

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE 1,2,3-TRIAZÓIS DERIVADOS DO TIMOL CONTRA *Aspergillus niger*

Aidene de Fátima Camilo Faria¹, Quésia Helena Campos Serpa¹, Mariana Belizário de Oliveira², Leandra Martins Meireles³, Vagner Tebaldi de Queiroz¹, Rodrigo Scherer³, 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, quesia.serpa@edu.ufes.br, 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 Vila Velha, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Comissário José Dantas de Melo St., Boa Vista - 29102-770 - Vila Velha-ES, Brasil, leandramartinsmeireles@gmail.com, rodrigo.scherer@uvv.br.

Resumo

As culturas agrícolas são constantemente ameaçadas por fungos e, entre as doenças que as acometem e geram prejuízos econômicos, o mofo preto, causado pelo patógeno *Aspergillus niger*, está entre as mais incidentes. O método de controle principal é o uso de fungicidas comerciais. Entretanto, o uso indevido destes produtos facilita o surgimento de resistência fúngica, demandando métodos alternativos. Desta forma, objetivou-se sintetizar três 1,2,3-triazóis (**3a-3c**) derivados do timol, um fenol natural, e avaliar sua atividade antifúngica frente a *A. niger*. Os triazóis foram preparados através de uma rota sintética de três etapas, na qual a etapa principal foi a reação *click*, obtidos com rendimentos de 53 a 70% e caracterizados via métodos de Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e de ¹³C, e Espectrometria de Massas. Os compostos foram avaliados quanto à sua atividade fungicida na inibição de esporos de *A. niger* nas concentrações de 300 µg/mL a 0,58 µg/mL, em duplicata. Os triazóis (**3a-3c**) apresentaram efeito fungistático promissor frente ao fungo, destacando-se o composto **3b**, que apresentou o menor valor de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Palavras-chave: Mofo preto. *click chemistry*. Fenol natural. Fungicidas.

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

Introdução

Culturas agrícolas são frequentemente afetadas por microrganismos, como bactérias, fungos, vírus e alguns parasitas, os quais comprometem o desenvolvimento vegetal e a qualidade dos frutos, ocasionando perdas produtivas e econômicas relevantes. A infecção causada por esses agentes pode comprometer o desenvolvimento das plantas e a qualidade de seus frutos, resultando em perdas expressivas na produção e, consequentemente, em impactos econômicos significativos (Gai; Wang, 2024).

Dentre as doenças ocasionadas por fungos, o *Aspergillus niger*, comumente chamado de mofo preto, é um patógeno encontrado no ar, água e solo, que acomete frutas e legumes levando à sua degradação (Gautam *et al.*, 2011). O mofo preto é a principal doença fúngica que afeta as tâmaras, e é característica pela baixa ocorrência de sintomas visíveis, observados em menos de 10% dos frutos. Tal particularidade deve-se ao fato de o desenvolvimento da infecção ocorrer predominantemente no interior das frutas (Cohen *et al.*, 2021). Outras culturas como as de uva, amendoim e cebola também estão entre as principais a serem acometidas por esta doença (Palencia; Hinton; Bacon, 2010). Os métodos de controle adotados atualmente visam impedir o progresso da doença. Estudos relatam que o tratamento com fungicidas comerciais nos estágios iniciais de desenvolvimento da doença diminui significativamente as colônias fúngicas (Cohen *et al.*, 2021).

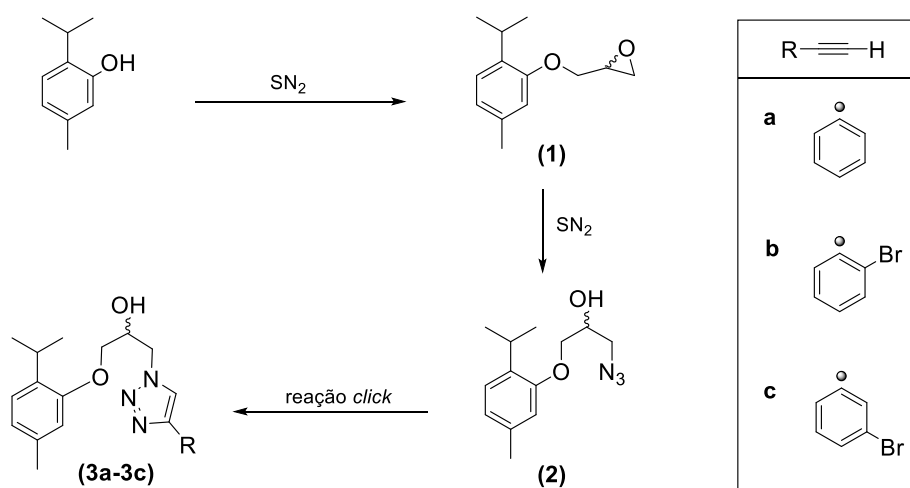
Entretanto, um dos maiores desafios na agricultura é a resistência fúngica aos fungicidas comerciais, que pode ocorrer devido ao seu uso contínuo ou manejo inadequado. Desta forma, se torna imprescindível a busca por métodos de controle alternativos (Ciofini *et al.*, 2022). Os triazóis são compostos que vem ganhando cada vez mais destaque nesse segmento, uma vez que diversos fungicidas sistêmicos são formulados a partir dessa classe de compostos. Suas características são responsáveis por sua ampla aplicação na agricultura, como alta estabilidade química e físico-química e baixa biodegradabilidade, além de diversas atividades biológicas, como a antifúngica (Chen *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2020).

