

A REAÇÃO CLICK NA SÍNTESE DE NOVOS 1,2,3-TRIAZÓIS DERIVADOS DO GLICEROL COMO POTENCIAIS FUNGICIDAS

William dos Santos Belarmino¹, Walter Cesar Celeri Bigui², Quésia Helena Campos Serpa¹, Tatiane Paulino da Cruz³, Vagner Tebaldi de Queiroz¹, Waldir Cintra de Jesus Junior³, 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, santoswilliam_s@hotmail.com, quesiacamposh7@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, walter.bigui@edu.ufes.br.

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

Resumo

O fungo *Hemileia vastatrix* é responsável por causar a ferrugem da folha do café, uma doença devastadora que ataca os cafeeiros, resultando na perda de colheitas e até na destruição de plantações inteiras. Devido ao potencial biológico que apresentam, o uso de 1,2,3-triazóis mostra-se promissor para o controle de diferentes microrganismos. Neste estudo o objetivo foi sintetizar e avaliar a atividade fungicida de derivados de 1,2,3-triazóis do glicerol (**4i-4l**) contra *H. vastatrix*. Os quatro 1,2,3-triazóis foram sintetizados com rendimentos superiores a 75%, por uma rota rápida e através da reação *Click Chemistry*. O teste fungicida foi realizado em placas de petri contendo diferentes concentrações dos triazóis. Os resultados obtidos foram bastante promissores, com valores de DE₅₀ para de 5, 12, 14 e 28 ppm para cada triazol avaliado (**4i-4l**), respectivamente. Este achado sugere que os triazóis sintetizados a partir do glicerol possuem um grande potencial como agentes fungicidas inibindo a síntese de ergosterol, oferecendo uma possível solução para o controle eficaz da ferrugem do café e contribuindo para a sustentabilidade da produção do café.

Palavras-chave: Antifúngico. *Hemileia vastatrix*. Cicloadição 1,2,3-dipolar. Café conilon

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra - Química

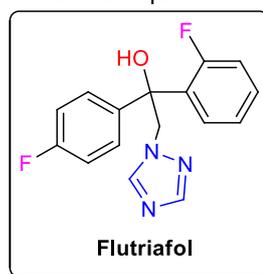
Introdução

O Brasil lidera a produção mundial de café, sendo o maior produtor da espécie do gênero *Coffea arabica* e o segundo maior da *C. canephora* (MAPA, 2024). O país exportou 24.6 milhões de sacos de 60 kg de café durante os primeiros seis meses de 2024, resultado que representa um aumento de 48.8% em relação ao mesmo período em 2023 (CONAB, 2024). No entanto, várias doenças ameaçam a produção, qualidade e exportação desta *commodity*.

O fungo patogênico *Hemileia vastatrix* é o agente causador da ferrugem do café, uma das doenças mais devastadoras que afetam as plantações de café em todo o mundo. Esse fungo ataca as folhas da planta, causando manchas amareladas que eventualmente levam à queda das folhas, resultando em uma redução significativa na capacidade da planta de realizar a fotossíntese e conseqüentemente, numa diminuição da produção de até 50% (Fazuoli *et al.*, 2007; Silva, 2017).

O uso de fungicidas protetores e sistêmicos à base de núcleos triazólicos é uma das principais estratégias utilizadas no controle da ferrugem, como o Flutriafol Nortox (Figura 1) (Belan *et al.*, 2020). Embora existam formas efetivas de controle, é relatado na literatura o desenvolvimento de resistência do patógeno frente aos fungicidas comerciais utilizados, motivando uma busca contínua por novos compostos que sejam eficazes puros ou associados a outros produtos a fim de melhorar o cultivo de café (Oliveira *et al.*, 2021).

Figura 1 - Estrutura química do flutriafol.



Fonte: os autores.

