



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LEANDRO JOSE SOUZA DUO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE
CUMARILAMIDAS NO COMBATE A FERRUGEM ASIÁTICA
DE SOJA**

Londrina
2025

LEANDRO JOSÉ SOUZA DUO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE
CUMARILAMIDAS NO COMBATE A FERRUGEM ASIÁTICA
DE SOJA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Mestrado em Química – Área de concentração Química Orgânica, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Profa. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo.

Coorientador: Carla Cristina Perez.

Londrina
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Duo, Leandro José Souza.

Síntese e avaliação do potencial antifúngico de cumarilamidas no combate a ferrugem asiática de soja / Leandro José Souza Duo. - Londrina, 2025.
93 f. : il.

Orientador: Marcelle de Lima Ferreira Bispo.

Coorientador: Carla Cristina Perez.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2025.

Inclui bibliografia.

1. Fungicidas - Tese. 2. Cumarinas - Tese. 3. Cumarilamidas - Tese. 4. Ferrugem Asiática - Tese. I. Bispo, Marcelle de Lima Ferreira. II. Perez, Carla Cristina. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU 54

LEANDRO JOSÉ SOUZA DUO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE
CUMARILAMIDAS NO COMBATE A FERRUGEM ASIÁTICA
DE SOJA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Mestrado em Química – Área de concentração Química Orgânica, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Marcelle de Lima
Ferreira Bispo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof Dr Nilton Syogo Arakawa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr Luis Fernando Cabeça
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná – UTFPR

Londrina, 12 de setembro de 2025.

Duo, Leandro J. S. **Síntese e avaliação do potencial antifúngico de cumarilamidas no combate a ferrugem asiática de soja.** 2025. 93 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

RESUMO

A cultura da soja é a atividade agrícola mais importante do agronegócio brasileiro. Entretanto, durante o ciclo produtivo, várias doenças podem afetar a produção, gerando enormes perdas econômicas. Dentre as fitopatologias mais importantes, destaca-se a ferrugem asiática causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Apesar da existência de algumas classes de fungicidas disponíveis atualmente no mercado, para algumas destas substâncias há o desenvolvimento da resistência fúngica, culminando em uma menor sensibilidade aos tratamentos disponíveis. Portanto, é evidente a necessidade de busca de novos ingredientes ativos com atividade fungicida capazes de atuarem frente a *P. pachyrhizi* e outros fungos fitopatogênicos. Nesse contexto, a classe das cumarinas pode ser considerada promissora, uma vez que várias substâncias contendo tal núcleo heterocíclico têm apresentado atividade antifúngica descrita na literatura. Outra importante classe de antifúngicos é denominada carboxamidas, que conta com vários princípios ativos já disponíveis no mercado contra diversos fungos fitopatogênicos. Portanto, neste trabalho foram planejadas duas séries de cumarinas-3-carboxamidas por meio da estratégia de hibridização molecular, com o intuito de avaliar seu potencial antifúngico *in vitro* frente a esporos de *P. pachyrhizi*. Para isso, foram sintetizados dois ácidos cumarino-3-carboxílicos, um sem substituintes e outro di-hidroxilado nas posições 7 e 8 do anel cumarínico, utilizando o ácido de Meldrum como reagente-chave. A partir desses precursores, foram preparadas dezoito cumarilamidas divididas em duas séries, por meio de reações de ativação com cloreto de tionila e posterior acoplamento com diferentes aminas, gerando variações estruturais na porção amídica. As cumarilamidas de interesse foram obtidas em rendimentos que variaram entre 63% e 93% (calculado para duas etapas). As substâncias obtidas foram caracterizadas por espectroscopia de RMN e espectrometria de massas de alta resolução (QTOF-MS). O potencial antifúngico dos compostos sintetizados foi avaliado por meio de ensaios *in vitro* de germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*. Dentre os compostos testados, dois apresentaram índices de inibição da germinação de 81% e 82%, evidenciando elevada atividade antifúngica e potencial para inibir o desenvolvimento do agente causador da ferrugem asiática da soja.

Palavras-chave: fungicidas; *P. pachyrhizi*; cumarinas; carboxamidas.

Duo, Leandro J. S. **Synthesis and Evaluation of the Antifungal Potential of Coumarilamides in Combating Asian Soybean Rust**". 2025. 93 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

ABSTRACT

Soybean cultivation is the most important agricultural activity within the Brazilian agribusiness sector. However, during the production cycle, several diseases can affect yield, causing to significant economic losses. Among the most critical phytopathologies, Asian soybean rust, caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi*, stands out. Although some classes of fungicides are currently available on the market, fungal resistance has emerged against several of these compounds, resulting in reduced sensitivity to the available treatments. Therefore, there is a clear need to search for new active ingredients with fungicidal activity capable of acting against *P. pachyrhizi* and other phytopathogenic fungi. In this context, the coumarin scaffold can be considered promising, since numerous compounds containing this heterocyclic nucleus have demonstrated antifungal activity in the literature. Another important class of antifungal agents is represented by carboxamides, several of which are already commercialized as active ingredients against a variety of phytopathogens. Based on this rationale, two series of coumarin-3-carboxamides were designed using a molecular hybridization strategy to evaluate their in vitro antifungal potential against *P. pachyrhizi* spores. For this purpose, two coumarin-3-carboxylic acids were synthesized, one unsubstituted and the other dihydroxylated at positions 7 and 8 of the coumarin ring, using Meldrum's acid as a key reagent. From these precursors, eighteen coumarinamides were prepared in two series through activation reactions with thionyl chloride, followed by coupling with different amines, generating structural variations in the amide portion. The target coumarinamides were obtained in yields ranging from 63% to 93% (calculated for two steps). The compounds were characterized by NMR spectroscopy and high-resolution mass spectrometry (QTOF-MS). The antifungal potential of the synthesized compounds was evaluated through in vitro *Phakopsora pachyrhizi* spore germination assays. Among the compounds tested, two showed germination inhibition rates of 81% and 82%, demonstrating high antifungal activity and the potential to inhibit the development of the causal agent of Asian soybean rust.

Key-words: fungicides, *P. pachyrhizi*, coumarins, carboxamides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	A) Folha de soja saudável. B) Folha de soja com sintomas de ferrugem asiática (<i>Phakopsora pachyrhizi</i>).	18
Figura 2 -	Estruturas químicas dos principais fungicidas multissítios.	19
Figura 3 -	Estruturas químicas dos principais fungicidas Triazóis, inibidores do C14 α -desmetilase, apresentam os núcleos triazol e triazolintiona (destacados em roxo) como grupos farmacofóricos.	20
Figura 4 -	Reação de desmetilação do Lanosterol na biossíntese de esterol Ergosterol, inibida pelos fungicidas da classe dos Triazóis e Triazolintiona.	20
Figura 5 -	Processo de biossíntese do Ergosterol em fungos a partir do Esqualeno.	21
Figura 6 -	Estruturas químicas de algumas estrobilurinas (porção farmacofórica destacada em laranja) que são inibidoras da Quinona externa (iQe).	22
Figura 7 -	Reação de redução da ubiquinona para ubiquinol, catalisada pela enzima ubiquinol–citocromo c-redutase, inibida pelos fungicidas da classe das estrobilurinas (inibidoras da quinona externa (iQe)).	22
Figura 8 -	Estrutural geral das Carboxamidas e exemplos de fungicidas inibidores de Succinato Dehidrogenase.	23
Figura 9 -	Reação de oxidação do succinato a fumarato catalisada pela enzima succinato desidrogenase (SDHI), inibida pelos fungicidas da classe das carboxamidas.	23
Figura 10 -	Estrutura geral da classe das carboxamidas: grupo carboxamida central (em vermelho), ligada pela carbonila a uma porção polar (em verde) e pelo nitrogênio a uma cauda apolar (em azul), bem como alguns exemplos de carboxamidas fungicidas.	24
Figura 11 -	Núcleo básico da cumarina.	25
Figura 12 -	Derivados de 4-hidroxycumarinas (I-IV) com potencial antimicrobiano, reportados por MLADENOVIC <i>et al.</i> , 2010.	26

Figura 13 - Estrutura do derivado 4-acetato-cumarina (V) relatado por GUERRA <i>et al.</i> 2017.	26
Figura 14 - Estrutura do derivado cumarínico ostenol descrito por Montagner <i>et al.</i> 2007.	27
Figura 15 - Estrutura da 4-metoxicumarina descrita por He <i>et al.</i> 2021.	27
Figura 16 - Métodos sintéticos clássicos para síntese do núcleo cumarínico.	28
Figura 17 - Estrutura geral das cumarina-3/4-carboxamidas.....	31
Figura 18 - Cumarinas-3-carboxamidas com potencial antifúngico (VIII-XI), (Yu, <i>et al.</i> , 2018).....	32
Figura 19 - Planejamento estrutural por hibridação molecular das cumarinas-3-carboxamidas (Séries A e B, 3a-i e 6a-i).....	34
Figura 20 - Espectro de massas de alta resolução (ESI(+))QTOFMS) composto 1.....	38
Figura 21 - Espectro de massas de alta resolução (ESI(+)-QTOF-MS) do composto 4.....	39
Figura 22 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) do composto 1, utilizando DMSO- <i>d</i> ₆ como solvente.....	40
Figura 23 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) do composto 4 utilizando DMSO- <i>d</i> ₆ como solvente.....	41
Figura 24 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) do composto 3a utilizando DMSO- <i>d</i> ₆ como solvente.....	46
Figura 25 - Possíveis fragmentos gerados no espectro de massas para a estrutura 3a.	47
Figura 26 - Espectro de massas do composto 3a.	47
Figura 27 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) do composto 6g utilizando DMSO- <i>d</i> ₆ como solvente.....	52
Figura 28 - Espectro de massas de alta resolução (ESI(+)-QTOF-MS) do composto 6g.....	53
Figura 29 - Fotos de testes <i>in vitro</i> de germinação dos esporos de <i>P. pachyrhizi</i>	54
Figura 30 - Ilustração da metodologia do teste de germinação <i>in vitro</i>	67

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Histórico de crescimento dos maiores produtores globais de soja..... 16
- Gráfico 2** - Histórico dos maiores exportadores mundiais de soja. 16
- Gráfico 3** - Porcentagens de germinação *in vitro* para estudo de sensibilidade antifúngica dos compostos 18 cumarilamidas sintetizadas em dos esporos do fungo *P. pachyrhizi*, classificados pelo nível de sensibilidade..... 54
- Gráfico 4** - Taxa de inibição de germinação *in vitro* para estudo de sensibilidade antifúngica dos compostos 18 cumarilamidas sintetizadas em dos esporos do fungo *P. pachyrhizi*, classificados pelo nível de sensibilidade..... 55

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimentos em duas etapas obtidos para cumarilamidas 3a-i.	42
Tabela 2 - Deslocamentos químicos do RMN de 1H (400 MHz, DMSO), em ppm, obtidos para a substância 3a.....	46
Tabela 3 - Rendimentos em duas etapas obtidos para dihidroxi-cumarilamidas 6a-i	50
Tabela 4 - Deslocamentos químicos do RMN de 1H (400 MHz, DMSO), em ppm, obtidos para a substância 6g.....	51
Tabela 5 - Resultados dos testes de germinação in vitro para estudo de sensibilidade antifúngica dos compostos 3a-i e 6a-i sobre os esporos do fungo <i>P. pachyrhizi</i> , classificados entre compostos da mesma série.....	56

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Método de síntese da cumarina por meio da reação análoga de Reformatsky (SALEM, <i>et al.</i> , 2018).	29
Esquema 2 - Rota sintética <i>one-pot</i> via condensação de Knoevenagel para síntese de cumarina (VI). (Gholap <i>et al.</i> , 2013).	29
Esquema 3 - Rota sintética livre de metais para formar 4-aril-3-acilcumarina (VII) (Mi <i>et al.</i> , 2015).	30
Esquema 4 - Síntese do ácido cumarino-3-carboxílico via condensação de Knoevenagel. (Cunha, <i>et al.</i> , 2015).	30
Esquema 5 - Síntese do ácido cumarino-3-carboxílico via ácido de Meldrum (Cunha, <i>et al.</i> , 2015).	31
Esquema 6 - Síntese de Amida com intermediário (cloreto de acila) via SOCl ₂	32
Esquema 7 - Síntese de amida a partir ácido carboxílico e agentes de acoplamento (Procopio, <i>et al.</i> , 2024).	33
Esquema 8 - Rota sintética para a obtenção do ácido 3-carboxicumarínico (1).	36
Esquema 9 - Mecanismo proposto para a obtenção dos ácidos 3-carboxicumarínicos.	37
Esquema 10 - Rota sintética para a obtenção do cumarilamidas 3a-i.	41
Esquema 11 - Mecanismo proposto para obtenção do cloreto de acila (2).	43
Esquema 12 - Mecanismo proposto para obtenção das cumarilamidas.	44
Esquema 13 - Rota sintética para a obtenção do dihidroxi-cumarilamidas 6a-i.	48
Esquema 14 - Mecanismo proposto para obtenção do cloreto de acila (5) utilizando DMF como catalisador.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LaSMMed	Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais
IBGE	Instituto Brasileiro de Geográfica e Estatística
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
SHD	Succinato desidrogenase
IDM	Inibidores da Desmetilação
CYP51	C14 α -desmetilase
DMSO	Dimetilsulfóxido
ACN	Acetonitrila
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
pH	Potencial hidrogeniônico
UV	Ultravioleta
ASR	Asian Soybean Rust
CLAE	Cromatografia Líquido de Alta Eficiência
DCC	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
ECC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
DMAP	4-dimetilaminopiridina
OHbt	1 <i>H</i> -1,2,3-Benzotriazol-1-ol
DMF	N,N-dimetilformamida
DMAC	N,N-dimetilacetamida
QTOFMS	Espectrometria de Massas por Quadrupolo e Tempo de Voo
ESI+	Ionização por Eletrospray – polaridade positiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Soja	15
1.1.1	Ferrugem asiática da soja (ASR)	17
1.2	Cumarinas	25
1.3	Síntese das Cumarinas e derivados	27
1.4	Cumarina-3-carboxamidas (Cumarilamidas)	31
1.5	Síntese cumarilamidas (Cumarina-carboxamidas)	32
1.6	Planejamento estrutural dos derivados cumarínicos	33
2	OBJETIVO	35
2.1	Objetivo principal	35
2.2	Objetivos específicos	35
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.1	Síntese e caracterização dos precursores ácido 3-carboxicumarínicos (1 e 4)	36
3.2	Síntese e caracterização das cumarilamidas (Série A, 3a-i)	41
3.3	Síntese e caracterização das di-hidroxi-cumarilamidas (Série B, 6a-i)	48
3.4	Ensaio in vitro para avaliação da atividade antifúngica	53
4	PARTE EXPERIMENTAL	57
4.1	Procedimentos gerais	57
4.2	Método de caracterização	58
4.3	Síntese do Ácido 3-carboxicumarínico	58
4.4	Síntese da Cumarilamidas 3a-i	59
4.5	Síntese do Ácido 7,8-dihidroxi-3-carboxicumarínico	62
4.6	Síntese de Dihidroxi-cumarilamidas 6-a-i	63
4.7	Ensaio in vitro para avaliação da atividade antifúngica	66
5	CONCLUSÃO	67

REFERÊNCIAS	69
APÊNDICES	74
APÊNDICE A – Caracterização espectroscópica do ácido 3-carboxicumarínico	74
APÊNDICE B – Caracterização espectroscópica do ácido 7,8-dihidroxi-3-carboxicumarínico	75
APÊNDICE C – Caracterização espectroscópica das cumarilamidas (3a-i).....	76
APÊNDICE D - Caracterização espectroscópica das dihidroxi-cumarilamidas (6a-i).....	85

1 INTRODUÇÃO

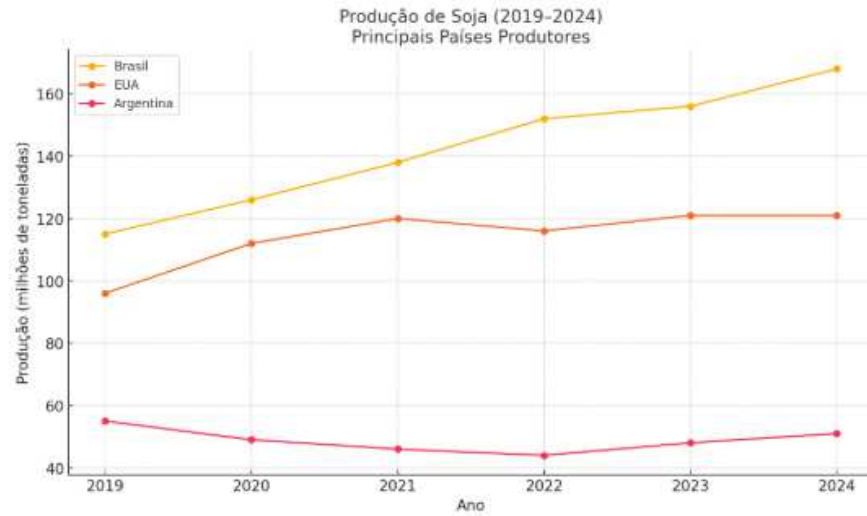
1.1 SOJA

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] tem se destacado ano após ano como a principal cultura semeada na agricultura brasileira, segundo o IBGE (2024), a produção da oleaginosa representa quase a metade do total de cereais, leguminosas e oleaginosas produzidos no país em 2024. Planta originária da Ásia, a soja é hoje uma das *commodities* agrícolas mais relevantes do mundo, amplamente utilizada como matéria-prima na produção de óleo vegetal, farelo para ração animal e como ingrediente básico na indústria alimentícia, cosmética e biocombustível. Seu cultivo é estratégico não apenas pela sua versatilidade, mas também pelo seu alto valor nutricional e capacidade de fixar nitrogênio, o que contribui para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas.

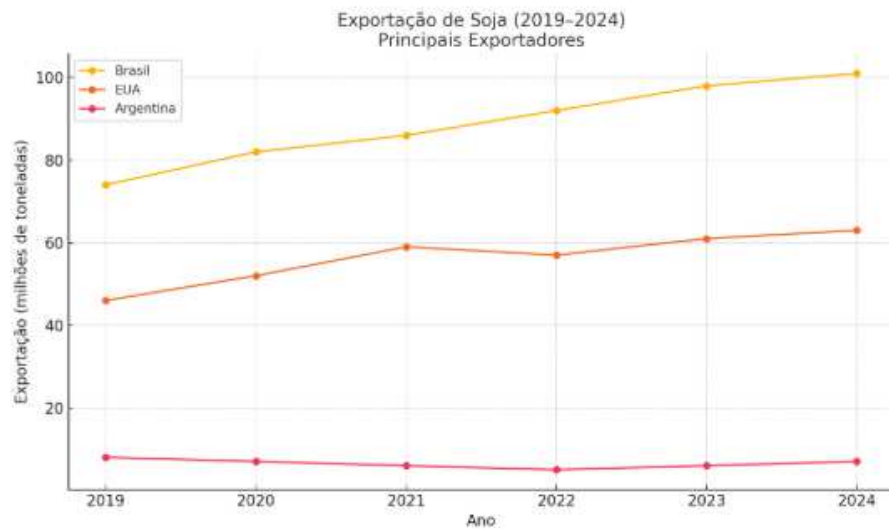
Na safra 2022/2023, o Brasil assumiu a liderança mundial de produção de soja, seguido pelos Estados Unidos. Já na safra 2024/2025 a cultura ocupou uma área de 47.52 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 167,87 milhões de toneladas. A produtividade média da soja brasileira foi de 3.533 kg/ha (Embrapa, 2025).

De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2025), na safra 2024/2025, a soja correspondeu a 50,5% da produção total de grãos no país. Portanto, é uma cultura de grande importância econômica para o Brasil. Em 2024, as exportações brasileiras de soja em grão totalizaram 98,8 milhões de toneladas (Embrapa, 2025), gerando receitas significativas para o país. Os principais destinos dessas exportações foram a China, a União Europeia e países asiáticos em desenvolvimento.

A expansão da soja no Brasil é observada principalmente nos estados do Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás), Sul (Paraná, Rio Grande do Sul) e partes do Norte (Maranhão, Tocantins). A evolução tecnológica no setor, o uso de cultivares adaptadas a diferentes condições e o aumento na mecanização têm permitido o avanço da cultura em áreas antes consideradas marginais para o cultivo de grãos. A produtividade média nacional gira em torno de 3.500 kg/ha, com fazendas altamente tecnificadas podendo alcançar em torno de 4.500 kg/ha.

Gráfico 1 - Histórico de crescimento dos maiores produtores globais de soja.

Fonte - EMBRAPA (2024).