Os triazóis atuam diretamente na membrana celular fúngica, na qual inibem a síntese do ergosterol, componente principal da membrana. São considerados mais eficientes por atuarem tanto como agentes protetores, ao promoverem efeito tóxico sobre a formação do tubo germinativo e apressório do fungo, e como agentes curativos, ao inibirem o desenvolvimento do haustório e crescimento micelial (Forcellini *et al.*, 2001; Parker *et al.*, 2014; Zambolim *et al.*, 2007). Desta forma, o objetivo do presente estudo foi sintetizar três 1,2,3-triazóis-1,4-disubstituídos a partir do timol, um fenol natural encontrado nas folhas do tomilho, e avaliar sua atividade antifúngica frente a *Aspergillus niger*.

Metodologia

A síntese dos três 1,2,3-triazóis (**3a-3c**) foi desenvolvida a partir do emprego do timol, um fenol natural, como matéria prima. A rota sintética foi realizada em três etapas, na qual a etapa principal para obtenção dos derivados 1,2,3-triazólicos foi a reação *click chemistry* de cicloadição 1,3-dipolar entre um alcino e uma azida catalisada por cobre (Figura 1) (Costa *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2025).

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



Fonte: Próprio autor.

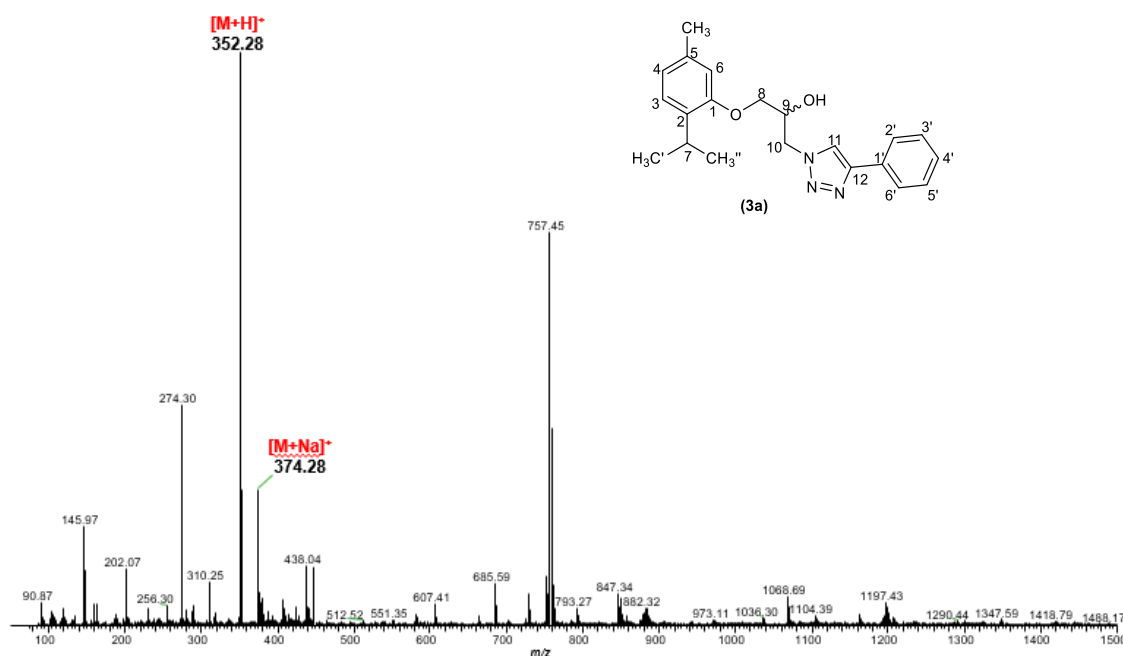
Após a síntese e caracterização química, os três novos compostos foram submetidos aos ensaios biológicos para avaliar sua atividade antifúngica frente ao *Aspergillus niger*. Os ensaios biológicos foram realizados de acordo com o protocolo de padrão ouro para testes de susceptibilidade para microrganismos. As cepas do fungo foram cultivadas em meio de cultura ABD (água batata dextrose) por sete dias à 35°C. Uma suspensão de esporos foi preparada em solução salina 0,85% com 0,1% Tween 20. A densidade dessa suspensão foi ajustada em espectrofotômetro (densidade ótica entre 0,08 a 0,13 nm).