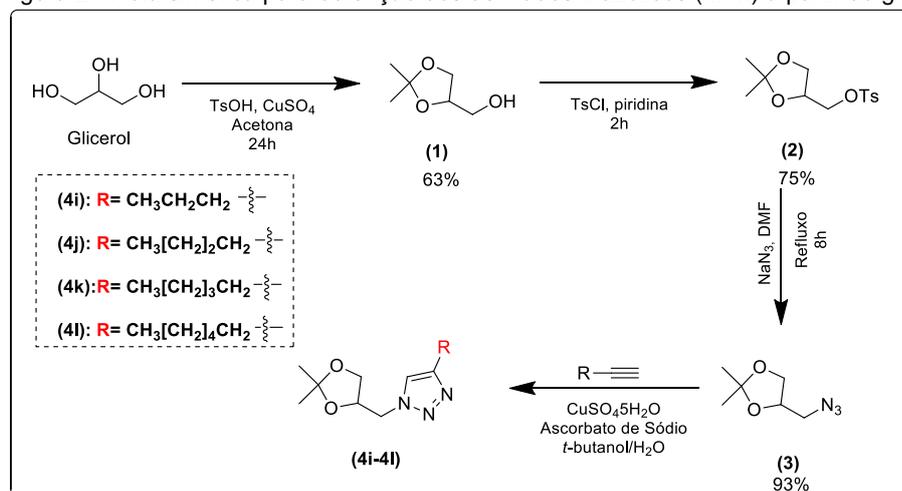
Os triazóis são uma classe de compostos sistêmicos que apresentam diversas aplicações biológicas, incluindo a antibacteriana, antifúngica, antiviral, leishmanicida, dentre outras (Costa *et al.*, 2020; Hussain *et al.*, 2019; Rashdan *et al.*, 2021; Teixeira *et al.*, 2018). Os triazóis podem existir de duas formas isoméricas: 1,2,3-triazóis e 1,2,4-triazóis, ambos de origem exclusivamente sintética (Melo *et al.*, 2006). Os 1,2,3-triazóis podem ser facilmente sintetizados e obtidos com altos rendimentos por reações de cicloadição 1,3-dipolar catalisadas por cobre entre alcinos e azidas, enquadradas dentro do conceito de *Click Chemistry*. Geralmente, as reações *click* são aplicadas para unir dois ou mais grupos químicos a fim de obter novos compostos com atividade biológica potencializada em relação aos grupos isolados (Ouyang *et al.*, 2018).

O glicerol é um dos subprodutos gerados em excesso na produção do biodiesel. Com a produção contínua desse biocombustível e, conseqüentemente do glicerol, surge a necessidade de desenvolver novas estratégias para utilizar o material excedente, evitando impactos ambientais (Peiter *et al.*, 2016). Esse álcool e seus derivados já são empregados em rotas sintéticas para obtenção de diversos compostos orgânicos, como os 1,2,3-triazóis (Costa *et al.*, 2017; Barcelos *et al.*, 2023). Diante disso, o presente estudo teve como objetivo sintetizar e investigar a eficácia de compostos 1,2,3-triazólicos derivados do glicerol no controle da ferrugem foliar do café conilon (*H. vastatrix*), visando desenvolver compostos mais eficazes contra fungos.

Metodologia

Os compostos triazólicos derivados do glicerol (**4i-4l**) foram sintetizados por meio da reação de cicloadição 1,3-dipolar (reação "*Click Chemistry*") entre uma azida orgânica e um alcino terminal (Figura 2). Esta metodologia é amplamente reconhecida pela sua eficiência e seletividade, além de ser documentada na literatura (Costa *et al.*, 2017; 2020).

Figura 2 - Rota sintética para obtenção dos derivados triazólicos (**4i-4l**) a partir do glicerol.



Fonte: os autores.

O teste *in vitro* para avaliação da germinação foi realizado usando urediniósporos coletados de plantações de café conilon naturalmente infectadas por *H. vastatrix*. As pústulas foram raspadas suavemente com uma escova de cerdas macias e armazenadas em tubos falcon de 15 mL. Para cada um dos triazóis testados (**4i-4l**) foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada para se obter as concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 ppm. Posteriormente, placas de poliestireno foram preparadas contendo meio de cultura ágar-água. Para cada concentração dos quatro derivados triazólicos, o meio ágar-água foi devidamente misturado com as soluções de triazol correspondentes. Discos de 5 mm de diâmetro desse meio foram colocados no centro das placas de Petri. Em seguida, 20 μ L de uma suspensão contendo 5×10^4 urediniósporos/mL de *H. vastatrix* foram pipetados e dispostos sobre cada disco. As placas de Petri contendo os discos de ágar-água-triazol com a suspensão de urediniósporos foram seladas e incubadas em uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO), ajustada para manter uma temperatura constante de 22 °C. A incubação foi realizada por um período de 48 horas na ausência de luz, para simular condições ideais para a germinação dos urediniósporos de *H. vastatrix*. Após 48 horas, os urediniósporos germinados foram contabilizados sob um microscópio óptico. O controle negativo (CN) utilizado foi DMSO, enquanto o controle positivo foi o fungicida comercial Flutriafol. O experimento foi repetido para cada triazol testado.