Gráfico 2 - Histórico dos maiores exportadores mundiais de soja.

Fonte - EMBRAPA (2024).

Com esse cenário, fica evidente a importância estratégica da soja não apenas como fonte de proteína e óleo vegetal, mas como motor econômico para o Brasil e para o agronegócio mundial. Estudos que visam aumentar a produtividade, resistência a patógenos, melhorar o manejo ambiental ou ampliar os usos da soja ganham relevância diante da pressão por produção sustentável e pelo atendimento à crescente demanda global. Assim, o presente trabalho se insere em um contexto técnico-científico e socioeconômico de grande importância.

1.1.1 Ferrugem asiática da soja (ASR)

Devido aos fatores climáticos, como altas temperaturas e umidade durante o ciclo produtivo, principalmente na safra de verão (de outubro a março), a soja é alvo de várias doenças fúngicas, tais como: antracnose (*Colletotrichum truncatum*), septoriose (*Septoria glycines*), Cercospora (*Cercospora kikuchii*), mancha-alvo (*Corynespora cassicola*), mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), oídio (*Microsphaera diffusa*) e ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) (Embrapa, 2014; Silva, 2019).

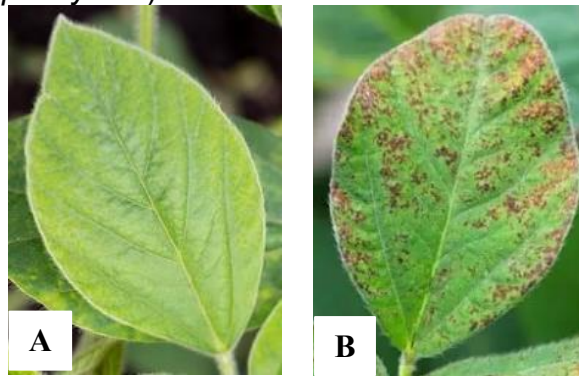
Entretanto, uma das doenças que têm acompanhado a evolução do cultivo da soja no Brasil e causado desafios à sustentabilidade do negócio é a ferrugem asiática da soja (ASR, do inglês *Asian Soybean Rust*), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Em 1902, este fungo foi primeiramente identificado no Japão como *Uredo sojae*. Já no início do século XX, foi detectado em toda a Ásia tropical e subtropical e Oceania (Bromfield, 1984). A doença foi relatada posteriormente na África em meados da década de 1990 (Pretorius et al., 2001). Então, em 2001, foi encontrada no Paraguai e no oeste do estado do Paraná (Brasil), espalhando-se, em três anos, por toda a América do Sul (Rossi, 2003; Yorinori et al., 2005). Em 2004, ASR foi relatada nos Estados Unidos continentais (Schneider et al., 2005).

O fungo *P. pachyrhizi* é um parasita obrigatório que produz dois tipos de esporos: uredósporos, responsáveis pela disseminação secundária da doença, e teliósporos, que servem como estruturas de sobrevivência (HARTMAN et al., 2015). Sendo os uredósporos, responsáveis pela infecção secundária e rápida disseminação da ferrugem asiática durante o ciclo da cultura, e os teliósporos, estruturas espessas e de parede dupla, adaptadas à sobrevivência em condições ambientais adversas (HARTMAN et al., 2015). Até agora, apenas uredósporos são predominantes em epidemias. A sobrevivência do fungo ao longo do ano depende da contínua produção de uredósporos em um hospedeiro adequado. Juntamente com a soja, mais de 90 outras espécies de leguminosas servem como hospedeiras de *P. pachyrhizi* (RYTTER et al., 1984; SLAMINKO et al., 2008). Em geral, as condições climáticas ideais para a cultura da soja favorecem o estabelecimento e o desenvolvimento da doença. O fungo infecta as plantas em temperaturas variando de 10 a 27,5 °C, sendo a temperatura ótima entre 20 e 23 °C (Figura 1) e com um período mínimo de orvalho de 6 horas (MELCHING, et al., 1989). A umidade foliar contínua causada pelo orvalho ou chuva também favorece o desenvolvimento de doença, tendo em vista que as chuvas são

um fator importante na determinação dos níveis epidêmicos no campo (DEL PONTE, *et al.*, 2006).

Os principais danos causados pela ferrugem asiática são pequenas lesões acastanhadas formadas principalmente na região abaxial da superfície de folíolos de soja (Figura 1). As lesões são frequentemente associadas à clorose foliar, fenômeno caracterizado pelo amarelamento dos tecidos foliares em decorrência da degradação ou redução do conteúdo de clorofila. A elevada densidade de lesões, favorecem o desfolhamento prematuro e a maturidade antecipada das plantas, resultando em perdas significativas de rendimento (Hartman *et al.*, 2015). Na ausência de medidas de controle, perdas de rendimento de até 90% foram relatadas (Godoy *et al.*, 2016).

Figura 1 - A) Folha de soja saudável. B) Folha de soja com sintomas de ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*).

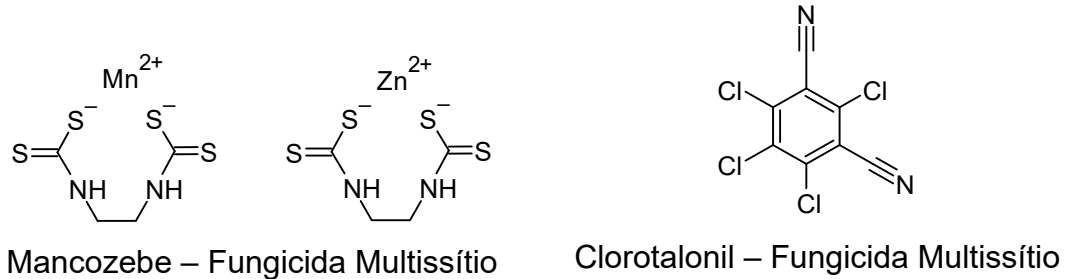


Fonte - Blog Verde.ag

O controle da ferrugem asiática se baseia, principalmente, no uso de fungicidas químicos (Godoy *et al.*, 2016). Esses podem ser classificados em relação ao seu espectro de ação, como de: amplo espectro (multissítio) ou espectro restrito (sítio-específico). Os fungicidas multissítios com Mancozebe, Clorotalonil e Oxicloreto de Cobre (Figura 2) atuam interferindo em diferentes pontos do metabolismo fúngico. Foram incorporados ao manejo da ferrugem asiática, a fim de controlar a doença e limitar o aumento de grupos resistentes dentro das populações a fungicidas sítio-específicos (Godoy *et al.*, 2017). Os fungicidas sítio-específicos são ativos contra um único ponto da via metabólica de um patógeno ou contra uma única enzima ou proteína necessária para a sobrevivência do fungo. Os ingredientes ativos desse tipo pertencem a três grupos químicos distintos: triazóis, que atuam como inibidores de desmetilação (IDM); as estrobilurinas, conhecidas como inibidores da Quinona

externa (iQe) e as carboxamidas, que são inibidores da enzima succinato desidrogenase (iSDH).

Figura 2 - Estruturas químicas dos principais fungicidas multissítios.



Com relação aos fungicidas inibidores do C14 α -desmetilase, também conhecidos como "triazóis" (Figura 3), sabe-se que as moléculas pertencentes a esta classe química atuam se ligando à enzima C14 α -desmetilase (CYP51), inibindo a reação de α -desmetilação do C14 do Lanosterol (Figura 4), reação essencial na rota de biossíntese de ergosterol em fungos (Figura 5), sendo o alvo primário dos antifúngicos azólicos clínicos e agrícolas. (HARGROVE, *et al.*, 2012). Na presença de oxigênio molecular, a enzima catalisa a formação do esqualeno-2,3-epóxido, que é então ciclizado, gerando precursores esteroides, como o lanosterol. Sob a remoção oxidativa de grupos metila pela CYP51, esses precursores são transformados em ergosterol, que é essencial para a permeabilidade e fluidez da membrana plasmática no reino fúngico (Rohmer et al., 1979; Daum et al., 1998). A inibição desse processo de desmetilação resulta no aumento concomitante de esteróis metilados, os quais não cumprem as mesmas funções na membrana e seu acúmulo acaba se tornando tóxico para a célula. A CYP51 pode ser inibida por compostos heterocíclicos azólicos, nos quais seus nitrogênios são capazes de se complexar com o átomo de ferro presente no grupo prostético Heme, inibindo a reação oxidativa que produz os esteróis, o que, por sua vez, afeta a integridade da membrana celular, matando o fungo.

Tais fungicidas apresentam translocação prioritariamente acropetal, ou seja, uma movimentação no interior da planta a partir do ponto de absorção em direção ao ápice. Esse deslocamento ocorre predominantemente pelo xilema, o tecido vascular responsável pelo transporte de água e nutrientes minerais absorvidos pelas raízes ou superfícies foliares inferiores. Devido às moléculas apresentarem variações nos níveis de inibição do citocromo P450, o grau de eficiência é variável entre os representantes desta classe (AMORIM, *et al.*, 2011).

Figura 3 - Estruturas químicas dos principais fungicidas Triazóis, inibidores do C14 α -desmetilase, apresentam os núcleos triazol e triazolintiona (destacados em roxo) como grupos farmacofóricos.

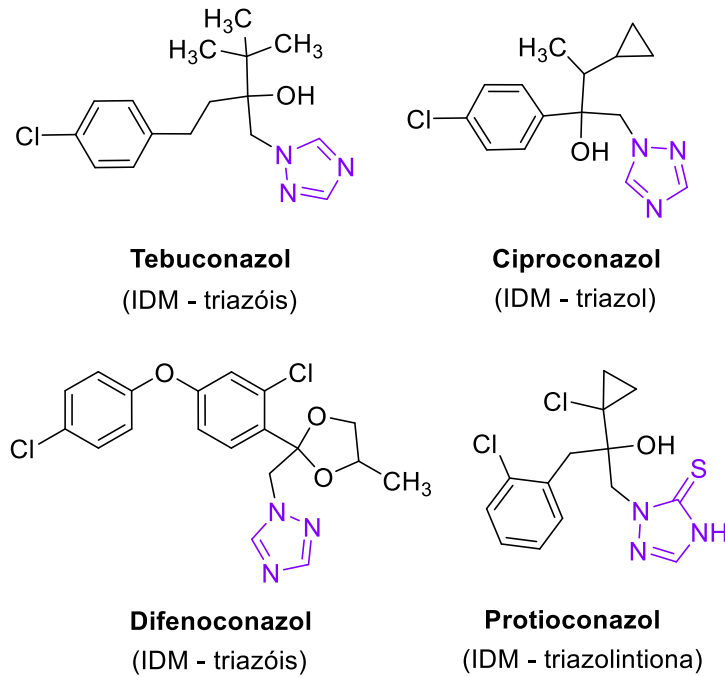


Figura 4 - Reação de desmetilação do Lanosterol na biossíntese de esterol Ergosterol, inibida pelos fungicidas da classe dos Triazóis e Triazolintiona.

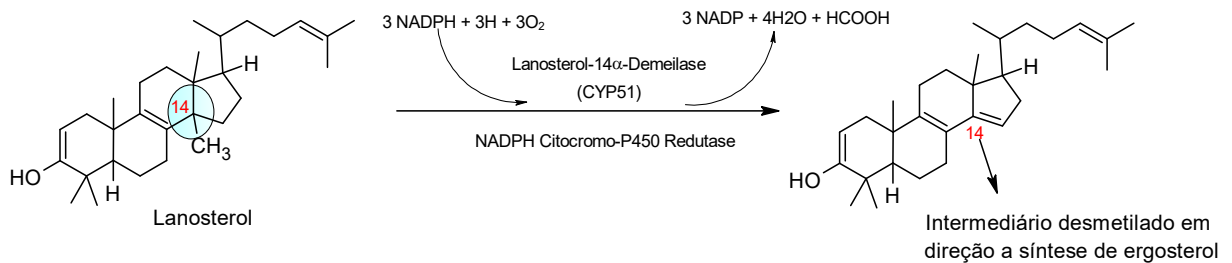
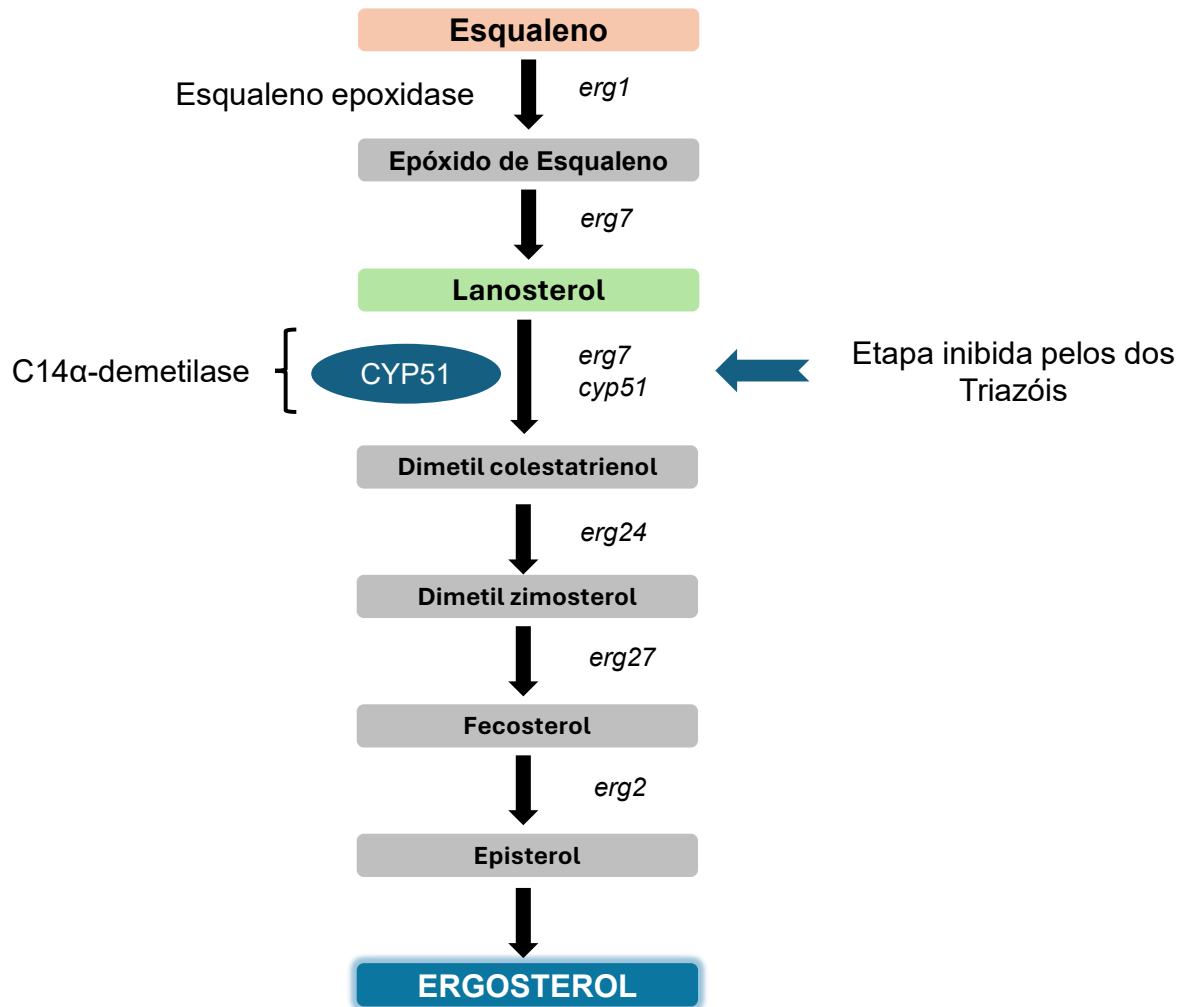


Figura 5 - Processo de biossíntese do Ergosterol em fungos a partir do Esqualeno.



Quanto aos fungicidas da classe das estrobilurinas (Figura 6), também conhecidos por inibidores da quinona externa (iQe), atuam de forma altamente específica no complexo III (enzima ubiquinol–citocromo c-redutase) da cadeia respiratória mitocondrial, ligando-se ao sítio Q_o (quinona externa) do citocromo b. Essa ligação impede a reação de redução da ubiquinona em ubiquinol (Figura 7), interrompendo a transferência de elétrons para o citocromo c₁, e conseqüentemente a síntese de ATP, levando à interrupção energética e à morte do fungo.

Figura 6 - Estruturas químicas de algumas estrobilurinas (porção farmacofórica destacada em laranja) que são inibidoras da Quinona externa (iQe).

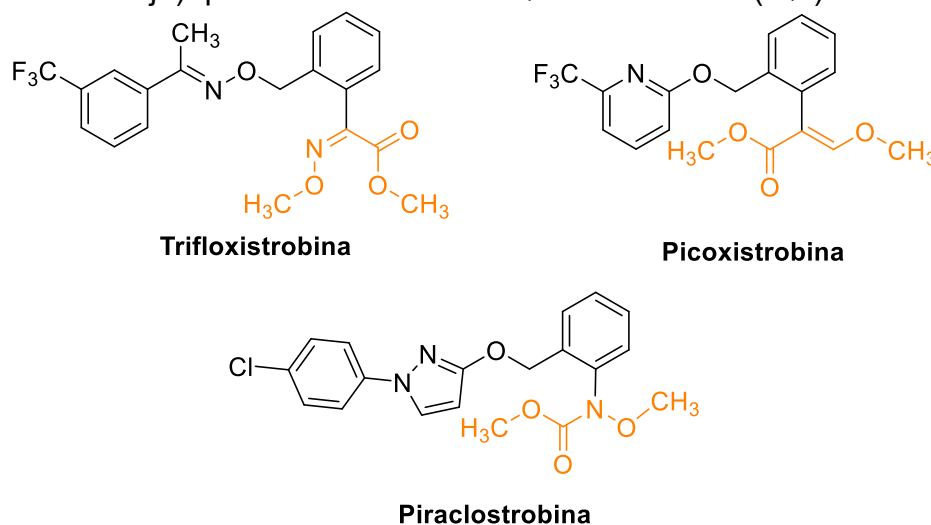
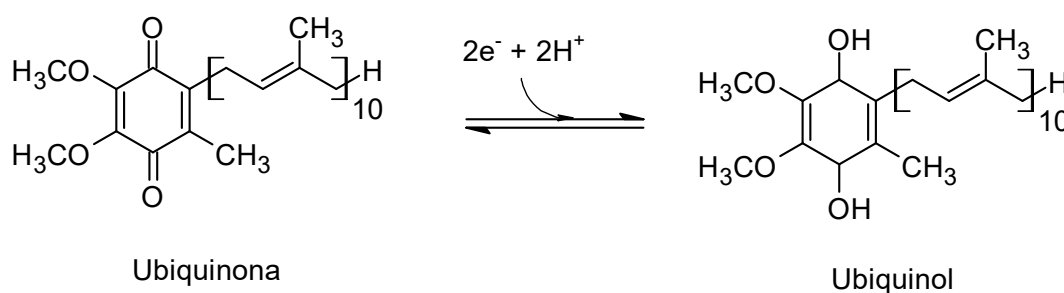


Figura 7 - Reação de redução da ubiquinona para ubiquinol, catalisada pela enzima ubiquinol–citocromo c-redutase, inibida pelos fungicidas da classe das estrobilurinas (inibidoras da quinona externa (iQe)).



Finalmente, tem-se a classe de fungicidas conhecida como carboxamidas (Figura 8), que atuam como inibidores da enzima succinato desidrogenase (iSDH). A enzima SDH, também conhecida como complexo II da cadeia respiratória da mitocôndria, desempenha papéis fundamentais em dois processos-chave da respiração celular em organismos eucariotos: o ciclo do ácido cítrico e o transporte de elétrons (SIEROTZKI; SCALIETT, 2013). Essa enzima catalisa a reação de oxidação do succinato a fumarato (Figura 9) com a redução da ubiquinona a ubiquinol, que ocorre na membrana mitocondrial interna, acoplando as duas reações. Dessa forma, tais compostos atuam na cadeia transportadora de elétrons inibindo a formação de adenosina trifosfato (ATP) para as células fúngicas (KEON, *et al.*, 1991).

Figura 8 - Estrutural geral das Carboxamidas e exemplos de fungicidas inibidores de Succinato Dehidrogenase.