Os compostos **3a**, **3b**, **3c** e o Tebuconazol (controle positivo) foram testados nas concentrações de 300 µg/mL a 0,58 µg/mL. Os ensaios foram realizados em microplaca de 96 poços, em duplicata. Após um período de 48 horas de incubação, 15 µL de corante resazurina 0,01% foram adicionados à microplaca e submetidos a mais 4 horas de incubação, à 35°C. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) pôde ser identificada através da mudança de coloração do corante de azul para rosa, em que azul indica ausência do crescimento e rosa a presença do crescimento.

Resultados

A síntese dos derivados triazólicos ocorreu em três etapas, na qual o timol foi utilizado como material de partida (Figura 1). A etapa principal para obtenção dos compostos foi a 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 (**3a**, **3b** e **3c**), com rendimentos de 70%, 68% e 53%, respectivamente. Após sintetizados e purificados, todos os compostos tiveram suas estruturas quimicamente confirmadas por métodos espectroscópicos via análise no Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C , bem como Espectrometria de Massas (Costa *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2025). Ao analisar o espectro de massas do composto **3a**, o pico em m/z 352,28 $[\text{M}+\text{H}]^+$ está de acordo com a fórmula molecular esperada, $[\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2 + \text{H}^+ : 352,20]$. O pico em m/z 374,28 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ também está de total acordo com o cálculo esperado para $[\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2 + \text{Na}^+ : 374,18]$ (Figura 2). Os compostos **3b** e **3c** não serão discutidos no presente trabalho, uma vez que a interpretação dos dados referentes aos mesmos ocorre de forma análoga ao composto **3a** e o número de páginas do resumo ser limitado, motivo pelo qual os espectros de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C também não foram apresentados e discutidos.

Figura 2 – Espectro de massas de alta resolução do composto (**3a**).



Fonte: Próprio autor.

Os compostos triazólicos foram capazes de inibir o crescimento de *Aspergillus niger*. Sendo os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) correspondentes a 37,5, 9,3 e 37,5 $\mu\text{g/mL}$ para os compostos **3a**, **3b** e **3c** respectivamente. O fungicida comercial tebuconazol apresentou atividade fungicida, com valor de CIM de 2,3 $\mu\text{g/mL}$. Os compostos triazólicos apresentaram atividade inicialmente fungistática, sendo necessário mais estudos para identificar a concentração fungicida desses compostos.

Discussão

A rota sintética empregada levou à obtenção dos intermediários (**1**) e (**2**) com rendimentos satisfatórios de 65% e 94%, respectivamente. A última etapa da síntese consistiu no preparo dos compostos 1,2,3-triazólicos derivados do timol (**3a**, **3b** e **3c**), via reação de cicloadição 1,3-dipolar entre um alcino terminal e uma azida orgânica (**2**) catalisada por cobre Cu(I) , na qual três alcinos terminais

distintos foram utilizados, bem como os solventes diclorometano e água, e ascorbato de sódio como agente redutor. O composto (**1**) foi obtido com rendimento de 65% a partir da reação do timol com ($\pm$)-epicloridrina, utilizando o brometo de tetrabutilamônio ((Bu)₄NBr) como catalisador de transferência de fase e hidróxido de potássio (KOH) como base. Na etapa subsequente, procedeu-se à síntese da azida orgânica (**2**), com rendimento de 94%. A formação de (**2**) ocorreu por meio de um mecanismo concertado, no qual a clivagem e a formação de ligações acontecem de maneira simultânea em uma única etapa. Nesse processo, o oxigênio pertencente ao anel epóxido coordena-se ao hidrogênio do íon amônio. Em seguida, o íon azido realiza o ataque nucleofílico ao carbono menos impedido do epóxido, resultando na formação do composto (**2**) (Lima *et al.*, 2022).