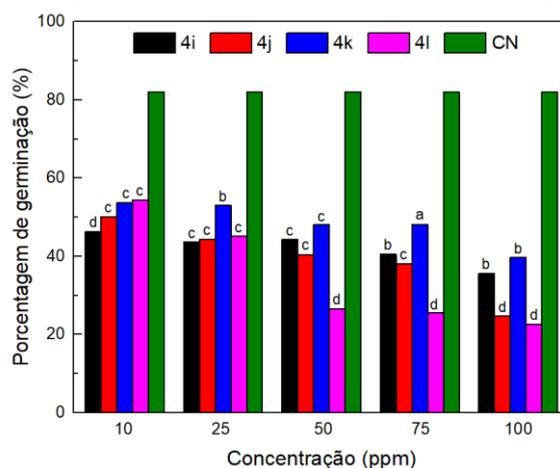
Resultados

As transformações químicas realizadas no glicerol forneceram os intermediários (**1**), (**2**) e (**3**) com rendimentos de 63%, 75% e 93%, respectivamente. Para formação do acetal (**1**), o glicerol sofreu condensação na presença de acetona como solvente e ácido *p*-toluenossulfônico como catalisador, durante um período de 24 h. Em seguida, a reação entre (**1**) e cloreto de *p*-toluenossulfonila, na presença de piridina como solvente, levou a obtenção de (**2**) após 2 h de reação. A conversão do acetal (**2**) na azida orgânica (**3**) foi realizada a partir da substituição nucleofílica do grupo tosila pelo grupamento azida, na presença de azida de sódio em dimetilformamida e refluxo de 60 °C durante 8 h.

A partir do glicerol também foi possível garantir a obtenção exclusiva de quatro 1,2,3-triazóis-1,4-dissubstituídos (**4i-4l**), através da reação *click* entre a azida (**3**) e os diferentes alcinos terminais, usando uma quantidade catalítica de sulfato de cobre, ascorbato de sódio como agente redutor e álcool *t*-butílico e água como solventes. Os derivados **4i**, **4j**, **4k** e **4l** foram obtidos com rendimentos de 85%, 93%, 87% e 75%, respectivamente.

Os compostos sintetizados foram submetidos a ensaios biológicos. A porcentagem de germinação de urediniósporos de *Hemileia vastatrix*, avaliada em testes *in vitro* por meio da interação com os novos triazóis (**4i-4l**), demonstrou eficácia moderada para todos os quatro compostos investigados (Figura 3).

Figura 3 - Germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* (%) sob os efeitos dos triazóis **4i-4l** em comparação ao controle negativo DMSO (CN) nas diferentes concentrações (ppm).



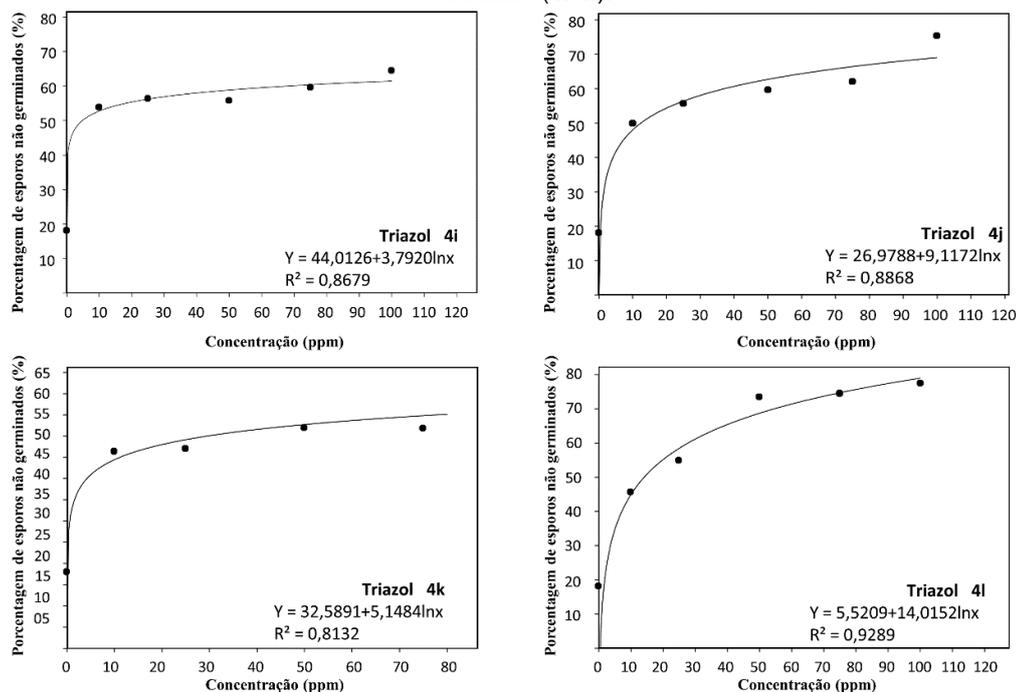
Fonte: os autores.