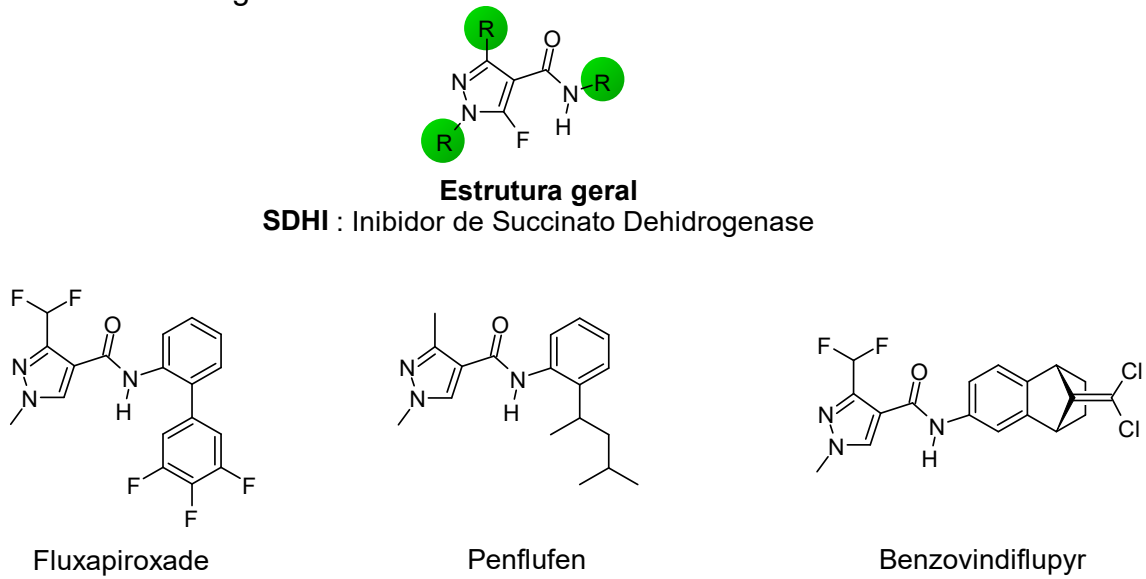
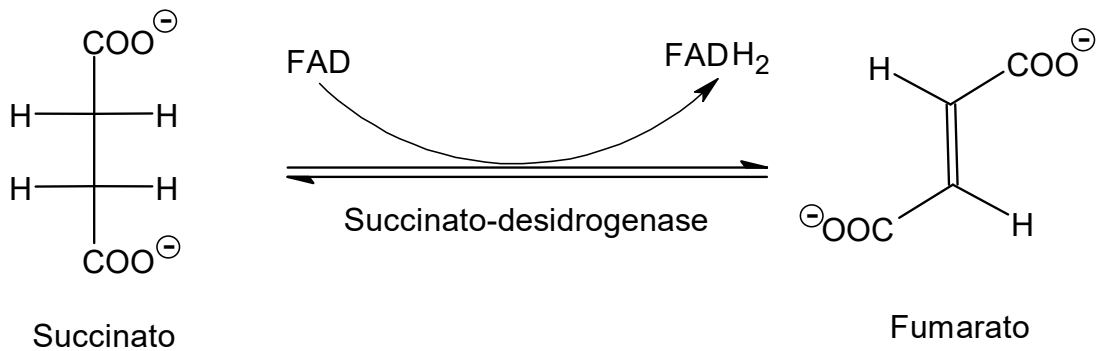
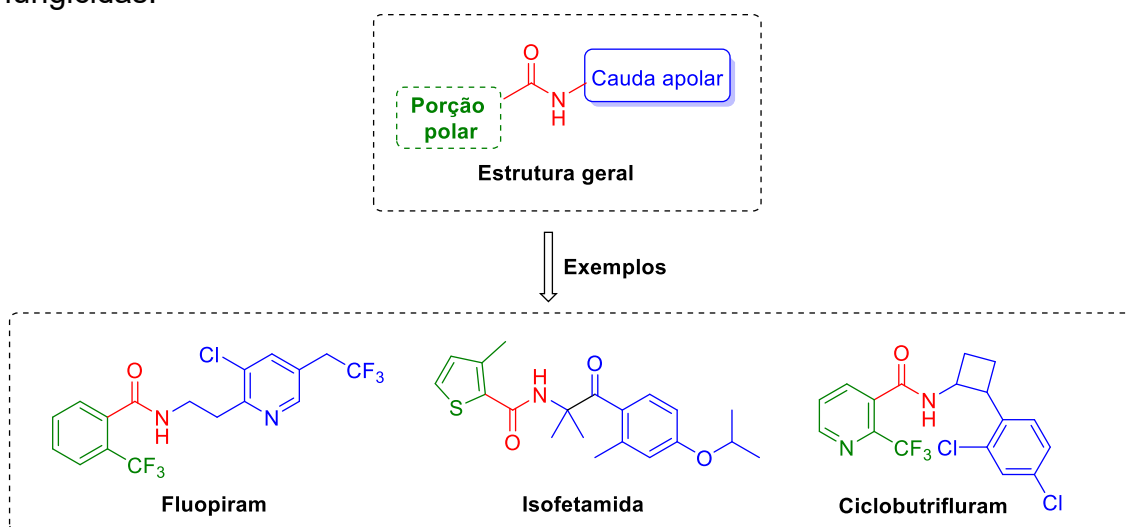


Figura 9 - Reação de oxidação do succinato a fumarato catalisada pela enzima succinato desidrogenase (SDHI), inibida pelos fungicidas da classe das carboxamidas.



É interessante notar que a classe de inibidores da enzima succinato desidrogenase (iSDH), representada pelas substâncias Fluopiram, Isofetamida e Cliclobutrifluram (Figura 10), apresenta uma característica estrutural comum, que é a presença do grupo carboxamida central (em vermelho, Figura 10) ligada pela carbonila a uma porção polar (em verde, Figura 10) e pelo nitrogênio a uma cauda apolar (em azul, Figura 10). (LUO, *et al.* 2022).

Figura 10 - Estrutura geral da classe das carboxamidas: grupo carboxamida central (em vermelho), ligada pela carbonila a uma porção polar (em verde) e pelo nitrogênio a uma cauda apolar (em azul), bem como alguns exemplos de carboxamidas fungicidas.



Até 2010, não havia nenhum representante desse grupo recomendado pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) para aplicação foliar em grandes culturas como a soja. Diante desse cenário e da crescente resistência de *P. pachyrhizi* a fungicidas tradicionais, como triazóis e estrobilurinas, intensificaram-se os esforços das empresas em busca de novos ingredientes ativos, culminando no desenvolvimento das pirazol-4-carboxamidas, um subgrupo das carboxamidas. Esses compostos foram descobertos a partir de programas de triagem focados na inibição da enzima SDH. Sua estrutura molecular é caracterizada por um núcleo pirazólico ligado a uma carboxamida, com variações nos radicais que definem diferentes ingredientes ativos (Figura 8). Assim, os pirazol-4-carboxamidas inauguraram um novo grupo químico para aplicação foliar na cultura da soja, oferecendo uma alternativa estratégica no manejo integrado da ferrugem asiática e contribuindo para a sustentabilidade do controle fitossanitário (FRAC, 2025).

Apesar da existência dessas classes de fungicidas disponíveis, várias destas substâncias, que inicialmente foram utilizadas com alto índice de controle (eficácia), com o passar do tempo, têm ocasionado resistência fúngica, levando a uma diminuição a sensibilidade aos mesmos. A resistência do fungo *P. pachyrhizi* aos fungicidas do grupo dos inibidores da desmetilação (IDM – triazóis), inibidores da quinona externa (iQe – estrobilurinas) e inibidores da succinato desidrogenase (iSDH-

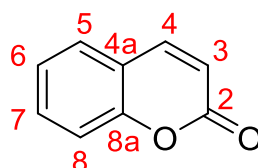
pirazol-4-carboxamidas) já foram relatadas no Brasil (SCHMITZ, *et al.*, 2014; KLOSOWSKI, *et al.*, 2016; SIMÕES, *et al.*, 2018).

Tendo em vista todos esses fatores apresentados, é evidente a necessidade pela busca de novos ingredientes ativos com atividade fungicida capazes de atuarem frente a *P. pachyrhizi* e outros fungos fitopatogênicos.

1.2 CUMARINAS

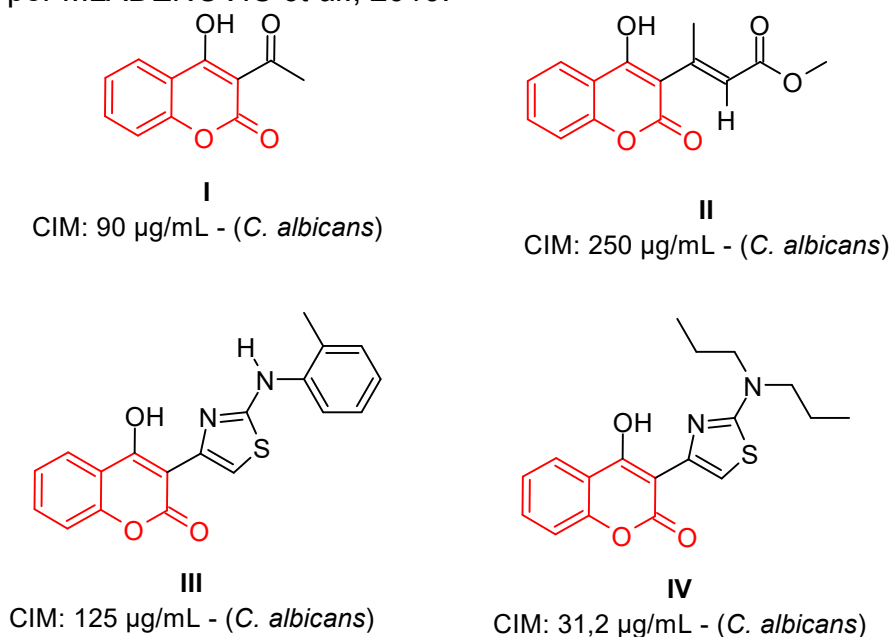
As cumarinas (2H-Cromen-2-ona) são uma classe de composto orgânicos pertencente ao grupo das benzopironas, que são lactonas do ácido 2-hidróxido-cinâmico, sendo estruturalmente constituídas pela fusão de um anel benzênico com uma lactona α,β -insaturada (Figura 11). A cumarina foi isolada pela primeira vez em 1820, a partir de sementes de cumaru, uma árvore presente no norte do Brasil, popularmente conhecida como fava tonca e cujo nome botânico é *Dipteryx odorata* (KUSTER, 2007).

Figura 11 - Núcleo básico da cumarina.



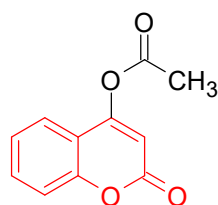
As cumarinas e seus derivados já tiveram atividades antifúngicas frente a *Candida Albicans* relatadas na literatura. Por exemplo, Mladenovic e colaboradores sintetizaram derivados de 4-hidroxycumarinas (I-IV, Figura 12) que apresentaram atividade antifúngica, com concentrações inibitórias mínimas variando de 31,25 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$, (MLADENOVIĆ *et al.*, 2010).

Figura 12 - Derivados de 4-hidroxicumarinas (I-IV) com potencial antimicrobiano, reportados por MLADENOVIĆ *et al.*, 2010.



Guerra *et al.* 2017, avaliou a atividade antifúngica do derivado cumarínico (V, Figura 13) frente ao fungo *Aspergillus spp.*, o qual apresentou uma significativa ação inibidora de germinação de seus esporos.

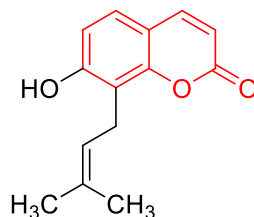
Figura 13 - Estrutura do derivado 4-acetato-cumarina (V) relatado por GUERRA *et al.* 2017.



4-acetato-cumarina (V)
CIM: 16 mg/L (*Aspergillus spp.*)

Montagner *et al.* (2007) avaliaram a atividade antifúngica de uma ampla variedade de derivados de cumarinas contra os fungos *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium solani*, este último responsável pela podridão de raiz e haste da soja (*Glycine max*). Dentre os compostos testados, uma cumarina prenilada, conhecida como ostenol, apresentou os resultados mais promissores (Figura 14). As cumarinas preniladas constituem uma classe de metabólitos secundários derivados do núcleo 1,2-benzopirona, caracterizadas pela presença de um ou mais grupos prenila ligados à estrutura cumarínica.

Figura 14 - Estrutura do derivado cumarínico ostenol descrito por Montagner *et al.* 2007.



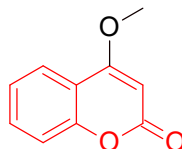
Ostenol

CIM = 125 $\mu\text{g/L}$ (*F. solani*)

CIM = 250 $\mu\text{g/L}$ (*C. albicans* e *A. fumigatus*)

He *et al.* 2021 demonstraram que a 4-metoxicumarina (Figura 15), isolada do fruto de *Cnidium monnieri*, apresenta potente atividade antifúngica, especialmente contra *Rhizoctonia solani*, atuando por meio da disfunção mitocondrial.

Figura 15 - Estrutura da 4-metoxicumarina descrita por He *et al.* 2021.



4-metoxicumarina

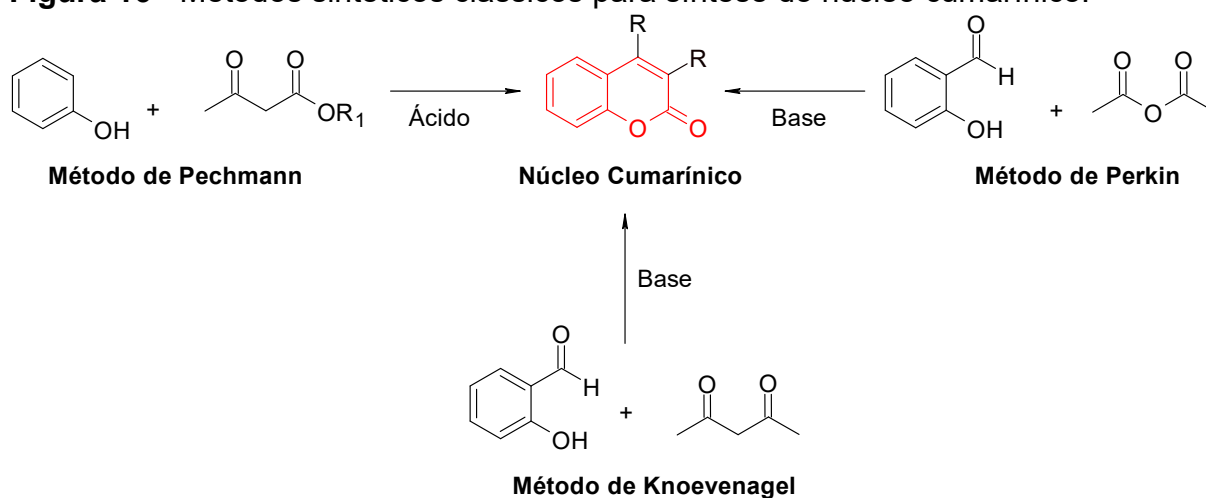
CIM = 21 $\mu\text{g/L}$ (*Rhizoctonia solani*)

O núcleo cumarínico, por sua simplicidade e versatilidade sintética, oferece amplo potencial para modificações químicas visando à otimização da atividade antifúngica. Nesse contexto, a síntese de derivados funcionalizados da 4-metoxicumarina surge como estratégia promissora para o desenvolvimento de novos fungicidas.

1.3 SÍNTESE DAS CUMARINAS E DERIVADOS

A interessante atividade biológica das cumarinas e seus derivados têm atraído o interesse para o desenvolvimento de metodologias de síntese orgânica para a obtenção e funcionalização desse núcleo heterocíclico. Algumas estratégias de síntese foram desenvolvidas, sendo os principais métodos baseados em reações clássicas de condensação do tipo Knoevenagel, Perkin e Pechman (Figura 16).

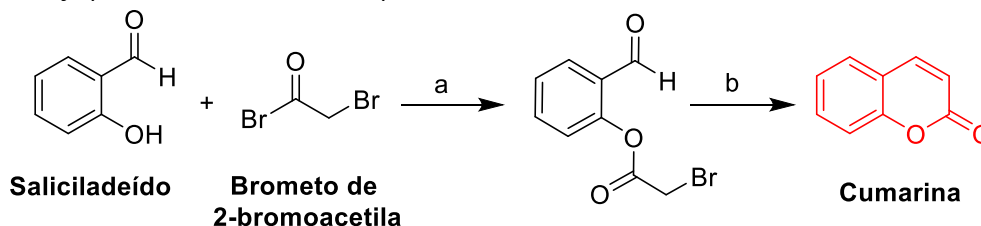
Figura 16 - Métodos sintéticos clássicos para síntese do núcleo cumarínico.



A condensação pelo método de Pechmann ocorre por intermédio da reação entre fenóis com β-cetoésteres, sob condições ácidas, de modo que o fenol promove o ataque nucleofílico ao grupo carbonila e, subsequentemente, acontecem desidratações sucessivas para gerar a cumarina. Os métodos de Perkin e Knoevenagel, por sua vez, se baseiam em reações entre 2-carboxifenol e compostos contendo o grupo metileno ativado. Ambas as metodologias utilizam base como catalisador para gerar o núcleo cumarínico (SALEM, *et al.*, 2018; CUNHA, *et al.*, 2015).

Além das metodologias clássicas, diversas rotas sintéticas para obtenção de cumarinas vêm sendo propostas nos últimos anos na literatura científica. Entre elas, destaca-se o trabalho de Dittmer *et al.* (2005), que desenvolveu uma metodologia baseada na reação de Reformatsky, a qual tradicionalmente consiste na adição de compostos organozinco a ésteres α-halocarbonílicos, resultando na formação de β-hidroxiésteres. Anteriormente, Padmanabhan *et al.* (1989) haviam tentado sem êxito empregar uma abordagem envolvendo a ciclização intramolecular de um éster derivado do bromoacetato de salicilaldeído, utilizando telureto de sódio como catalisador. Conforme apontado por Dittmer *et al.* (2005), até aquele então, não havia relatos de novos avanços nessa linha. Porém, Salem *et al.* (2018), ao promover ajustes nas condições da síntese, conseguiram realizar a ciclização desejada: o ataque do fenolato à carbonila levou à formação de um intermediário α-bromoacilado derivado do salicilaldeído. Esse processo resultou na obtenção da cumarina, com rendimento de 75% (2 etapas), conforme ilustrado no Esquema 1.

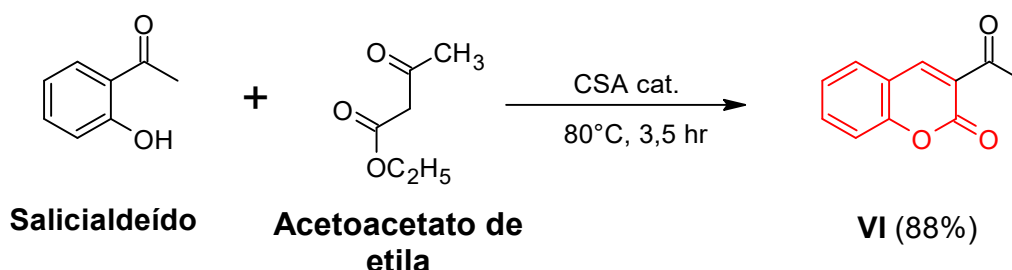
Esquema 1 - Método de síntese da cumarina por meio da reação análoga de Reformatsky (SALEM, *et al.*, 2018).



Condições e Reagentes: a) THF, -78°C; b) Li₂Te, THF, -78°C a t.a. 75%

Visando a síntese de derivados das cumarinas, em 2013 Gholap *et al.* desenvolveram uma reação *one-pot* via reação de condensação de Knoevenagel, sem utilização de solvente e ácido sulfônico de celulose (CSA) como um catalisador eficiente, verde e reutilizável. Assim, a 3-acetilcumarina (**VI**) é obtida com rendimento de 88% na reação entre salicilaldeído e acetoacetato de etila (Esquema 2).

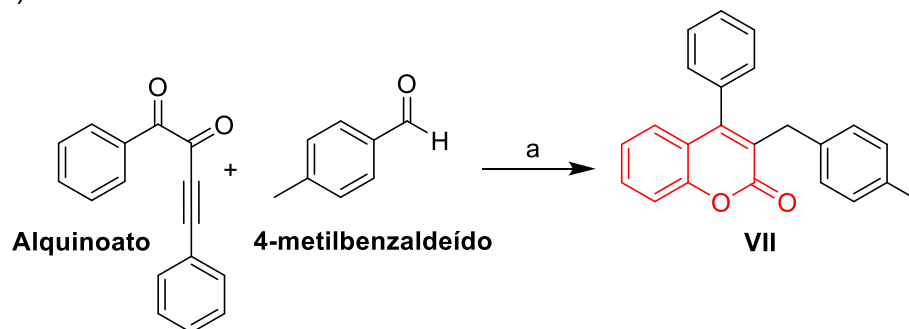
Esquema 2 - Rota sintética *one-pot* via condensação de Knoevenagel para síntese de cumarina (VI). (Gholap *et al.*, 2013).



