvimento (Costa *et al.*, 2017; 2020). Lima *et al.* (2024) também realizaram a síntese de novos compostos 1,2,3-triazólicos derivados do eugenol e avaliaram seu potencial antifúngico na redução do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, responsável por causar perdas significativas na cultura do mamoeiro. Os autores identificaram que dentre os dezenove compostos sintetizados (5a-5s), os compostos 5k, 5l, 5m e 5n apresentaram maior efeito inibitório com percentual de inibição ao crescimento dos micélios de 88,3%, 85,5%, 82,4% e 81,4%, respectivamente. A

investigação realizada pelos autores demonstra o potencial de derivados triazólicos para aplicações futuras, podendo ser incorporados em novos fungicidas, para controle da antracnose do mamoeiro como método alternativo ao fungicida comercialmente utilizado, o Tebuconazol.

Conclusão

As transformações químicas realizadas no substrato de partida, o glicerol, foram realizadas em quatro etapas reacionais que garantiram a formação seletiva de quatro derivados 1,2,3-triazólicos-1,4-dissubstituídos (4a-4d) com rendimentos superiores a 65%, evidenciando a eficiência de reações do tipo “click chemistry” no desenvolvimento de derivados bioativos promissores para o controle de patógenos.

O teste biológico realizado indicou o potencial fungistático dos triazóis em inibir a germinação dos urediniósporos de *H. vastatrix*, com destaque para o triazol 4b, capaz de inibir 50% da germinação dos esporos na concentração de 1 ppm e para o triazol 4c que inibiu 82,61%. Dessa forma, os derivados 1,2,3-triazólicos (4a-4d) obtidos a partir do glicerol apresentam-se promissores para utilização como um futuro biofungicida. Entretanto, novos testes *in vivo* e com maiores concentrações devem ser realizados para avaliar o potencial fitotóxico destes compostos em plantas, bem como sua capacidade em inibir completamente o desenvolvimento do fungo.

Referências

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.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café, Brasília**, DF, v. 10, n. 2, segundo levantamento, maio, 2023. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe/boletim-da-safra-de-cafe>>. Acesso em: 29 jul. 2024.

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.

GUIMARÃES, R. J. *et al.* Coffee growing and post-harvest processing. In: FARAH, A. **Coffee Production, Quality and Chemistry**. London: The Royal Society of Chemistry, 2019, p. 150-178.

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.

INCAPER - Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. **Cafeicultura**. Disponível em: <<https://incaper.es.gov.br/cafeicultura>>. Acesso em: 12 agosto 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.

KOLB, H. C.; SHARPLESS, K. B.; FINN, M. G. Click Chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, n. 11, p. 2004-2021, 2001.

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, A. M. A. *et al.* Design and synthesis of eugenol derivatives bearing a 1, 2, 3-triazole moiety for papaya protection against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 72, n. 22, p. 12459-12468, 2024.

OIC - Organização Internacional do Café. **Relatório sobre o mercado do café (2021/2022) - Setembro de 2022**. Disponível em: < <https://www.ico.org/documents/cy2021-22/cmr-0922-p.pdf> >. Acesso em: 12 de agosto de 2024.

OLIVEIRA, M. B. de *et al.* A reação CuAAC (reação click): Aspectos químicos, mecanísticos e alguns exemplos de sua utilização na preparação de compostos com interesse agroquímico. In: COSTA, A. V. *et al.* **Tópicos Especiais em Agroquímica II**. Vitória: UFES, 2022. 300 p

SOELA, D. M. *et al.* Controle estatístico de processo em pulverização usando veículo aéreo não tripulado na cultura do café conilon. **Brazilian Journal of Production Engineering**, v. 6, n. 4, p. 52-63, 2020.

TALHINHAS, P. *et al.* The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: One and a half centuries around the tropics. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, p. 1039-1051, 2017.

USDA - United States Department of Agriculture. **Coffee: World Markets and Trade**. 2023. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf>>. Acesso: 12 de agosto 2024.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; LIMA, I. M. Manejos das doenças do cafeeiro conilon. In: FERRÃO, R. G. *et al.* **Café Conilon**. 2ª Edição. Vitória, ES. 2017. p. 435-479.

ZAMANI-NOOR, N.; KNÜFER, 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, 2018.

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.