Todos os triazóis testados reduziram a germinação do fungo conforme há um aumento da concentração, indicando uma correlação positiva entre a concentração dos triazóis e a inibição da

germinação dos esporos. O derivado triazólico **4i** mostrou-se promissor, sendo mais efetivo nas concentrações de 50, 75 e 100 ppm, seguido pelo **4j** nas mesmas concentrações. Na maior concentração testada (100 ppm), todos os derivados foram capazes de inibir a germinação do fungo, sendo a porcentagem de germinação de 22,59% (**4i**), 24,75% (**4j**), 35,57% (**4i**) e 39,65% (**4k**).

Com base na dose efetiva para inibir 50% da germinação do fungo (DE₅₀) (Figura 4), os triazóis apresentaram valores de DE₅₀ de 5 ppm (**4i**), 12 ppm (**4j**), 14 ppm (**4i**) e 28 ppm (**4k**).

Figura 4 - Curva de dose efetiva (DE₅₀) para inibir 50% da germinação de *H. vastatrix* frente aos triazóis testados (**4i-4l**).



Fonte: os autores.

Discussão

Os 1,2,3-triazóis são estruturas versáteis e apresentam ampla aplicação em várias áreas, incluindo química medicinal, ciência dos materiais e bioconjugação, sendo estruturas-alvo de diversas estratégias sintéticas, como aquela demonstrada na Figura 2. No presente trabalho, os quatro 1,2,3-triazóis foram obtidos com altos rendimentos, possivelmente devido ao emprego do cobre como catalisador na reação. A presença desse metal pode aumentar a velocidade da reação na ordem de até 7 vezes, além de favorecer o processo de anelação de forma regioseletiva e levar a formação exclusiva do regioisômero 1,4-dissubstituído (Freitas *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2006;). Os resultados obtidos estão de acordo com os estudos conduzidos por Costa *et al.* (2017) e Barcelos *et al.* (2022).

Uma vez sintetizados, os 1,2,3-triazóis podem atuar como fungicidas alternativos no combate de diferentes patógenos. Fungicidas são substâncias que desempenham papel crucial no meio agrícola, auxiliando no combate de diversas doenças que podem devastar plantações inteiras trazendo grande prejuízo econômico. Nesse estudo foi avaliado a eficácia fungicida de derivados triazólicos do glicerol frente à ferrugem do cafeeiro.

A partir dos testes realizados, foi possível observar que os triazóis apresentaram altas taxas inibitórias na germinação dos urediniósporos de *H. vastatrix*. Diferenças estatísticas significativas foram observadas entre os triazóis em cada concentração específica, indicando níveis distintos de eficácia entre os compostos. Embora todos os triazóis tenham demonstrado eficácia na redução de urediniósporos, os derivados **4i** e **4j** foram os mais eficazes na concentração máxima testada. O derivado triazólico, **4i**, também mostrou-se promissor, com potencial para inibir 50% da germinação dos esporos de *H. vastatrix*.

De modo geral, os triazóis são capazes de desempenhar ação tóxica sobre tubo germinativo e também de impedir o crescimento de esporos de patógenos, agindo na inibição da enzima lanosterol 14 α -desmetilase, responsável pela síntese de ergosterol, um componente crucial da membrana celular dos fungos. A ausência de ergosterol afeta a integridade da membrana fúngica, impedindo seu crescimento (Caramalho et al., 2017).