Mi *et al.* (2015) desenvolveram uma estratégia eficiente e livre de metais para a síntese de acil-cumarinas, utilizando um processo de acoplamento oxidativo do tipo *Tandem* entre aldeídos e alcinos. O método empregou brometo de tetra-n-butilamônio (TBAB) como agente co-catalisador, resultando em rendimentos expressivos. De acordo com os autores, o mecanismo se inicia com a reação entre o persulfato de potássio e o TBAB em temperaturas elevadas, levando à formação de radicais sulfato de tetrabutilamônio. Esses radicais, por sua vez, promovem a geração de um radical acila a partir do 4-metilbenzaldeído. A etapa seguinte envolve a adição desse radical à posição α da carbonila presente no alquinoato, originando um radical vinílico reativo. Esse intermediário sofre uma ciclização intramolecular, formando um areno, que, ao transferir um elétron ao radical sulfato e sofrer desprotonação, dá origem ao derivado

cumarínico (**VII**) com rendimento em torno de 75%, como representado no Esquema 3.

Esquema 3 - Rota sintética livre de metais para formar 4-aryl-3-acilcumarina (**VII**) (Mi *et al.*, 2015).

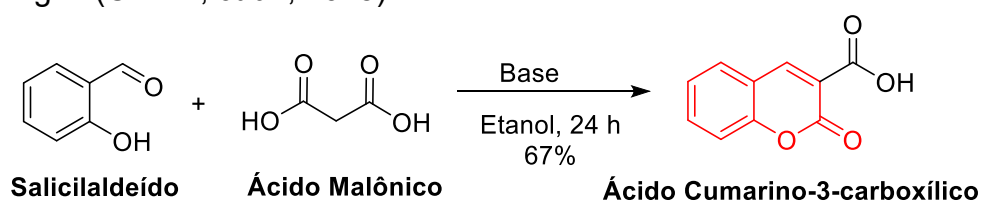


Condições e Reagentes: a) TBAB, $K_2S_2O_8$, 1,2-dicloroetano, atm N_2 , 90°C. 75%

1.2.1 SÍNTESE DOS ÁCIDOS CUMARINO-3-CARBOXÍLICOS

Dentre os vários derivados cumarínicos, os ácidos cumarino-3-carboxílicos são conhecidos por sua versatilidade sintética e potencial aplicação para diversas finalidades. Tradicionalmente, a síntese desses ácidos é realizada por meio da condensação de Knoevenagel entre salicilaldeído, ácido de malônico e catalisador básico (Esquema 4). (Cunha, *et al.*, 2015)

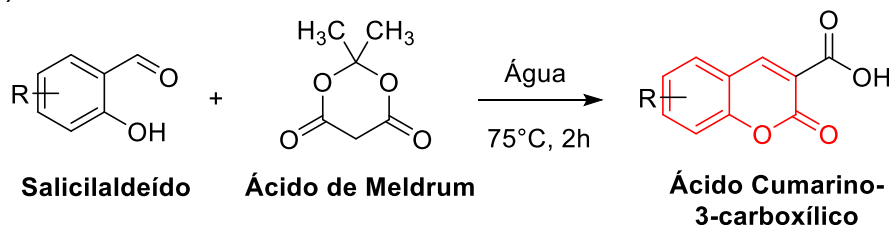
Esquema 4 - Síntese do ácido cumarino-3-carboxílico via condensação de Knoevenagel. (Cunha, *et al.*, 2015).



No entanto, muitos desses métodos empregam solventes orgânicos voláteis, tempo elevado e rendimento medianos. Como alternativa foi desenvolvida uma metodologia mais sustentável, reagindo salicilaldeído e ácido de Meldrum (2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona), que utiliza água como solvente e sem o uso de catalisadores (Cunha, *et al.*, 2015). Além disso, essa metodologia pode ser empregada para salicilaldeídos substituídos com grupos retiradores de elétrons, fornecendo os correspondentes ácidos cumarino-3-carboxílicos (Esquema 5). Essas abordagens

não apenas reduzem o impacto ambiental, mas também simplificam o processo de purificação dos produtos obtidos.

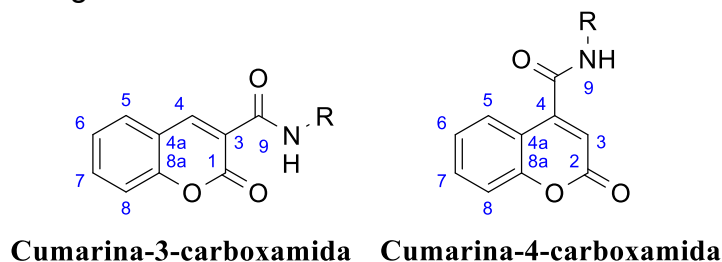
Esquema 5 - Síntese do ácido cumarino-3-carboxílico via ácido de Meldrum (Cunha, *et al.*, 2015).



1.4 CUMARINA-3-CARBOXAMIDAS (CUMARILAMIDAS)

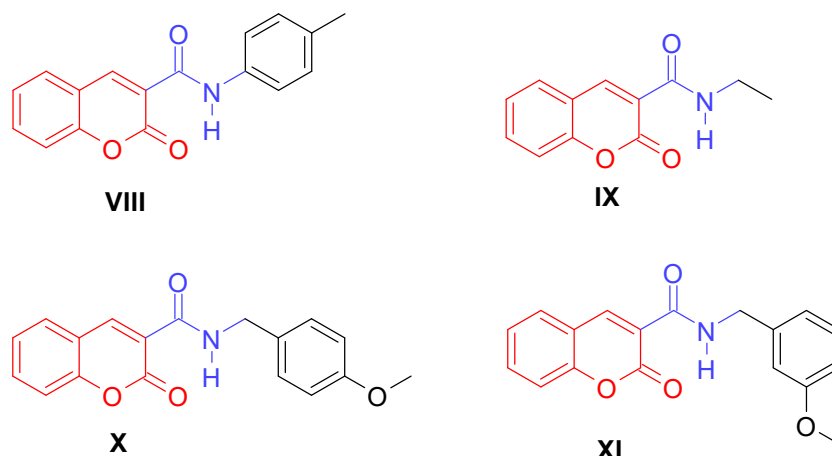
As cumarina-carboxamidas (cumarilamidas) representam uma subclasse de amidas derivadas da cumarina, caracterizadas pela presença de um esqueleto cumarínico ligado a um grupo amida (-CONH-), que pode estar ligado em diferentes posições do anel cumarínico, especialmente nas posições 3 e 4 (Figura 17).

Figura 17 - Estrutura geral das cumarina-3/4-carboxamidas.



Algumas linhas de pesquisa têm demonstrado interesse no desenvolvimento de derivados de cumarinas-carboxamidas com potencial atividade antimicrobiana. A modificação estrutural da cumarina por meio da introdução de grupos carboxamida representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos compostos com perfil farmacológico ampliado e seletivo. Neste sentido, o trabalho de Yu *et al.* (2018) traz contribuições relevantes ao demonstrar a síntese racional e a avaliação biológica de uma série de derivados de cumarina-3-carboxamida (**VIII-XI**, Figura 18) com potencial atividade antifúngica. Os autores relataram que modificações específicas nas cadeias laterais amidas impactaram significativamente a eficácia dos compostos frente a patógenos como *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Gibberella zeae*, *Rhizoctonia solani*, *Cucumber anthrax* e *Alternaria leaf spot*.

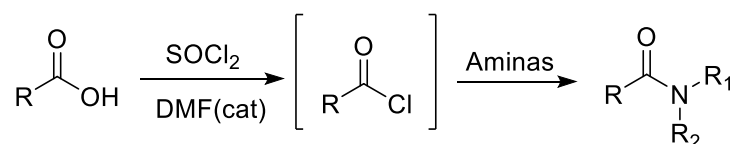
Figura 18 - Cumarinas-3-carboxamidas com potencial antifúngico (**VIII-XI**), (Yu, *et al.*, 2018).



1.5 SÍNTESE CUMARILAMIDAS (CUMARINA-CARBOXAMIDAS)

A síntese das cumarilamidas pode ser realizada por diferentes métodos, sendo aquele mais comumente empregado, o que envolve a reação de aminas com cloretos de acila, anidridos ou ésteres derivados da cumarina. Métodos clássicos incluem a ativação de ácidos carboxílicos via formação de intermediários reativos, como os cloretos de acila, que reagem diretamente com aminas para formar as respectivas amidas (Esquema 6) (Smith, 2019).

Esquema 6 - Síntese de Amida com intermediário (cloreto de acila) via SOCl_2 .

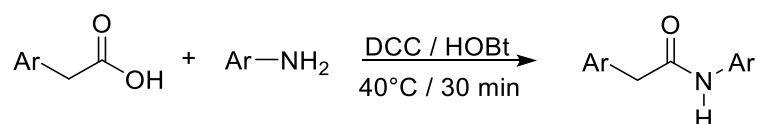


Para a formação destes intermediários reativos, especialmente os cloretos de acila, é muito comum o uso do cloreto de tionila para reação de desidroxilação de álcoois ou ácidos carboxílicos. Estas reações com cloreto de tionila podem ocorrer tanto sem solventes quanto com solvente e uso de catalisadores. Em reação sem solventes é necessário o excesso do reagente, assim como o refluxo para que a reação ocorra rapidamente. Entretanto, o processo com uso de solvente e catalisadores como *N,N*-dimetilformamida (DMF) e *N,N*-dimetilacetamida (DMAC) pode ser uma escolha viável. Na presença de cloreto de tionila, esses catalisadores reagem para formar um intermediário altamente reativo, o íon clorometilenimínio também conhecido como intermediário de Vilsmeier-Hack (Agudo-Álvarez *et al.*,

2024). Esse intermediário eletrofílico atua ativando o ácido carboxílico pela formação de um intermediário acilado mais suscetível à substituição nucleofílica, facilitando a clivagem da ligação C–O da função hidroxila e promovendo a formação do haleto de acila desejado.

Outra abordagem amplamente utilizada é a ativação mediada por agentes de acoplamento, como o DCC (*N,N'*-diciclohexilcarbodiimida) ou EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e aditivos como HOBt (1-hidroxibenzotriazol), que promovem a condensação entre ácidos carboxílicos e aminas (Esquema 7) (Ghosh, *et al.*, 2021).

Esquema 7 - Síntese de amida a partir ácido carboxílico e agentes de acoplamento (Procopio, *et al.*, 2024).



Além disso, novas abordagens catalíticas, como o uso de catalisadores metálicos de paládio e cobre, têm mostrado grande eficiência na formação seletiva de amidas (Allen *et al.*, 2011).

1.6 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL DOS DERIVADOS CUMARÍNICOS

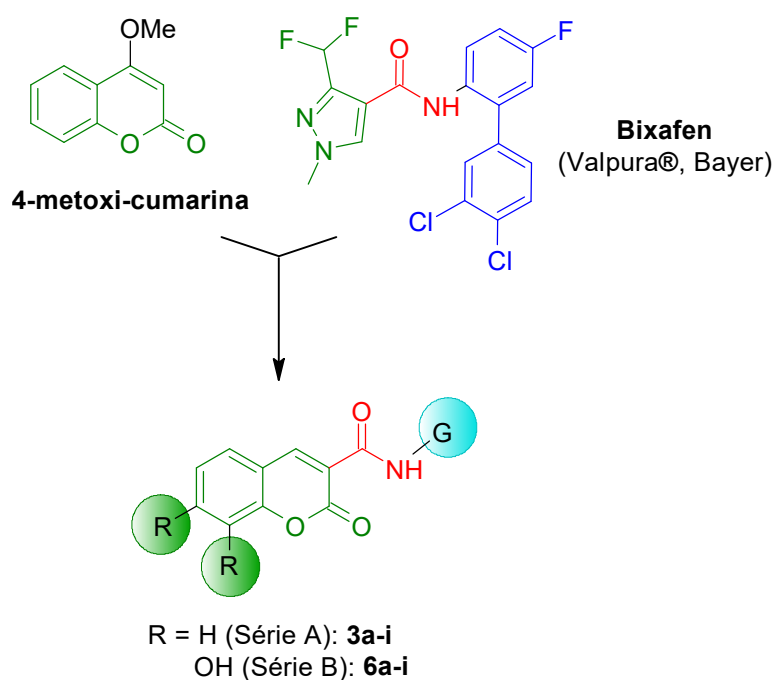
Uma estratégia promissora amplamente utilizada na descoberta de novos fármacos é a hibridação molecular, que consiste na combinação racional de fragmentos bioativos de diferentes moléculas com atividades farmacológicas conhecidas, originando uma nova entidade química com potencial terapêutico aprimorado. Essa abordagem visa explorar sinergias entre os fragmentos incorporados, resultando em compostos híbridos que podem apresentar maior potência, seletividade ou propriedades farmacocinéticas otimizadas em relação aos fármacos originais. Além disso, a hibridação molecular pode contribuir para a superação de mecanismos de resistência, reduzir efeitos adversos e ampliar o espectro de ação (Ivasiv *et al.*, 2019).

Assim sendo, considerando a relevância do potencial antimicrobiano apresentado pelo núcleo cumarínico, especialmente relacionado a atividades antifúngicas, propõem-se nesse trabalho a síntese de duas séries de cumarina-3-carboxamidas (**3a-i**) e (**6a-i**), planejadas estruturalmente por hibridação molecular (Figura 19). A

escolha por trabalhar com carboxamidas deve-se ao fato de já existirem antifúngicos comercialmente disponíveis contra diversos fitopatógenos dessa classe, como o Bixafen (VALPURA®), comercializado pela Bayer Agro.

Uma vez definidos os grupamentos a serem hibridizados, decidiu-se manter o padrão estrutural dos fungicidas da classe carboxamida, no qual o núcleo cumarínico (em verde, Figura 19) representa a parte polar ligada à carbonila da amida, sendo esse núcleo sem substituintes (Série A, **3a-i**) ou contendo hidroxilas nas posições 7 e 8 do anel cumarínico (Série B, **6a-i**). A introdução desses grupos visa aumentar a polaridade desse grupamento, bem como as suas solubilidades em água. Na porção apolar ligada ao nitrogênio amídico (em azul, Figura 19), foram escolhidas dez aminas diferentes (grupos G, em ciano, Figura 19), estes variando entre aminas primárias, cíclicas, aromáticas alquiladas, aromáticas halogenadas e heterocíclicas, com o objetivo de se realizar um estudo de relação estrutura atividade (REA).

Figura 19 - Planejamento estrutural por hibridação molecular das cumarinas-3-carboxamidas (Séries A e B, **3a-i** e **6a-i**).



2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

✓ Sintetizar derivados de cumarinas diferentemente funcionalizados e avaliar seu potencial antifúngico frente a *Phakopsora pachyrhizi*, causador da ferrugem asiática da soja.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Síntese e caracterização espectroscópica de cumarilamidas diferentemente funcionalizadas;

✓ Avaliação do potencial antifúngico das cumarilamidas obtidas frente aos esporos do fungo *P. pachyrhizi*;

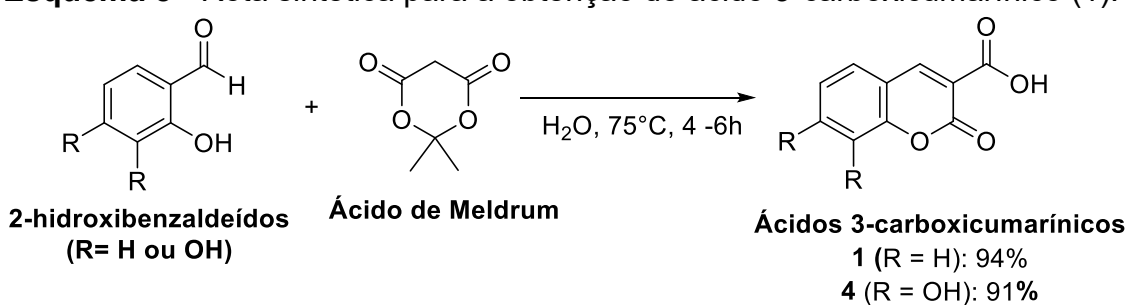
✓ Realização de um estudo de relação estrutura-atividade para identificar os pontos-chave para a atividade antifúngica dessa classe de substâncias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

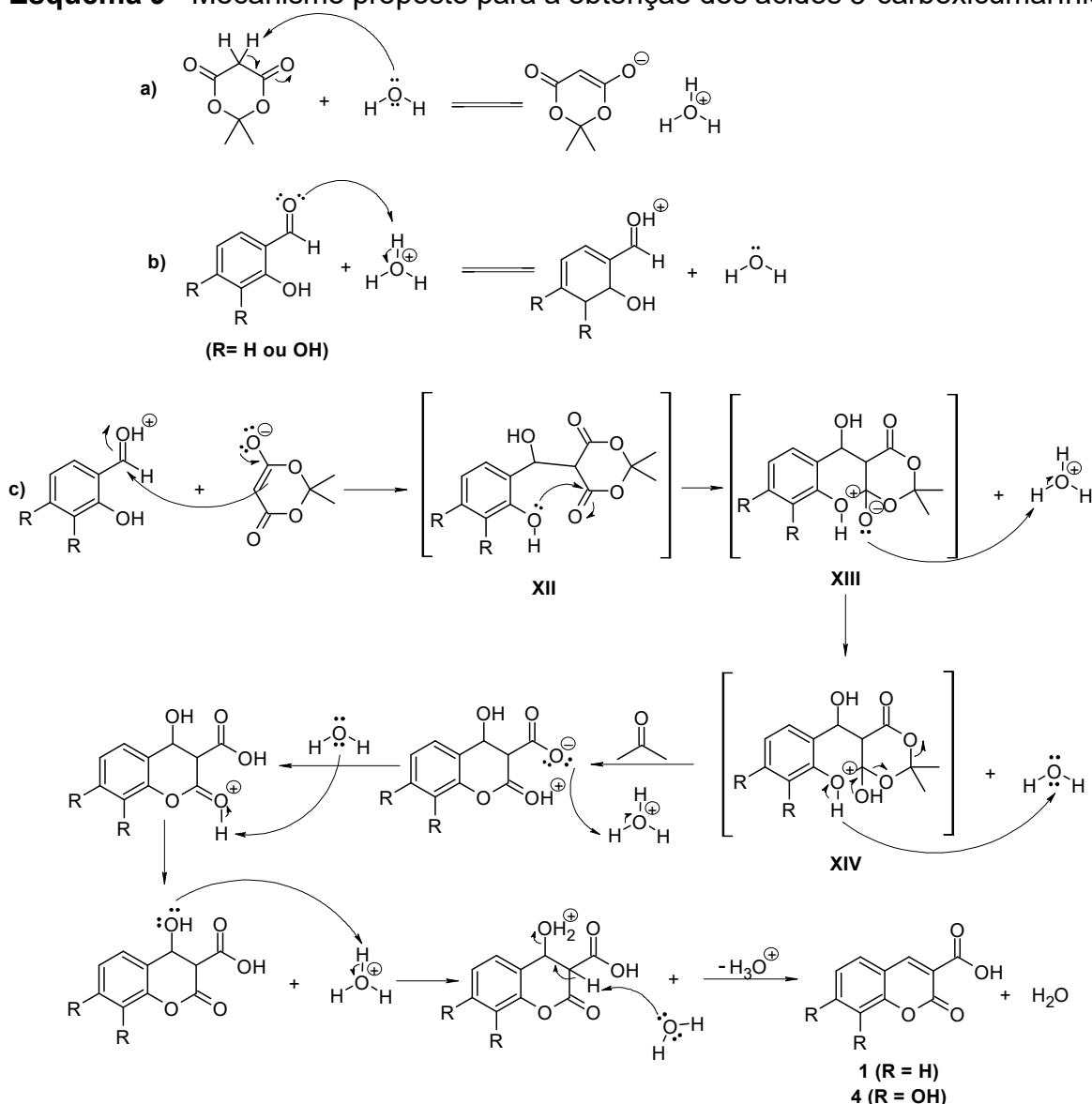
3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS PRECURSORES ÁCIDO 3-CARBOXICUMARÍNICOS (1 E 4)

A síntese dos ácidos 3-carboxicumarínicos (**1** e **4**) foi realizada por meio da reação dos respectivos 2-hidroxibenzaldeídos com o ácido de Meldrum, utilizando água como solvente, conforme descrito por Deshmukh *et al.* (2003). (Esquema 8).

Esquema 8 - Rota sintética para a obtenção do ácido 3-carboxicumarínico (1).