Entre as metodologias descritas na literatura para a síntese de derivados 1,2,3-triazólicos, a reação de cicloadição foi empregada por ser uma reação inserida no conceito de *click chemistry*, proposta por Sharpless e Meldal em 2002. Atualmente, essa reação se tornou o método principal e mais empregado por ser simples, rápido, facilmente executado em laboratório, não necessitar de altas temperaturas, possuir altos rendimentos e levar à formação exclusiva do regioisômero 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído (Lima *et al.*, 2020). As características desta reação e sua aplicação no presente trabalho demonstram seu potencial promissor para obtenção de 1,2,3-triazóis (Costa *et al.*, 2017; Fichtali *et al.*, 2016).

A presença de anéis aromáticos substituídos em diversos 1,2,4-triazóis comerciais motivou a escolha dos alcinos comerciais utilizados na síntese dos derivados 1,2,3-triazólicos do timol. A inserção de halogênios, particularmente, é uma estratégia valiosa no desenvolvimento de compostos biologicamente ativos para o desenvolvimento de agroquímicos, uma vez que contribuem para a ocorrência de um equilíbrio entre eficácia, segurança ambiental e viabilidade econômica. Estudos demonstraram que a inserção de diferentes substituintes no anel aromático altera propriedades físico-químicas, como polaridade, área superficial e volume, podendo impactar diretamente na atividade biológica. Assim, a variação sistemática desses substituintes busca elucidar relações estrutura-atividade e fornecer subsídios para o desenvolvimento de compostos mais eficazes (Lima *et al.*, 2024).

No ensaio biológico, os derivados triazólicos do timol (**3a**, **3b** e **3c**) não apresentaram atividade fungicida nas concentrações testadas. Esse resultado está associado ao mecanismo de ação dos compostos triazólicos. Os triazóis se ligam ao lanosterol 14- α -desmetilase, enzima essencial na biossíntese do ergosterol, componente principal da membrana fúngica. A interação entre o anel triazólico com o ferro heme no sítio ativo da enzima leva a ligação do triazol a enzima alvo. Essa ligação interrompe a via de produção do ergosterol e promove a ativação de uma via alternativa que resulta na formação e acúmulo um esteroide considerado tóxico para a membrana celular fúngica. Inicialmente o efeito dos triazólicos é fungistático, podendo ter efeito fungicida após a remodelação da membrana celular que compromete a integridade e gera perda de conteúdo citoplasmático, ocasionando na morte celular fúngica.

Conclusão

A metodologia empregada permitiu a síntese do epóxido (**1**), da azida orgânica (**2**) e de três novos 1,2,3-triazóis (**3a–3c**) a partir do timol, com rendimentos satisfatórios. A reação *click* mostrou-se eficiente para a obtenção dos derivados 1,4-dissubstituídos, e as análises espectroscópicas confirmaram as estruturas propostas. Os resultados indicam que a estratégia sintética é viável e pode ser aplicada para a obtenção de outros compostos.

Os compostos triazólicos possuem capacidade inibitória para o microrganismo estudado. O efeito fungistático é promissor, com destaque para o composto **3b** que apresentou a menor CIM, sendo 4x a concentração do fungicida comercial Tebuconazol amplamente utilizado na cultura agrícola.

Referências

CHEN, Z. *et al.* Oleanane-type triterpene conjugates with 1*H*-1,2,3-triazole possessing of fungicidal activity. **Molecules**, 27, 4928, 2022.

CIOFINI, A. *et al.* Management of post-harvest anthracnose: Current approaches and future perspectives. **Plants**, 11, 1856, 2022.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

COHEN, Y. *et al.* *Aspergillus niger*, the causal agent of black mould disease in date fruits, infects and colonizes flowers and young fruitlets. **Plant Pathology**, v. 70, n. 5, p. 1195-1208, 2021.

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.

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.

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.

GAI, Y.; WANG, H. Plant disease: A growing threat to global food security. **Agronomy**, v. 14, n. 8, p. 1615, 2024.

GAUTAM, A. K. *et al.* Diversity, Pathogenicity and Toxicology of *A. niger*: An Important Spoilage Fungi. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 270-280, 2011.

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.

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.

LIMA, A. M. A. *et al.* Synthesis of eugenol-fluorinated triazole derivatives and evaluation of their fungicidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 33, n. 10, p. 1200-1210, 2022.

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.

OLIVEIRA, M. B. *et al.* Design and Synthesis of Thymol Derivatives Bearing a 1, 2, 3-Triazole Moiety for Papaya Protection against *Fusarium solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 73, p. 14290-14299, 2025.

PALENCIA, E. R.; HINTON, D. M.; BACON, C. W. The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 399-416, 2010.

PARKER, J.E. *et al.* Resistance to antifungals that target CYP51. **Journal of Chemical Biology**, v. 7, p. 143–161, 2014.

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 Departament, 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

*A Ciência do **NANO** e seu impacto transformador no **MACRO***

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.