Na literatura, trabalhos sobre 1,2,3-triazóis obtidos a partir do glicerol também demonstraram alto percentual de inibição na germinação de esporos fúngicos. Lima *et al.* (2023) realizaram a síntese de derivados triazólicos do glicerol e também avaliaram o efeito fungicida na inibição da germinação de esporos de *Asperisporium caricae*, que acomete a cultura do mamoeiro. Os autores encontraram resultados promissores e concluíram que os derivados do glicerol contendo fragmento 1,2,3-triazólico representam uma alternativa inovadora de controle, podendo ser utilizados para o desenvolvimento de novos produtos agrícolas mais eficazes na inibição da proliferação do fungo e menos prejudicial à saúde humana e ao meio ambiente.

Conclusão

No presente estudo foi relatada a síntese eficiente e rápida de quatro derivados triazólicos (**4i-4l**), utilizando o glicerol como material de partida e através da reação *click*. Os triazóis apresentaram altos rendimentos (75-93%), indicando a eficiência da metodologia empregada para obtenção destes compostos bioativos e para redução na quantidade de resíduo de glicerol gerado na produção do biodiesel.

No ensaio fungicida, os quatro derivados triazólicos (**4i-4l**) apresentaram potencial ação inibitória sobre o crescimento de *H. vastatrix*, com destaque para o triazol **4l**, que resultou na maior quantidade de esporos não germinados. Na análise dos valores de DE₅₀, os compostos de interesse também se mostraram eficazes para inibir 50% da germinação, em especial o triazol **4l** com menor valor de DE₅₀ (5 ppm). Dessa forma, todos os compostos testados podem ser considerados como potencial fungicidas para o controle da ferrugem do cafeeiro, sendo necessário a realização de estudos adicionais *in vivo* e em diferentes concentrações para avaliar a fundo o mecanismo de ação destes compostos contra a ferrugem foliar do cafeeiro.

Referências

BARCELOS, F. F. *et al.* Synthesis of glycerol-fluorinated triazole derivatives and evaluation of their fungicidal activity. **Química nova**, v. 45, n. 00, p. 788-796, 2022.

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.

CARAMALHO, R. *et al.* Intrinsic short-tailed azole resistance in mucormycetes is due to an evolutionary conserved aminoacid substitution of the lanosterol 14 α -demethylase. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Café - Conjuntura semanal**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-de-conjunturas-de-cafe/item/24090-cafe-conjuntura-semanal-29-07-2024>. 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.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. **Sumário executivo café - julho 2024.**

(2024). Disponível em:

https://www.concorciopesquisacafe.com.br/imagens/stores/noticias/2021/2024/julho/Sumario_cafe_%20julho_2024.pdf. Acesso em: 12 ago. 2024.

FAZUOLI, L. C. *et al.* Ferrugem alaranjada do cafeeiro e a obtenção de cultivares resistentes. **O Agrônomo**, v. 59, n. 1, p. 48-53, 2007.

FREITAS, R. P. *et al.* A reação “click” na síntese de 1,2,3-triazóis: aspectos químicos e aplicações. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1791-1804, 2011.

HUSSAIN, M. *et al.* Synthesis, antibacterial activity and molecular docking study of vanillin derived 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles as inhibitors of bacterial DNA synthesis. **Heliyon**, v. 5, n. 11, 2019.

LIMA, A. M. A. *et al.* Síntese e atividade fungicida sobre *Asperisporium caricae* de derivados de glicerol contendo fragmentos de 1,2,3-triazol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 18, p. 6818-6829, 2023.

MELO, J. O. F. *et al.* Heterociclos 1,2,3-triazólicos: Histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 569–579, 2006.

OLIVEIRA, A. C. B. de *et al.* **Cultivares de café resistentes à ferrugem: Alternativa viável para a cafeicultura das Matas de Minas.** Brasília, DF: Embrapa Café, 2021.

OUYANG, T. *et al.* Recent trends in click chemistry as a promising technology for virus-related research. **Virus Research**, v. 256, p. 21-28, 2018.

PEITER, G. C. *et al.* Alternativas para o uso do glicerol produzido a partir do biodiesel. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 5, n. 4, p. 519-537, 2016.

RASHDAN, H. R. *et al.* Synthesis and identification of novel potential thiadiazole based molecules containing 1, 2, 3-triazole moiety against COVID-19 main protease through structure-guided virtual screening approach. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, p. 3602-3623, 2021.

SILVA, R. A. **Caracterização de raças fisiológicas e análise de proteínas candidatas a efetoras na população de *Hemileia vastatrix* no Brasil.** 2017. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

TEIXEIRA, R. R. *et al.* Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 146, p. 274- 286, 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.