A proposta mecanística para a formação desses compostos se inicia com a consideração de que o ácido de Meldrum possui uma acidez alta. Em solução aquosa, seu pKa é de 4,97 (Pihjala *et al.*, 1969) e igual a 7,32 em DMSO (Arnett *et al.*, 1984), sendo comparável ao ácido acético, enquanto os 2-hidroxibenzaldeídos possuem pKas entre 6 e 8 (solução aquosa). Assim sendo, propõem-se que a formação dos ácidos 3-carboxicumarínicos (Esquema 9) possa ocorrer por meio da adição nucleofílica do ácido de Meldrum, que se encontra parcialmente ionizado no meio aquoso (Esquema 9). Na sequência, ocorre o ataque intramolecular do oxigênio para formar o anel da lactona (**XII**), bem como a eliminação de uma molécula de acetona (**XIV**), seguida então da protonação do ácido carboxílico, formação da dupla carbono-carbono e eliminação de uma molécula de água.

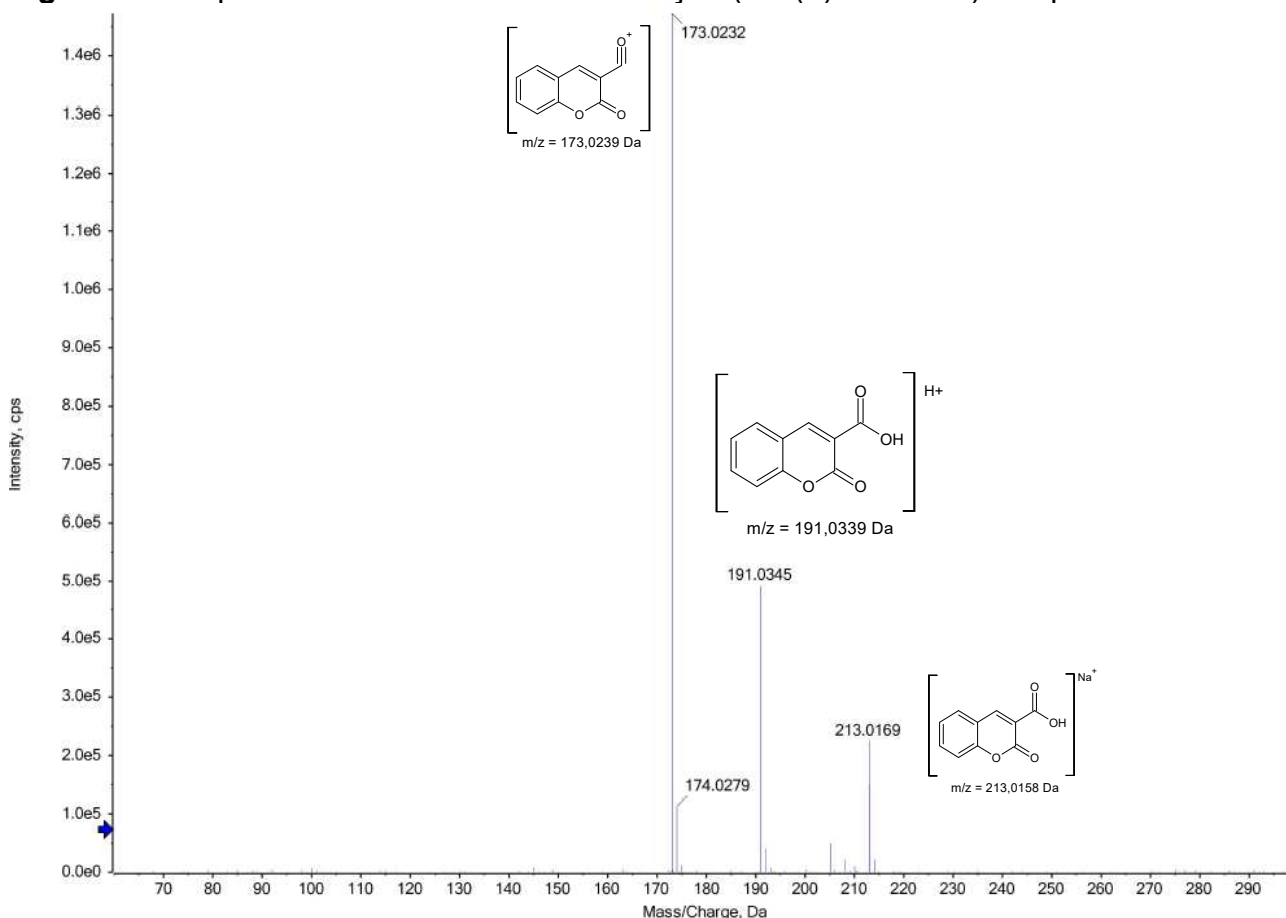
Esquema 9 - Mecanismo proposto para a obtenção dos ácidos 3-carboxicumarínicos.

Como resultado da síntese proposta, os produtos (**1** e **4**) foram obtidos na forma de sólidos branco e amarelo, respectivamente, que precipitam no meio reacional conforme ocorre a reação, obtendo-se assim as substâncias com altos rendimentos (94 e 91%, respectivamente), pois o equilíbrio é deslocado no sentido da formação dos produtos devido à sua precipitação (Cunha, et al., 2012). A identificação da substância **1** foi iniciada com a análise do seu ponto de fusão, 191°C, que está de acordo com os valores encontrados na literatura 191 – 192°C (Deshmukh *et al.*, 2003). Além de confirmar sua identidade, tal medida indica que o produto foi obtido com alto grau de pureza, não havendo necessidade de um processo de purificação subsequente. Para a substância **4**, obteve-se um ponto de fusão igual a 270-273°C,

que está de acordo com os valores encontrados na literatura 270-271°C (Ghalehshahi *et al.*, 2018), confirmando-se também a sua identidade e pureza.

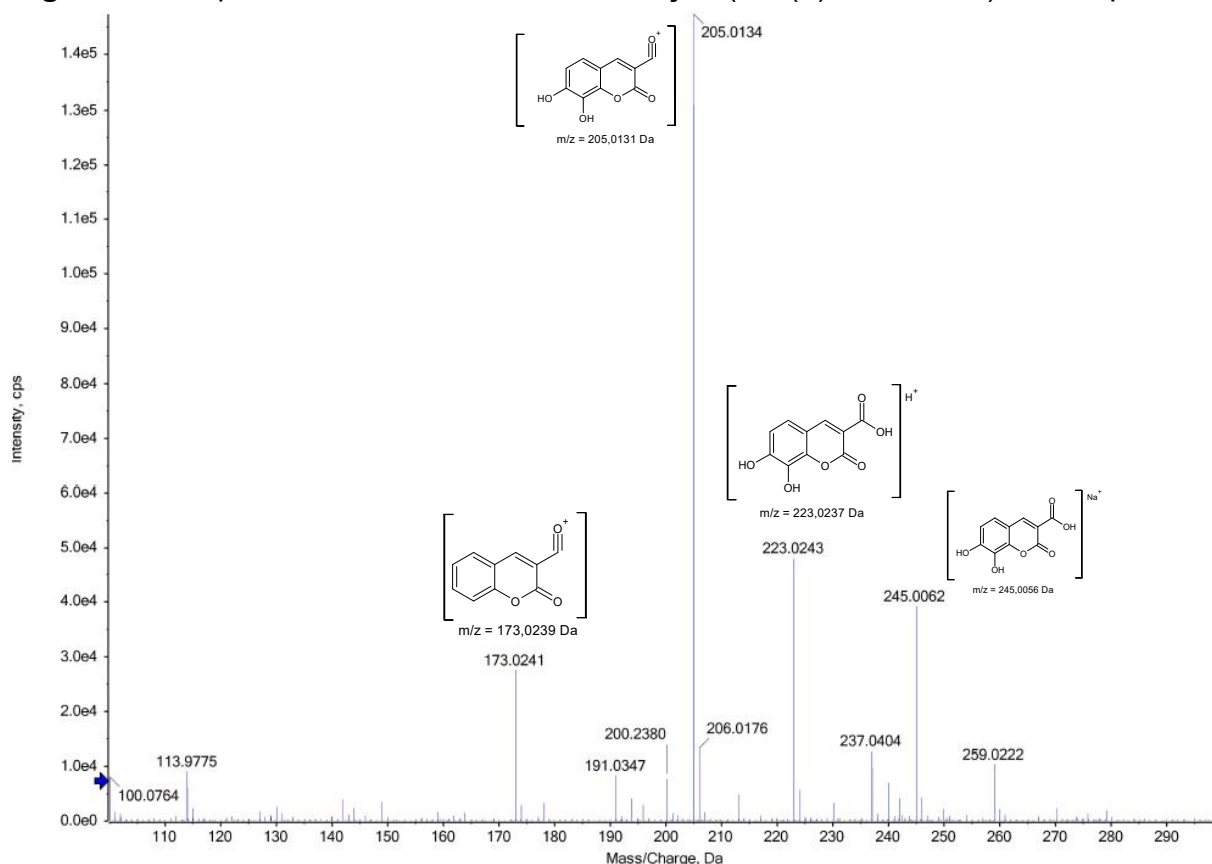
Desta forma, foi dada sequência no processo de caracterização do composto **1** através de seu espectro de massas de alta resolução ionizado positivamente por eletrospray (ESI(+)-QTOF-MS) - (Figura 20). Tal espectro também confirma a obtenção de **1**, visto que é possível observar a presença do pico do íon molecular ionizado positivamente $[M+H]^+$ com razão massa-carga (m/z) de 191,0345, conforme esperado para sua massa monoisotópica, adicionada a massa de um próton (191,0339 Da). Também foi encontrado um sinal de m/z de 173,0240 Da, correspondente à formação do íon acílio, um fragmento estável muito comum para compostos carbonilados, proveniente de fragmentações α (Paiva, *et al.*, 2015) e a formação do íon aduto $[M+Na]^+$ de m/z 213,0168 Da, cuja m/z esperada é de 213,0158 Da.

Figura 20 - Espectro de massas de alta resolução (ESI(+)-QTOFMS) composto 1.



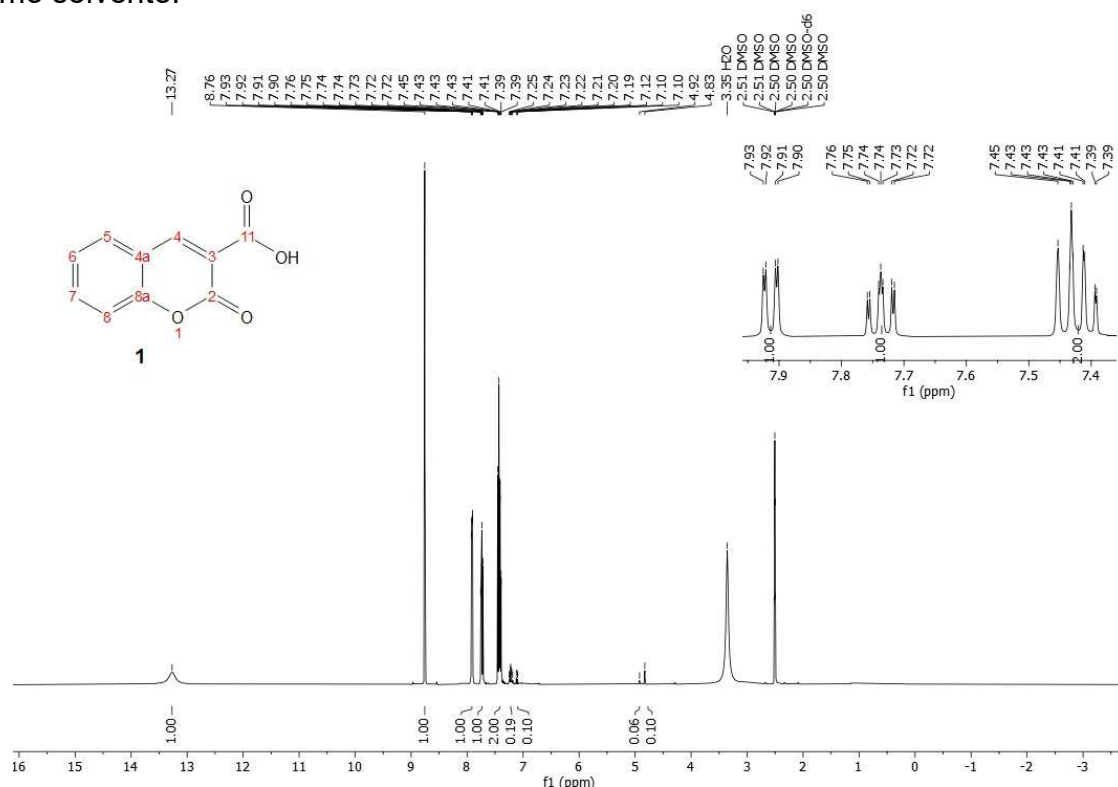
Por sua vez, o espectro de massas de alta resolução ionizado positivamente por eletrospray (ESI(+)-QTOF-MS) do composto **4** (Figura 21) apresentou o pico do íon molecular ionizado positivamente $[M+H]^+$ com razão massa-carga (m/z) de 223,0243 Da, conforme esperado para sua massa monoisotópica adicionada a um próton (223,0237 Da). Também foi encontrado um sinal de m/z de 205,0131 Da, correspondente à formação do íon acílio, bem como a formação do íon aduto $[M+Na]^+$ de m/z 245,0062 Da (m/z esperada 245,0056 Da).

Figura 21 - Espectro de massas de alta resolução (ESI(+)-QTOF-MS) do composto **4**.



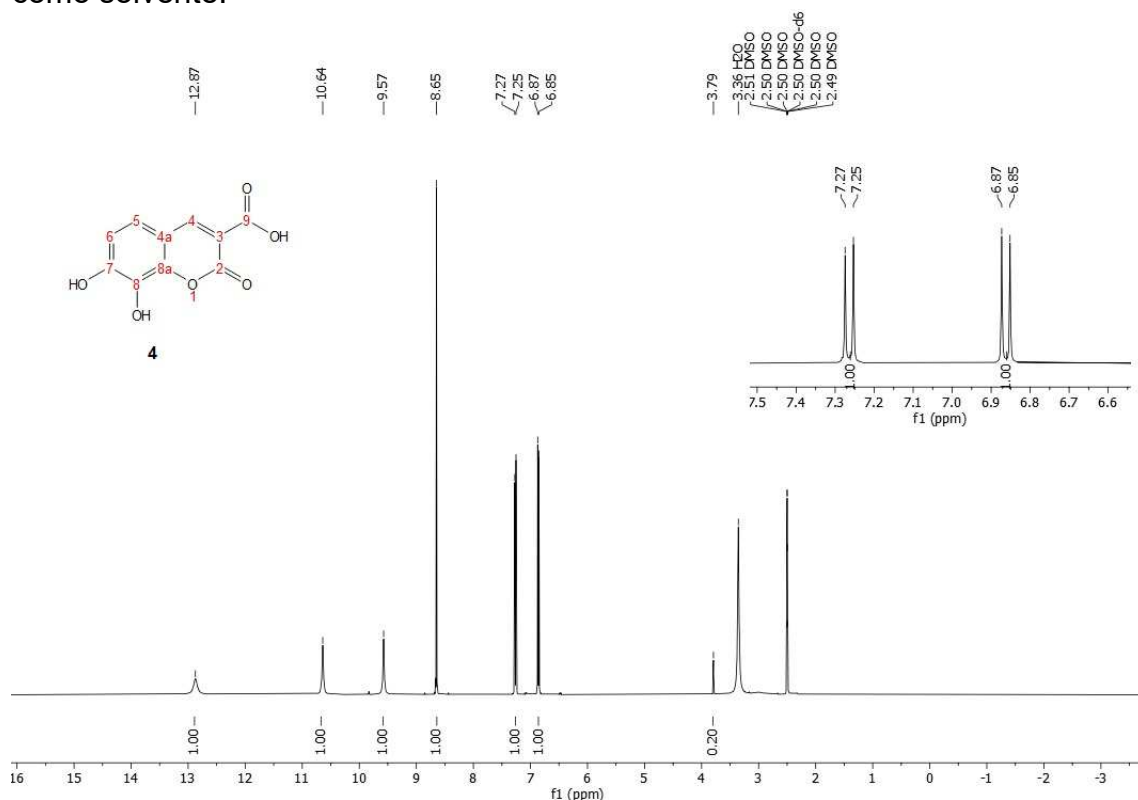
A caracterização estrutural de **1** foi concluída com a aquisição do espectro de RMN de 1H (Figura 22), no qual observou-se a presença de sinais característicos da formação do produto, tais como: um simpleto em 8,76 ppm, equivalente ao hidrogênio cumarínico mais desblindado (H4); um outro simpleto em 13,27 ppm referente ao hidrogênio ligado ao oxigênio da carboxila (COOH); um duplo duplo em 7,91 ppm ($J = 7,8$ e $1,6$ Hz), referente ao hidrogênio cumarínico (H5); um duplo duplo-duplo em 7,74 ppm ($J = 8,7$, $7,3$ e $1,6$ Hz), referente ao hidrogênio cumarínico (H7) e, por fim, um multipeto em 7,42 ppm, correspondentes aos demais hidrogênios cumarínicos (H6 e H8).

Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **1**, utilizando $\text{DMSO-}d_6$ como solvente.



Enquanto no espectro de RMN de ^1H do composto **4** (Figura 23), também foram observados sinais que corroboram com a formação do produto, tais como: um simpleto em 8,65 ppm, equivalente ao hidrogênio cumarínico mais desblindado (H4); um outro simpleto em 12,87 ppm referente ao hidrogênio ligado ao oxigênio da carboxila (COOH); dois simpletos em 10,64 e 9,57 ppm referente aos hidrogênios das hidroxilas presentes nas posições C7 e C8 do anel cumarínico e, finalmente, dois dupletos em 7,26 ppm e 6,86 ppm, ambos com constantes de acoplamentos de 8,5 Hz, referentes aos respectivos hidrogênios cumarínicos H5 e H6.

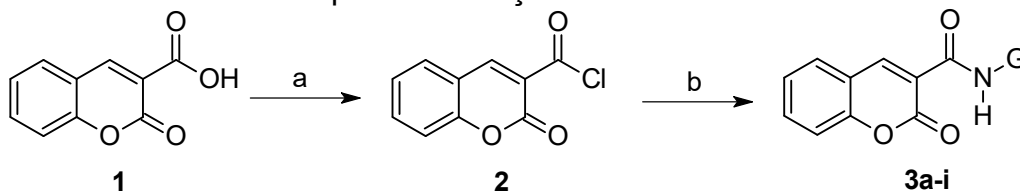
Figura 23 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **4** utilizando $\text{DMSO-}d_6$ como solvente.



3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS CUMARILAMIDAS (SÉRIE A, 3A-I)

Após a obtenção e caracterização do ácido 3-carboxicumarínico (**1**), as cumarilamidas desejadas foram obtidas em duas etapas adicionais. Através da reação do composto **1** com excesso de cloreto de tionila (SOCl_2), para formação do cloreto do ácido (**2**). Em seguida, as respectivas aminas (aromáticas, alifáticas, heterocíclicas) foram adicionadas juntamente com o composto **2**, utilizando-se acetona como solvente, para gerar as cumarilamidas correspondentes (**3a-i**), conforme Esquema 10.

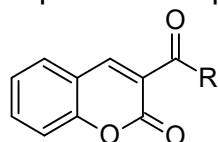
Esquema 10 - Rota sintética para a obtenção do cumarilamidas **3a-i**.



Reagentes e condições: a) SOCl_2 (26 eq), refluxo, 2h30 ; b) Amina correspondente (1,02 eq, **a-i**), acetona, refluxo, 1h.

Todas as cumarilamidas preparadas foram obtidas com êxito e com rendimentos variando entre 61-91% (Tabela 1), sendo bons rendimentos principalmente, considerando-se as duas etapas de reação, seguidas de uma etapa de cristalização para purificação. Sendo que as aminas aromáticas apresentaram um rendimento médio superior dentro da série planejada, em comparação às aminas alifáticas.

Tabela 1 - Rendimentos em duas etapas obtidos para cumarilamidas 3a-i.

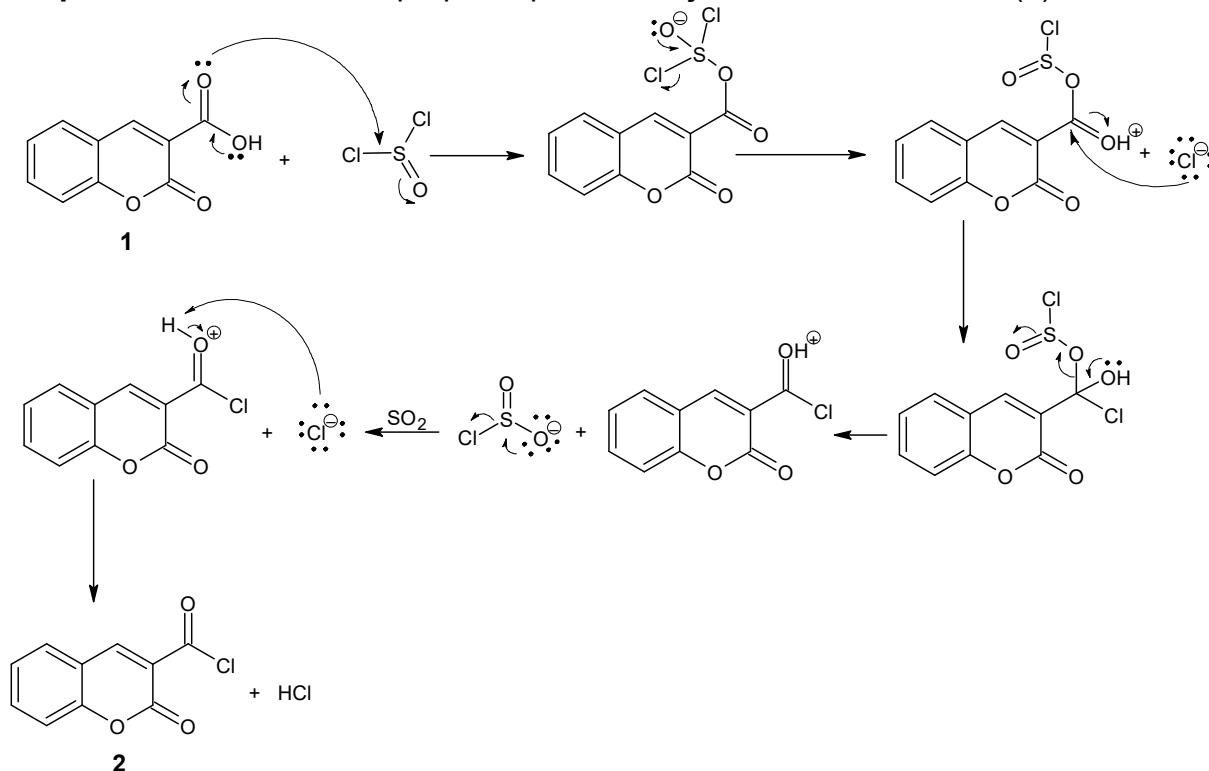


Substância	R	Caract. Física	Rend. (%)	P.F. Obtido	P.F. literatura
3a		Sólido amarelo	88	222-224°C	221°C (Yu <i>et al.</i> , 2018)
3b		Sólido branco	73	122-124°C	136-138°C (Sepay <i>et al.</i> , 2015)
3c		Sólido bege	84	235-237°C	230-232°C (Chimenti <i>et al.</i> , 2006)
3d		Sólido branco	91	270-273°C	147-148°C (Li <i>et al.</i> , 2025)
3e		Sólido castanho	64	155-156°C	139-140°C (Yu <i>et al.</i> , 2018)
3f		Sólido branco	61	185-187°C	194-196°C (Helal <i>et al.</i> , 2010)
3g		Sólido branco	90	219-220°C	210-211°C (Chimenti <i>et al.</i> , 2006)
3h		Sólido branco	74	131-134°C	128-130°C (Sepay <i>et al.</i> , 2015)
3i		Sólido castanho	77	122-124°C	203-204°C (He <i>et al.</i> , 2014)

O mecanismo proposto para primeira etapa de reação (Esquema 11) se inicia pelos processos de adição-eliminação nucleofílica da hidroxila presente no ácido 3-carboxicumarínico (**1**), pelo íon cloreto proveniente do cloreto de tionila. Para isso, primeiramente ocorre o ataque nucleofílico do oxigênio de (**1**) ao cloreto de tionila

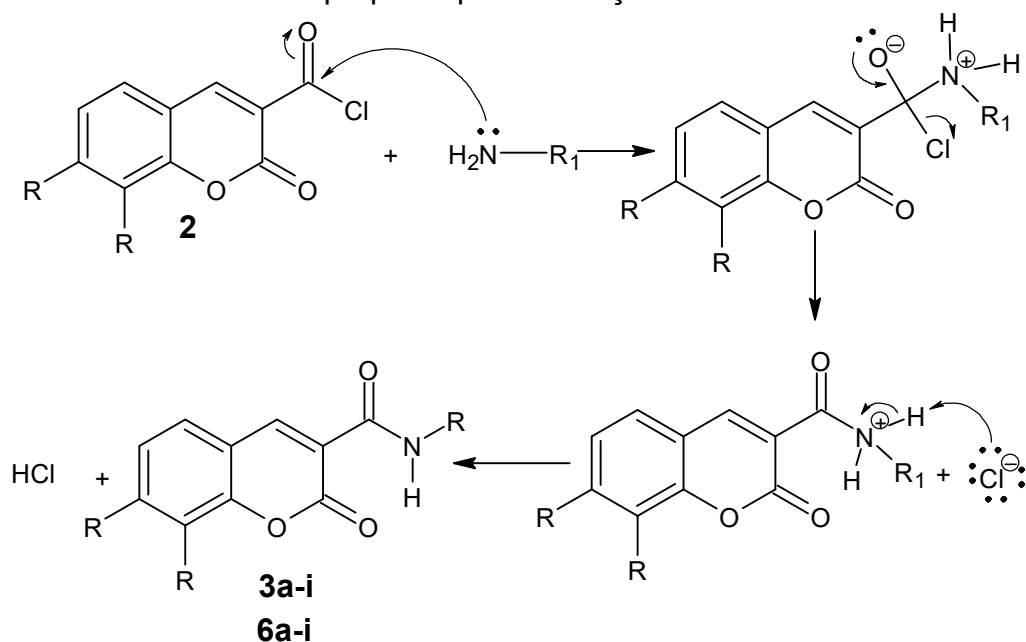
(SOCl₂), seguido de eliminação de um cloreto (Cl⁻) com posterior ataque deste nucleófilo ao carbono mais eletropositivo do ácido (**1**). Em seguida, ocorre a eliminação do dióxido de enxofre (SO₂) e do ácido clorídrico, de modo a se obter o cloreto de acila correspondente (**2**).

Esquema 11 - Mecanismo proposto para obtenção do cloreto de acila (**2**).



O mecanismo proposto para a segunda etapa de reação (Esquema 12) se inicia pelo ataque nucleofílico da amina correspondente à carbonila do cloreto de acila (**2**), carbono este altamente eletrofílico devido ao efeito retirador de elétrons exercido pelo oxigênio da carbonila e pelo cloro (grupo abandonador). Assim, um intermediário tetraédrico instável é formado, que se estabiliza com a eliminação do íon cloreto, que por fim, promove a desprotonação da amida, formando um ácido clorídrico, que é eliminado na forma gasosa.

Esquema 12 - Mecanismo proposto para obtenção das cumarilamidas.



As respectivas estruturas foram confirmadas inicialmente por obtenção dos espectros de massas de alta resolução ionizados positivamente por eletrospray (ESI(+)-QTOF-MS), os quais apresentaram os picos dos íons moleculares com razão m/z compatíveis com as massas molares das substâncias desejadas, que variaram de 231 a 334 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Posteriormente, através da análise dos espectros de RMN de ^1H , notou-se a presença de sinais característicos da formação das cumarilamidas, tais como: simpletos com deslocamentos químicos entre 10,54 e 10,90 ppm, referentes aos hidrogênios ligados aos nitrogênios das amidas (CONH), bem como simpletos com deslocamentos entre 8,22 e 8,93 ppm, relativos aos hidrogênios mais desblindados do anel cumarínico (H4). Dependendo da natureza (alifática ou aromática) dos grupos ligados ao nitrogênio amídico, foram observados sinais característicos nas regiões entre 8,0 e 9,0 ppm ou entre 10,0 e 11,0 ppm, respectivamente.

Desta forma, a título de exemplo, será exposto como foi realizada a caracterização espectroscópica do derivado **3a**, que apresentou ponto de fusão igual a 220°C (literatura 221°C, de acordo com Yu *et al.* 2018). No espectro de RMN de ^1H (Figura 24), identificou-se o sinal correspondente ao hidrogênio mais desblindado do anel cumarínico (H4), encontrando-se com um deslocamento químico de 8,91 ppm e, então, fez-se a integração do sinal, correspondente a 1,00. Em seguida, fez-se a integração dos outros sinais presentes no espectro, normalizados conforme a integral

de H4, encontrando-se assim a soma total de 10H, distribuídos em 8 sinais. Sabe-se que o sinal com o maior deslocamento químico (10,54 ppm) corresponde ao hidrogênio mais desblindado da estrutura (NH), pois possui integral equivalente a 1H e apresenta-se na forma de simpleto largo, sugerindo assim que este hidrogênio está ligado a um elemento eletronegativo, como nitrogênio. Observou-se também a presença de um duplo duplete em 8,01 ppm, com integral correspondente a 1H e constante de acoplamento de 7,8 Hz, sugerindo assim que o sinal corresponde a um hidrogênio relativamente desblindado (H5). Sequencialmente, encontramos um duplo duplo-duplete em 7,78 ppm, com integral correspondente a 1H e constantes de acoplamento de 8,7, 7,3 e 1,6 Hz, sugerindo um sinal de hidrogênio cumarínico (H7). Na região de 7,70 – 7,61 ppm, encontrou-se um multiplete com integração para 2H referente aos hidrogênios H12 e H16 do anel benzênico. Em 7,55 ppm, um duplete com integral correspondente a 1H e constante de acoplamento igual a 8,3 Hz, sugerindo um sinal de hidrogênio de cumarínico (H8). Em 7,47 ppm, apresentou-se um sinal de triplo duplete com integral correspondente a 1H e constantes de acoplamento de 7,5 e 1,1 Hz, indicando para um próton vizinho a dois hidrogênios em posição orto (-*o*) e outro hidrogênio vizinho em posição meta (-*m*), assim corroborando o hidrogênio cumarínico (H6). Outro multiplete pôde ser visto em 7,09–6,86 ppm, com integral correspondente a dois hidrogênios, referente aos hidrogênios benzênicos H13 e H15. Por fim, observou-se a presença de um simpleto em 3,75 ppm, com integração para 3H, concluindo-se assim que se trata dos hidrogênios H17a, H17b e H17 do substituinte metoxila presente na posição para (-*p*) ao anel benzênico. Com estas informações, concluiu-se o assinalamento dos sinais presentes no espectro de RMN de 1H do derivado **3a**, que se encontra resumido na Tabela 2.

Figura 24 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **3a** utilizando $\text{DMSO-}d_6$ como solvente.

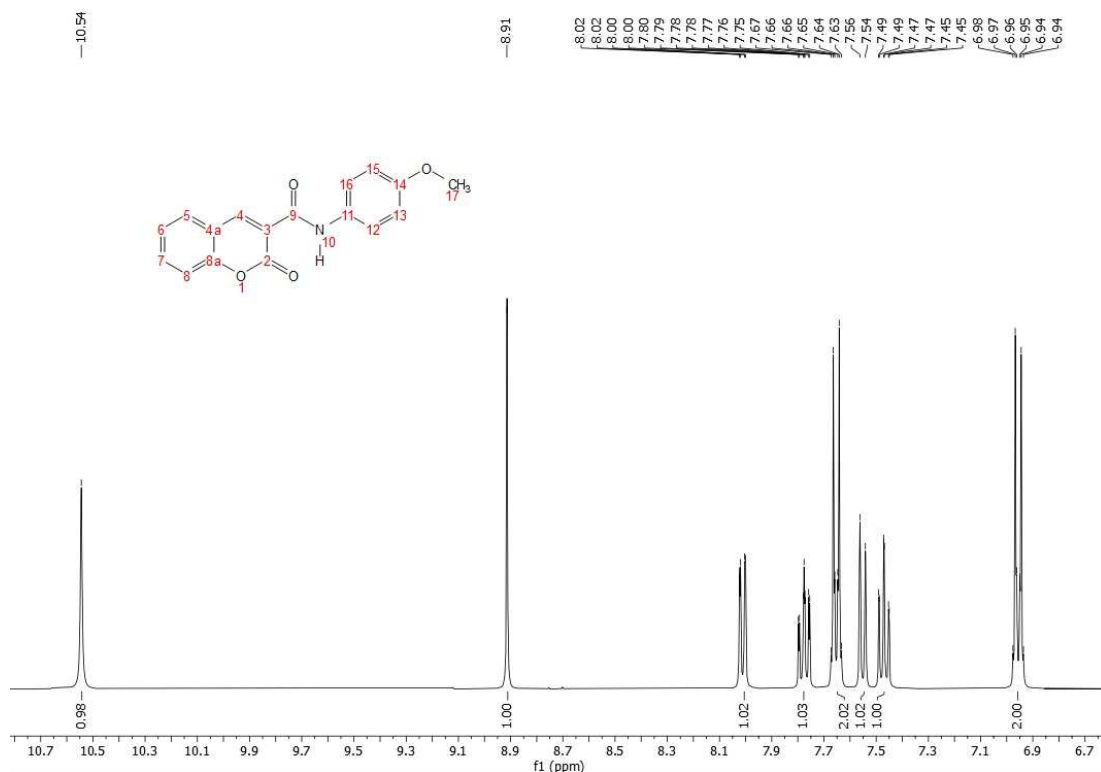


Tabela 2 - Deslocamentos químicos do RMN de ^1H (400 MHz, DMSO), em ppm, obtidos para a substância **3a**.

Nº H	δH (nH, m, J em Hz)
NH	10,54 (1H, s)
4	8,91 (1H, s)
5	8,01 (1H, dd, 7,8 e 1,6)
7	7,78 (1H, ddd, 8,7, 7,3 e 1,6)
12 e 16	7,70 – 7,61 (2H, m)
8	7,55 (1H, d, 8,3)
6	7,47 (1H, td, 7,5 e 1,1)
13 e 15	7,09 – 6,86 (2H, m)
17a, 17b e 17c	3,75 (3H, s)

A caracterização por espectrometria de massas de alta resolução ionizado positivamente por eletrospray (ESI(+)-QTOF-MS) foi realizada por meio de propostas do íon molecular e respectivas fragmentações, conforme demonstrado na Figura 25. Para a molécula **3a**, com massa monoisotópica de 295,0844 Da, observou-se um sinal correspondente ao íon molecular positivamente ionizado $[\text{M}+\text{H}]^+$ com a m/z de

296,0914, que está de acordo com o esperado para a massa molecular mais um próton 296,0917 Da. Também foi observada a formação do íon aduto $[M+Na]^+$ de m/z 308,0736 Da (esperado 308,0737 Da) (Figura 26). Quanto às fragmentações, foi encontrado um sinal de m/z de 173,0240 Da, correspondente à formação do íon acílio, um fragmento estável muito comum para compostos carbonilados, proveniente de fragmentações α (Paiva *et al.*, 2015).

Figura 25 - Possíveis fragmentos gerados no espectro de massas para a estrutura **3a**.

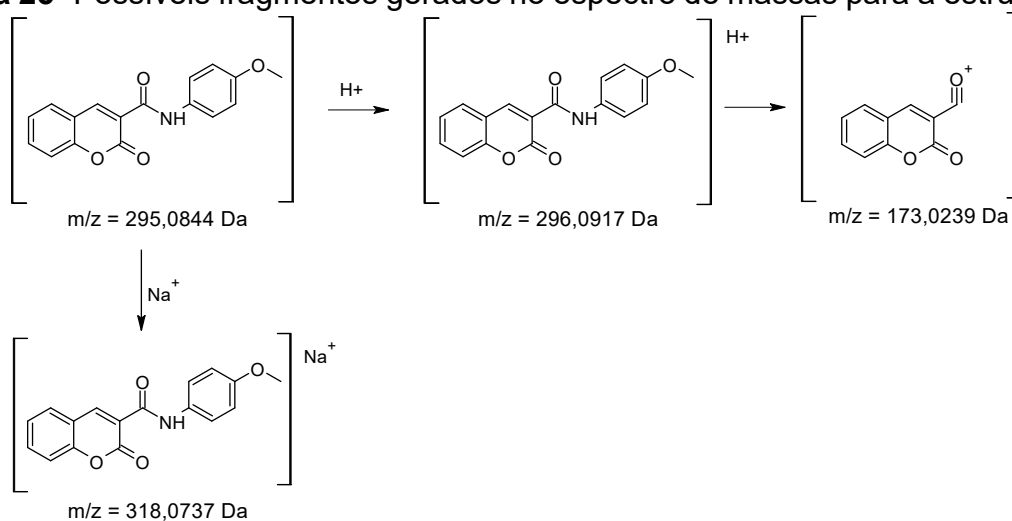
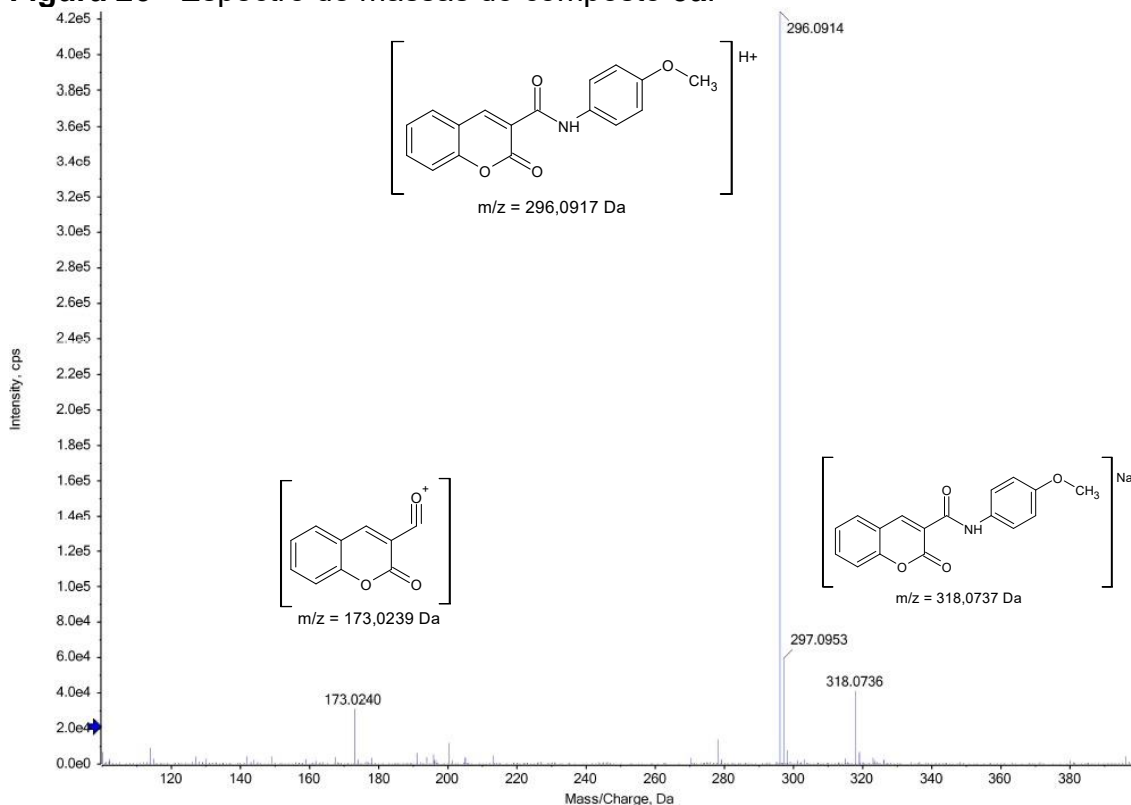


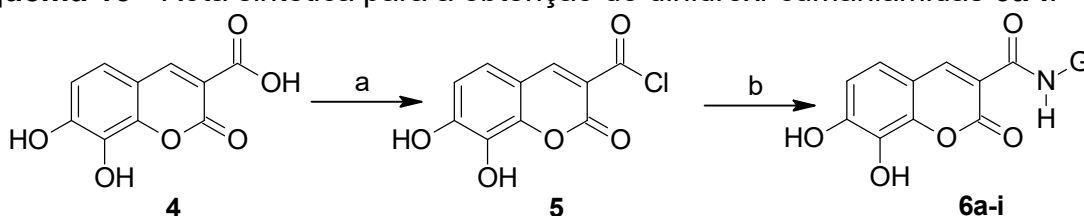
Figura 26 - Espectro de massas do composto **3a**.



3.3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS DI-HIDROXI-CUMARILAMIDAS (SÉRIE B, 6A-I)

Após a obtenção e caracterização do ácido 3-carboxi-7,8-dihidroxicumarínico (**4**), este reagiu com cloreto de tionila (SOCl_2), utilizando *N,N*-dimetilformamida (DMF) como catalisador e acetonitrila como solvente, para formação do respectivo cloreto do ácido (**5**). Em seguida, as respectivas aminas (aromáticas, alifáticas, heterocíclicas) foram adicionadas juntamente com o composto **5**, utilizando-se acetonitrila como solvente, para gerar as dihidroxi-cumarilamidas correspondentes (**6a-i**), conforme Esquema 13.

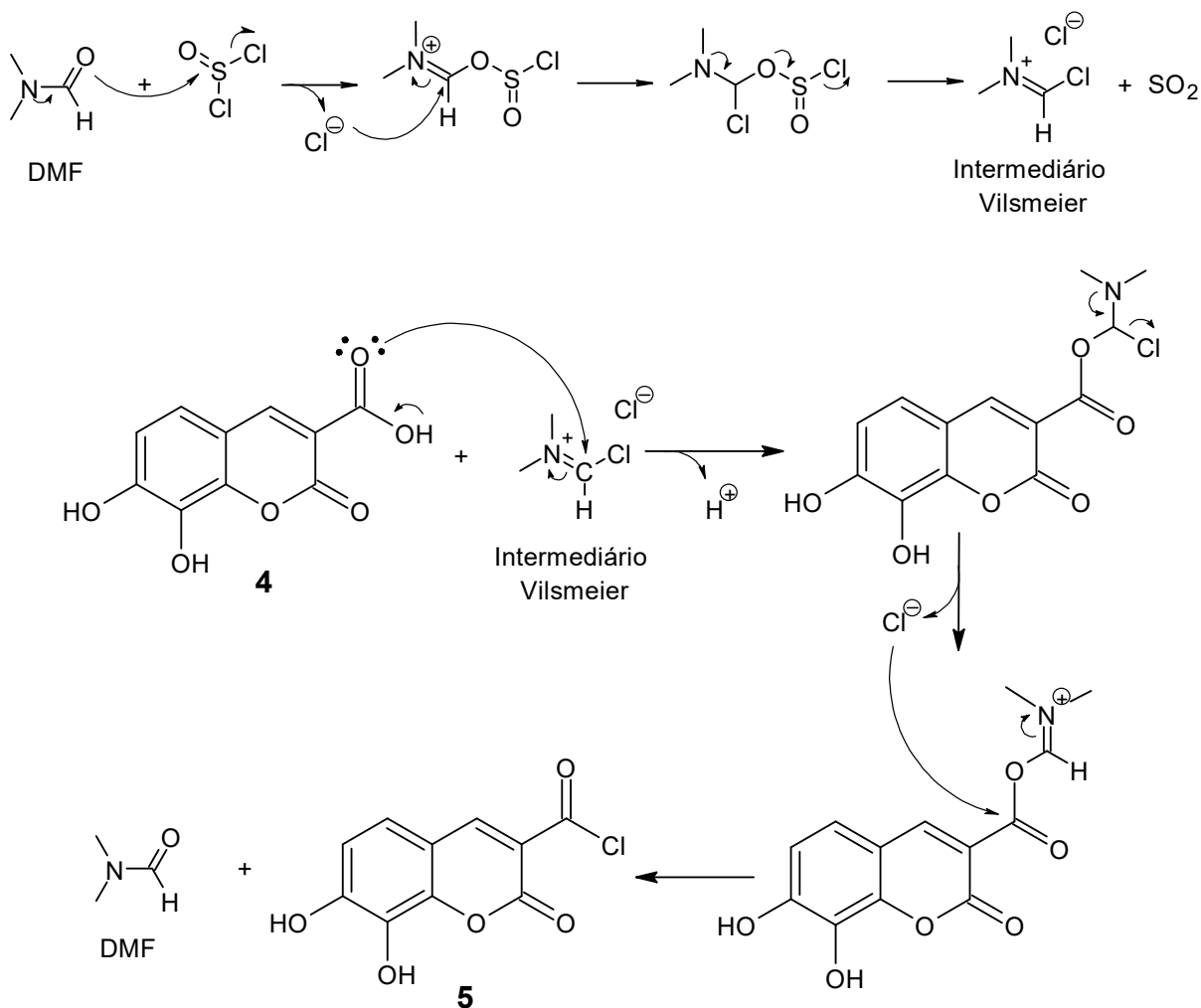
Esquema 13 - Rota sintética para a obtenção do dihidroxi-cumarilamidas **6a-i**.



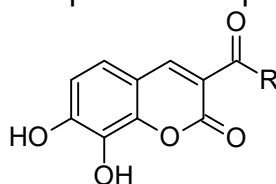
Reagentes e condições: a) SOCl_2 (3,3 eq), DMF (gotas), acetonitrila, 40-50°C, 2h ; b) amina correspondente (1,1 eq, **a-i**), 20-25°C, 2h.

A proposta de mecanismo (Esquema 14), se inicia com o ataque nucleofílico do oxigênio carbonílico da *N,N*-dimetilformamida (DMF) ao enxofre eletrofílico do cloreto de tionila (SOCl_2), formando um intermediário do tipo Vilsmeier (íon clorometilenímínio). Em seguida, o oxigênio carbonílico do ácido carboxílico (**4**) ataca o carbono eletrofílico desse intermediário, promovendo a eliminação de um ânion cloreto. Este ânion atua como nucleófilo, atacando a carbonila do novo intermediário e originando o cloreto de acila (**5**), com liberação do DMF regenerado, confirmando seu papel catalítico. Durante o processo, o SOCl_2 é consumido, liberando dióxido de enxofre (SO_2), como subproduto gasoso.

Esquema 14 - Mecanismo proposto para obtenção do cloreto de acila (**5**) utilizando DMF como catalisador.



Todas as cumarilamidas preparadas foram obtidas com êxito e com rendimentos variando entre 63-93% (Tabela 3), sendo bons rendimentos principalmente considerando-se as duas etapas de reação, seguidas de uma etapa de cristalização para purificação. Ao contrário do observado na série anterior (A), nesta série (B) as cumarilamidas referentes às aminas alifáticas apresentaram rendimentos superiores às demais aminas sintetizadas. As respectivas estruturas foram confirmadas inicialmente por obtenção dos espectros de massas de alta resolução, ionizados positivamente por eletrospray (ESI(+)-QTOF-MS), nos quais apresentaram os picos do íon molecular com razão m/z compatíveis com a massa molar das substâncias planejadas, que variaram de 263 a 366 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Posteriormente, através da obtenção de RMN de ^1H , nos quais apresentaram sinais característicos da formação das amidas desejadas, com deslocamento químico de 8,59 e 10,90 ppm, referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio das amidas (NH), bem como um simpleto com deslocamento entre 8,05 e 8,83 ppm, relativo ao hidrogênio do anel cumarínico (H4).

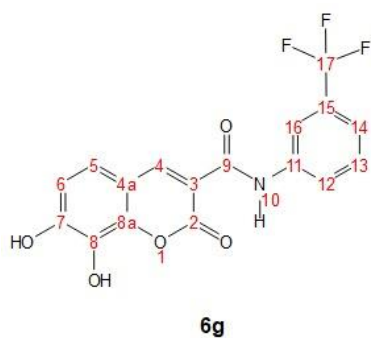
Tabela 3 - Rendimentos em duas etapas obtidos para dihidroxi-cumarilamidas 6a-i

Substância	R	Caract. Física	Rend. (%)	P.F. obtido	P.F. literatura
6a		Sólido amarelo	76	>300°C	Inédito
6b		Sólido amarelo	76	260-261°C	Inédito
6c		Sólido castanho	64	255-258°C	Inédito
6d		Sólido castanho	83	208-210°C	Inédito
6e		Sólido castanho	89	258-260°C	Inédito
6f		Sólido bege	68	256-257°C	Inédito
6g		Sólido amarelo	90	>300°C	Inédito
6h		Sólido verde	91	216-218°C	Inédito
6i		Sólido amarelo	93	283-285°C	Inédito

Desta forma, a título de exemplo, detalhamos como se procedeu a caracterização espectroscópica do derivado **6g**. No espectro de RMN de ^1H (Figura 27), identificou-se o sinal correspondente ao hidrogênio mais desblindado do anel cumarínico (H4), encontrado com um deslocamento químico de 8,83 ppm, e, então, fez-se a integração do sinal, correspondente a 1,00. Em seguida, fez-se a integração dos outros sinais presentes no espectro, normalizados conforme a integral de H4, encontrando-se assim a soma total de 10H, distribuídos em 10 sinais. Sabe-se que o sinal com o maior deslocamento químico (10,90 ppm) corresponde ao hidrogênio mais desblindado da estrutura (NH). Também com grandes deslocamentos químicos, encontraram-se dois sinais com integrais equivalentes a um hidrogênio cada, em 10,80 ppm e 9,70 ppm, apresentando-se na forma de simpletos largos, o que indica

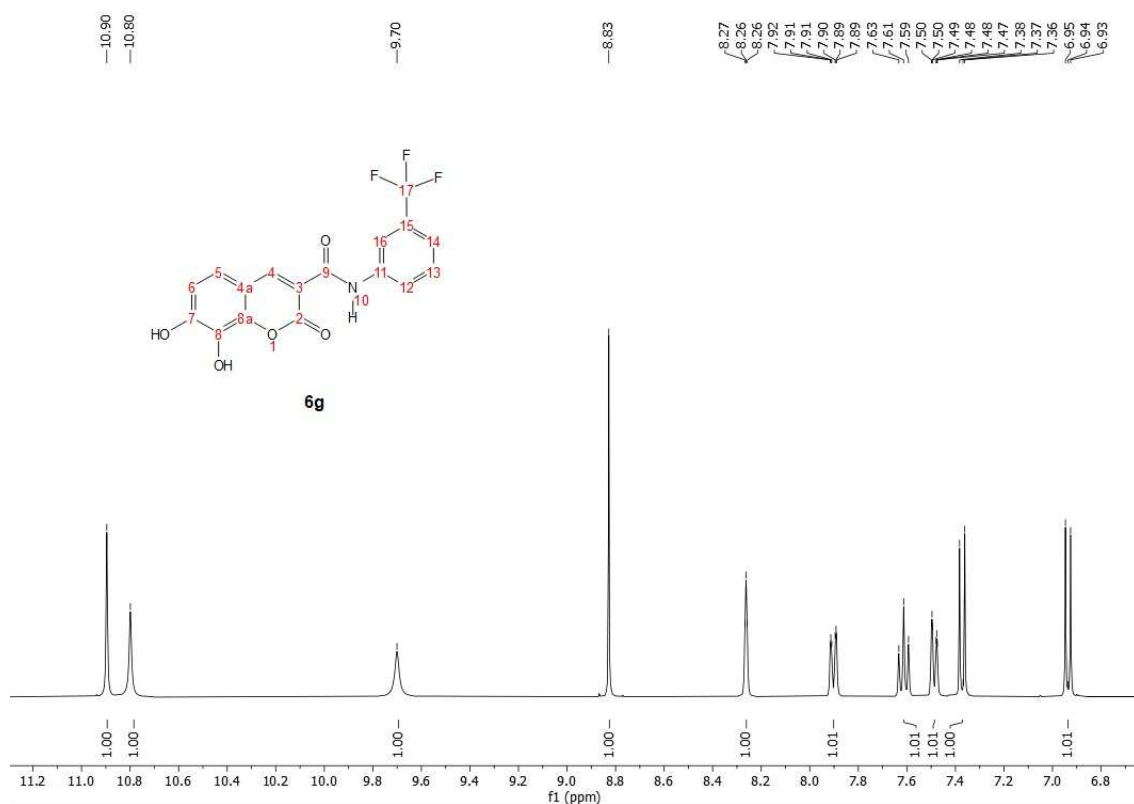
que estes hidrogênios estão ligados a um elemento eletronegativo, como oxigênio. Desta forma, concluímos que são as hidroxilas substituintes no anel cumarínico nas posições 7 e 8. Sequencialmente, observou-se um tripleto com deslocamento em 8,26 ppm, com integral equivalente a 1H e constante de acoplamento de 2,0 Hz, relativo ao hidrogênio do anel benzênico (H12). Um multipletto entre 7,94–7,87 ppm, com integral correspondente a 1H, correspondente a um hidrogênio aromático (H16). Um tripleto em 7,61 ppm, com integral correspondente a 1H e constante de acoplamento de 8,0 Hz, sugere um sinal de hidrogênio aromático (H13). Um outro multipletto entre 7,52–7,45 ppm e integral equivalente a 1H, indicando que é um hidrogênio aromático (H14), completando assim o sistema aromático ligado à porção do grupo amida formado. Em 7,37 ppm, um dupletto com integral correspondente a 1H e constante de acoplamento igual a 8,6 Hz, corresponde a um sinal de hidrogênio cumarínico (H5). Por último, encontrou-se um segundo dupletto em 6,94 ppm, com integral equivalente a 1H e constante de acoplamento de 8,5 Hz, indicando que é o último hidrogênio do anel cumarínico (H6). Com estas informações, concluiu-se o assinalamento dos sinais presentes no espectro de RMN de ^1H do derivado **6g**, que se encontra resumido na Tabela 4.

Tabela 4 - Deslocamentos químicos do RMN de ^1H (400 MHz, DMSO), em ppm, obtidos para a substância **6g**.



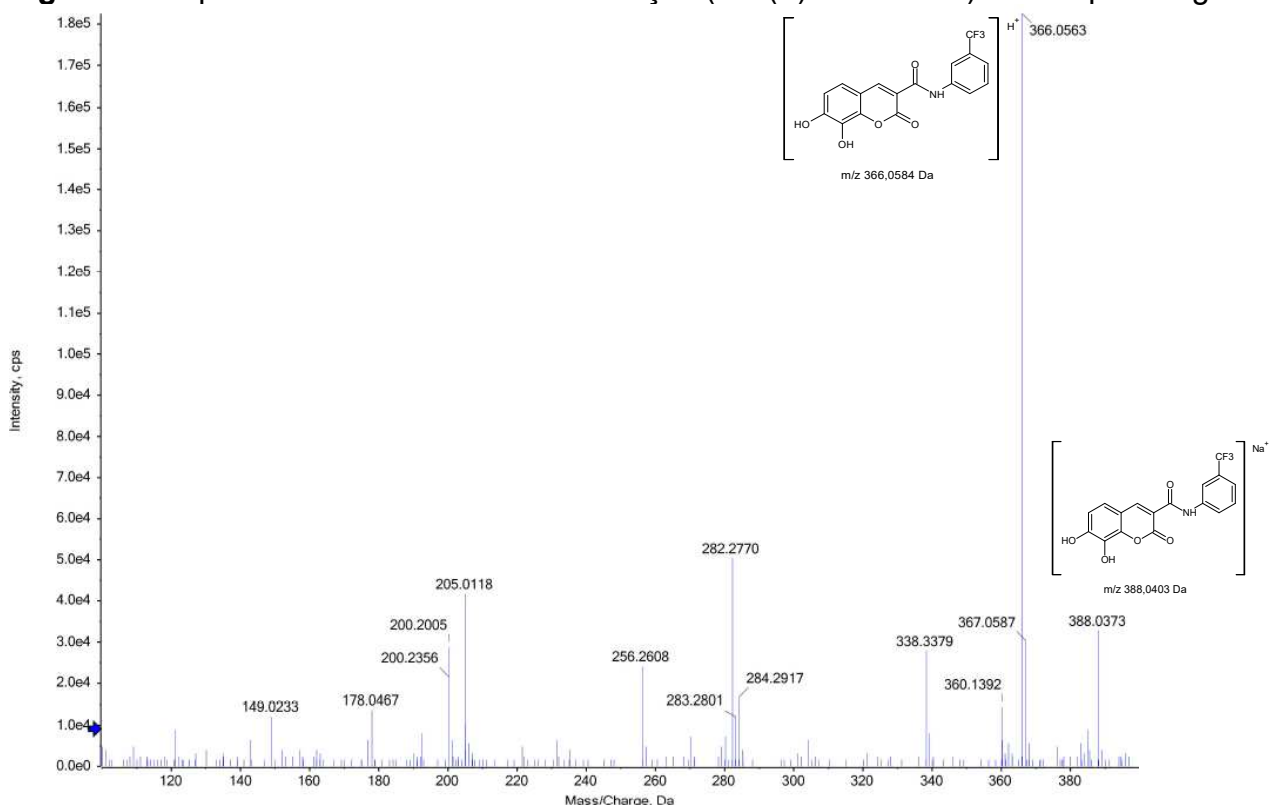
Nº H	δH (nH, m, J em Hz)
NH	10,90 (1H, s)
OH7	10,80 (1H, s)
OH8	9,70 (1H, s)
4	8,83 (1H, s)
12	8,26 (1H, t, 2,0)
16	7,94 – 7,87 (1H, m)
13	7,61 (1H, t, 8,0)
5	7,52 – 7,45 (1H, m)
14	7,37 (1H, d, 8,6)
6	6,94 (1H, d, 8,5)

Figura 27 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **6g** utilizando $\text{DMSO-}d_6$ como solvente.



A caracterização por espectrometria de massas de alta resolução ionizado positivamente por eletrospray (ESI(+)-QTOF-MS) foi realizada por meio de propostas do íon molecular e respectivas fragmentações, conforme demonstrado na Figura 28. Para a molécula **6g**, com massa monoisotópica de 365,0511 Da, observou-se um sinal correspondente ao íon molecular positivamente ionizado $[\text{M}+\text{H}]^+$ com a m/z de 366,0602, que está de acordo com o esperado para a massa molecular mais um próton 366,0584 Da. Quanto às fragmentações, foram encontrados dois sinais, nos quais correspondem as fragmentações na porção amida da molécula, fragmentos estes de m/z de 222,1836 Da (esperado 222,0397 Da) e 274,2535 Da (esperado 274,0710 Da), corroborando a caracterização esperada para o composto **6g**.

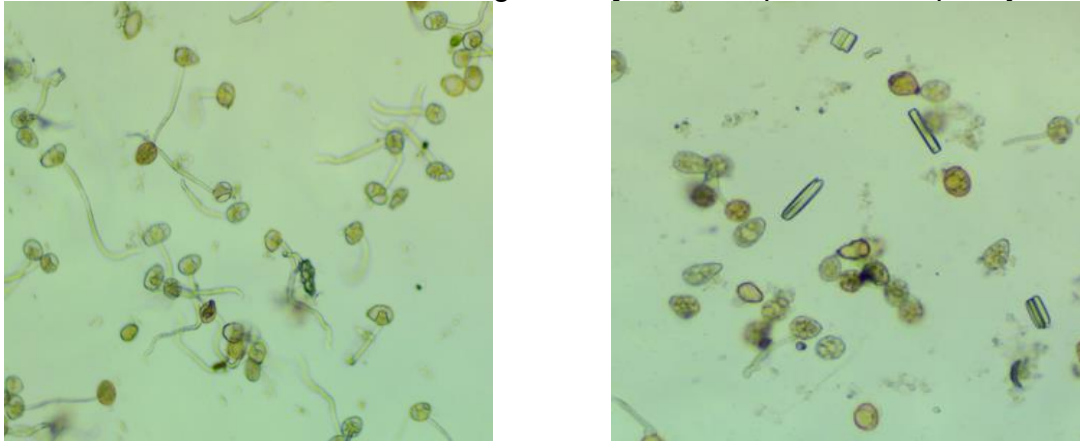
Figura 28-Espectro de massas de alta resolução (ESI(+)-QTOF-MS) do composto 6g.



3.4 ENSAIOS IN VITRO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Depois de devidamente sintetizadas e caracterizadas, dezoito cumarilamidas foram submetidas a ensaios *in vitro* de inibição de germinação dos esporos *P. pachyrhizi* em meio de cultura (BLUM, 2009). Após devida semeadura e incubação, a germinação dos esporos foi quantificada em microscópio óptico (10X), sendo considerado germinado o esporo com tubo germinativo maior que o comprimento do esporo (Figura 26).

Figura 29 - Fotos de testes *in vitro* de germinação dos esporos de *P. pachyrhizi*.



Fonte - Autoria própria.

Foto à esquerda: Teste controle (alto nível de germinação), tubo germinativo maior que comprimento do esporo. Foto à direita: Teste com Fluxapiraxade (baixo nível de germinação), sem tubo germinativo ou malformados.

Como é possível observar nos Gráficos 3 e 4, as cumarilamidas apresentaram uma taxa de inibição de germinação dos esporos entre 3 e 82% com porcentagens de germinação entre 13 e 70%. Considerando que o ensaio controle teve 72% de germinação, quinze das substâncias avaliadas apresentaram porcentagens inibição de germinação menores do que 50%, o que não representa um bom potencial antifúngico nesse experimento. Entretanto, os compostos **3i** (82%), **3h** (81%) e **3g** (57%) com taxa de inibição superiores a 50% merecem destaque, visto que apresentaram resultados semelhantes aos fungicidas Protioconazol (76%) e Fluxapiraxade (61%), utilizados como controles positivos.

Gráfico 3 - Porcentagens de germinação *in vitro* para estudo de sensibilidade antifúngica dos compostos 18 cumarilamidas sintetizadas em dos esporos do fungo *P. pachyrhizi*, classificados pelo nível de sensibilidade.

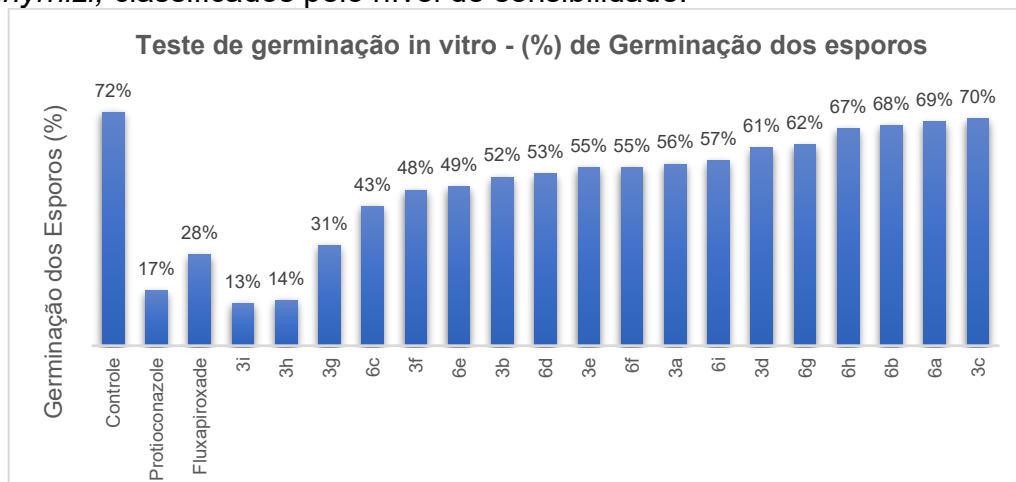
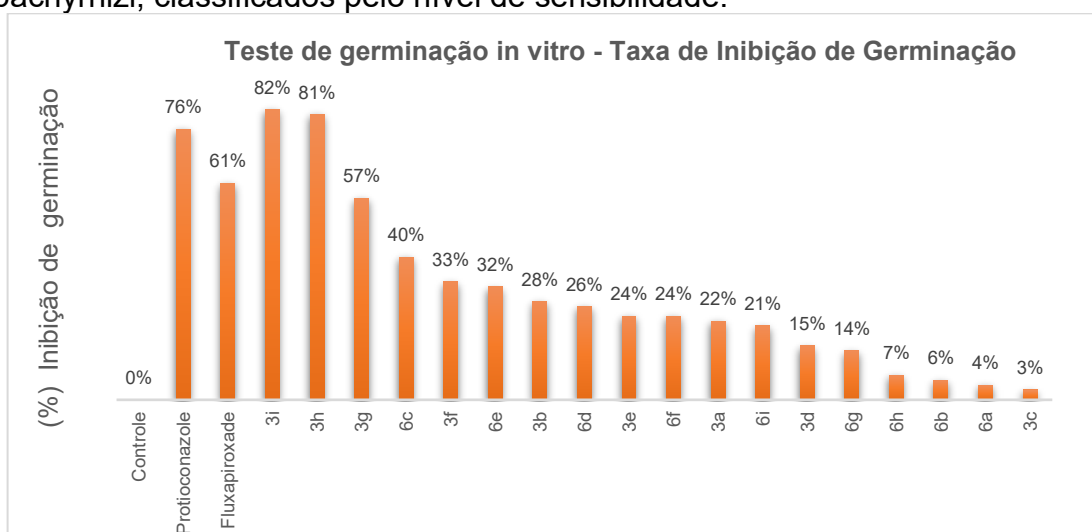
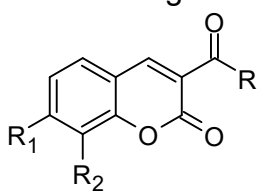
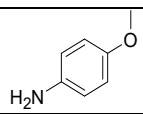
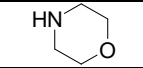
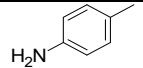
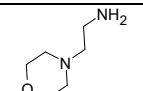
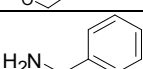
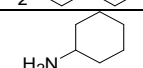
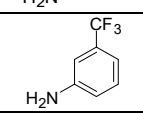
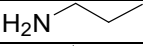
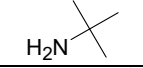
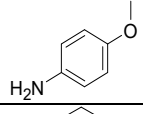
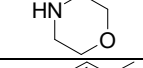
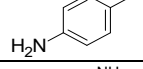
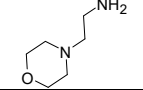
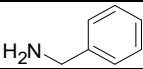
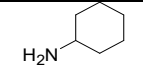
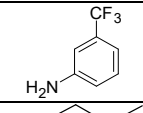
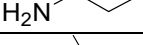
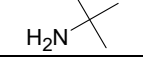


Gráfico 4 - Taxa de inibição de germinação in vitro para estudo de sensibilidade antifúngica dos compostos 18 cumarilamidas sintetizadas em dos esporos do fungo *P. pachyrhizi*, classificadas pelo nível de sensibilidade.



Analisando-se a Tabela 5, pode-se realizar um estudo de relação estrutural-atividade preliminar dessa classe de compostos. De um modo geral, observa-se que os derivados da Série A apresentaram os melhores resultados de inibição de germinação dos esporos variando de 3 a 82% versus 4 a 40% na Série B. Ademais, comparando-se os derivados que apresentam os mesmos substituintes nas duas séries, é possível notar que, dentre os nove derivados, seis pertencentes a Série A (**3a**, **3b**, **3f**, **3g**, **3h** e **3i**) foram mais ativos do que seus correspondentes na Série B, o que sugere que as hidroxilas ligadas ao anel cumarínico não parecem ser relevantes para a atividade antifúngica avaliada através dessa metodologia (ensaios de germinação de esporos).

Tabela 5 - Resultados dos testes de germinação in vitro para estudo de sensibilidade antifúngica dos compostos **3a-i** e **6a-i** sobre os esporos do fungo *P. pachyrhizi*, classificados entre compostos da mesma série.

Estrutura geral		R_1 e R_2	R	Rend. (%)	Germinação dos esporos (%)	Porcentagem de inibição (%)
						
Controle		-	-	-	72	0
Proticonazol		-	-	-	17	76
Fluxapiroxade		-	-	-	28	61
Série A	3a	$R_1, R_2 = H$		88	56	22
Série A	3b	$R_1, R_2 = H$		73	52	28
Série A	3c	$R_1, R_2 = H$		84	70	3
Série A	3d	$R_1, R_2 = H$		91	61	15
Série A	3e	$R_1, R_2 = H$		64	55	24
Série A	3f	$R_1, R_2 = H$		61	48	33
Série A	3g	$R_1, R_2 = H$		90	31	57
Série A	3h	$R_1, R_2 = H$		74	14	81
Série A	3i	$R_1, R_2 = H$		77	13	82
Série B	6a	$R_1, R_2 = OH$		76	69	4
Série B	6b	$R_1, R_2 = OH$		76	68	6
Série B	6c	$R_1, R_2 = OH$		64	43	40
Série B	6d	$R_1, R_2 = OH$		83	53	26
Série B	6e	$R_1, R_2 = OH$		89	49	32
Série B	6f	$R_1, R_2 = OH$		68	55	24
Série B	6g	$R_1, R_2 = OH$		90	62	14
Série B	6h	$R_1, R_2 = OH$		91	67	7
Série B	6i	$R_1, R_2 = OH$		93	57	21

Dentro da Série A, observou-se que a presença de substituintes de caráter alifático, especialmente, pouco volumosos como propila (**3h**) e *t*-butila (**3i**), contribuiu positivamente para a obtenção dos melhores resultados: 81 e 82% de inibição de germinação, respectivamente. Contrariamente, a presença de substituintes aromáticos parece contribuir negativamente para a atividade biológica, sobretudo quando o anel benzênico apresenta grupos doadores de elétrons, como metoxila (**3a**, 22%) e metila (**3c**, 3%), quando comparados a grupos retiradores de elétrons como a trifluormetila (**3g**, 57%). Esse mesmo padrão não foi observado para a Série B, na qual o melhor resultado foi obtido justamente para um derivado aromático substituído por um grupo doador de elétrons (metila, **6c**, 40%). Nessa série, a substituição do anel benzênico com grupos mais fortemente doadores como a metoxila (**6a**, 4%) ou retiradores como a trifluormetila (**6g**, 14%) prejudica a atividade em comparação ao derivado metilado (**6c**, 40%). Com relação aos derivados alifáticos da Série B, também houve uma modificação na relação observada para a Série A, pois os derivados menos volumosos, como aqueles que apresentam a propila (**6h**, 7%) e morfolina (**6b**, 6%) apresentaram os piores resultados, enquanto derivados contendo grupos mais volumosos foram ligeiramente mais potentes, tais como: *t*-butila (**6i**, 21%) e 4-(2-aminoetil)morfolina (**6d**, 26%).

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 PROCEDIMENTOS GERAIS

Os solventes e reagentes, para fins sintéticos, foram tratados, destilados e secos, conforme necessidades requeridas nas metodologias adotadas e de acordo com os processos descritos por Armarego e Chai. (Armarego et al., 2003). O processo de monitoramento das reações foi realizado através de análises de cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta. De acordo com as seguintes condições operacionais: Coluna cromatográfica de fase reversa RP-18 (150 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno x 5 µm tamanho de partícula), marca Waters, temperatura da coluna de 25°C, fluxo de fase móvel de 1,0 mL/min, comprimento de onda de 220 nm e volume de injeção de 5 µL. A fase móvel em gradiente constituída de metanol grau HPLC e solução aquosa de formiato de amônio 5 mM + 0,1% de ácido fórmico. Aquisição dos dados foi adquirida pelo Software OpenLab da empresa

Agilent Technologies. As amostras foram preparadas através da adição de uma gota do meio reacional em 10 mL de metanol e levadas ao ultrassom até solubilização completa.

4.2 MÉTODO DE CARACTERIZAÇÃO

Os espectros de massas de alta resolução (QTOF-MS) foram obtidos através de infusão direta e com ionização positiva por eletrospray, no espectrômetro de massa de alta resolução (QTOF-MS) da marca SCIEX modelo X500R, do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da empresa Adama Brasil S.A. O software utilizado para aquisição e tratamento dos espectros obtidos foi o SCIEX OS. Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker modelo Avance III, operando a 400 MHz para ^1H , equipado com sondas multinucleares de 5 mm. Os espectros foram registrados utilizando o DMSO-D como solvente. O software utilizado para o processamento dos espectros de RMN foi o MestreNova (Versão 14). Para calibração do espectro de RMN de ^1H foram adotados os valores de 2,50 ppm para o DMSO. As áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica, e suas multiplicidades foram descritas da seguinte forma: simpleto (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q), duplo duplete (dd), duplo duplo-duplete (ddd) e multiplete (m). As constantes de acoplamento (J) foram relatadas em Hz.

4.3 SÍNTESE DO ÁCIDO 3-CARBOXICUMARÍNICO

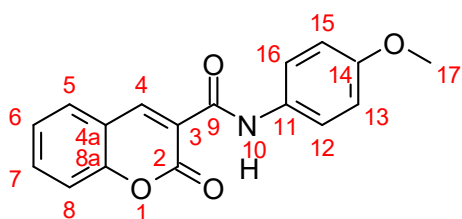
Em um reator de vidro encamisado de 500 mL equipado com agitação mecânica, adicionou-se 250 mL de água destilada, salicilaldeído (10,7 g; 0,0876 mol) e ácido de Meldrum (12,9 g; 0,0895 mol) com agitação de 200 rpm. A mistura reacional permaneceu sob agitação e aquecimento a 75°C durante 4 horas. Uma amostra do meio reacional foi coletada para análise da conversão do material de partida por cromatografia líquida de alta eficiência. A reação foi considerada concluída quando o teor de salicilaldeído encontrado fosse menor que 0,1% em normalização de área. Na sequência, a mistura reacional foi arrefecida à temperatura ambiente, e então, o precipitado foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada gelada (3 x 30 mL). A massa úmida foi levada à estufa a 70 °C para secagem até que a massa fosse

constante. O ácido 3-carboxicumarínico (Massa molecular: 190,15 g/mol) foi obtido como um sólido branco (14,3 g) com rendimento de 94%.

4.4 SÍNTESE DA CUMARILAMIDAS 3A-I

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, acoplado a um condensador de refluxo, adicionou-se 0,5 g do ácido 3-carboxicumarínico (2,63 mmol), 5,0 mL de cloreto de tionila (26 eq.). A mistura reacional permaneceu sob refluxo e agitação por 2 horas e 30 minutos, conforme descrito por Saeed et al, 2015. Então, o excesso de cloreto de tionila foi removido com o auxílio de vácuo. Em seguida, ao cloreto de ácido cumarínico formado, foi adicionada uma solução da amina (aromática, alifática, heterocíclica) correspondente (2,68 mmol, 1,02 eq) em 20 mL de acetona. A reação permaneceu sob refluxo e agitação por 1 hora. Uma amostra do meio reacional foi coletada para análise da conversão na cumarilamida correspondente por cromatografia líquida de alta eficiência. A reação foi considerada concluída quando o teor de cloreto ácido (**2**) encontrado fosse menor que 0,1% em normalização de área. Posteriormente, a solução foi vertida em um béquer contendo gelo picado e o precipitado obtido foi então filtrado a vácuo e lavado com água destilada gelada (3 x 5 mL). Então os produtos formados foram secos em estufa a 70°C até massa constante. Assim, obtiveram-se as substâncias **3a-i** com rendimentos entre 64 e 90%.

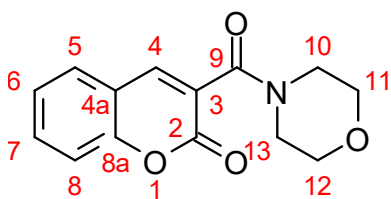
N-(4-metoxifenil)-3-carboxamida-cumarina (3a): Sólido amarelo; 88%; **P.F.:** 222-224 (233-235°C, Yu *et al.*, 2018). **RMN ¹H (DMSO, 400 MHz) δ:** 10.54 (s, 1H, NH10),



8.91 (s, 1H, H4), 8.01 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H, H5), 7.78 (ddd, J = 8.7, 7.3, 1.6 Hz, 1H, H7), 7.70 – 7.61 (m, 2H, H12 e H16), 7.55 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H8), 7.47 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H, H6), 7.09 – 6.86 (m, 2H, H13 e H15), 3.75 (s, 3H, H17a, H17b e H17c).

HRMS (ESI+) (m/z): [M+H]⁺= 296,0914 Da (calculado 296,0917 Da) e [M+Na]⁺= 318,0736 Da (calculado: (318,0737 Da).

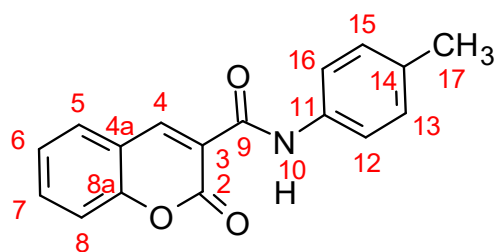
3-morfolinacarbonil-cumarina (3b): Sólido branco; 73%; **P.F.:** 122-124°C (136-138°C, Sepay *et al.*, 2015) **RMN ¹H (DMSO, 400 MHz) δ:**



8.22 (s, 1H, H4), 7.78 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1H, H8), 7.68 (ddd, J = 8.3, 7.3, 1.6 Hz, 1H, H6), 7.46 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H1), 7.41 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H, H5), 3.66 – 3.58

(m, 4H, H11a, H11b, H12a e H12b), 3.55 (t, J = 4.8 Hz, 2H, H10a e H10b), 3.40 (dd, J = 5.5, 4.0 Hz, 2H, H13a e H13b). **HRMS (ESI+) (m/z):** [M+H]⁺=260,0912 Da (calculado: 260,0917Da) e [M+Na⁺]= 282,0738 Da (calculado: (282,0737 Da).

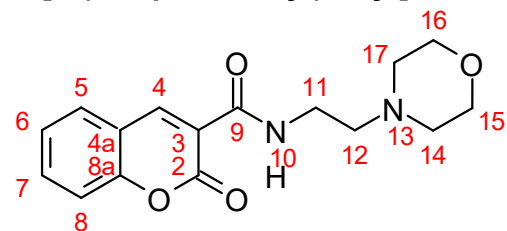
N-(4-metilfenil)-3-carboxamida-cumarina (3c): Sólido bege; 84%; **P.F.lit.:** 235-237°C (230-232°C, Chimenti *et al.*, 2006). **RMN ¹H (DMSO, 400 MHz) δ:**



10.61 (s, 1H, NH10), 8.93 (s, 1H, H4), 8.03 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H, H5), 7.79 (ddd, J = 8.7, 7.3, 1.6 Hz, 1H, H6), 7.66 – 7.59 (m, 2H, H12 e H16), 7.57 (d, J = 8.3 Hz, 1H8), 7.48 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H, H7), 7.20 (d, J

= 8.2 Hz, 2H, H13 e H16), 2.30 (s, 3H, H17a, H17b e H17c). **HRMS (ESI+) (m/z):** [M+H]⁺=280,0927 Da (calculado: 280,0895 Da) e [M+Na⁺]= 302,0752 Da (calculado: (302,0788 Da).

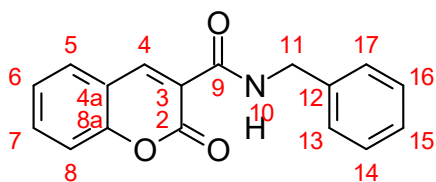
N-[2-(morfolin-4-yl)etil]-3-carboxamida-cumarina (3d): Sólido branco; 91%; **P.F.:** 270-273°C (147-148°C (Li *et al.*, 2025).



RMN ¹H (DMSO, 400 MHz) δ: 8.97 (t, J = 6.0 Hz, 1H, NH10), 8.90 (s, 1H, H4), 8.01 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H, H5), 7.77 (ddd, J = 8.7, 7.4, 1.6 Hz,

1H, H6), 7.52 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H8), 7.49 – 7.42 (m, 1H, H7), 3.96 (d, J = 12.9 Hz, 2H, H11a e H11b), 3.77 (dd, J = 17.9, 9.1 Hz, 4H, H15a, H15b, H16a e H16b), 3.52 (d, J = 12.4 Hz, 2H, H12a e H12b), 3.35 (s, 2H, H14a e H14b), 3.11 (d, J = 11.7 Hz, 2H, H17a e H17b). **HRMS (ESI+) (m/z):** [M+H]⁺=303,1333 Da (calculado: 303,139 Da).

N-(benzil)-3-carboxamida-cumarina (3e): Sólido castanho; 64%; **P.F.:** 155-156°C
139-140°C (Yu *et al.*, 2018). **RMN ¹H (DMSO, 400**

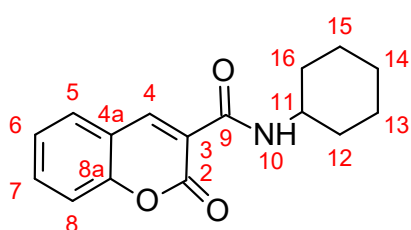


MHz) δ: 9.13 (t, J = 6.1 Hz, 1H, NH10), 8.89 (d, J = 0.7 Hz, 1H, H4), 8.00 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H, H5), 7.76 (ddd, J = 8.8, 7.3, 1.6 Hz, 1H, H6), 7.52 (d, J =

8.3 Hz, 1H, H8), 7.45 (td, J = 7.6, 1.1 Hz, 1H, H7), 7.42 – 7.31 (m, 4H, H13, H14, H16 e H17), 7.26 (ddt, J = 8.5, 5.2, 2.7 Hz, 1H, H15), 4.55 (d, J = 6.1 Hz, 2H, H11a e H11b).

HRMS (ESI+) (m/z): [M+H]⁺=280,0971 Da (calculado: 280,0895 Da) e [M+Na]⁺=302,0801 Da (calculado: (302,0788 Da).

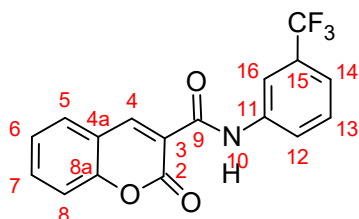
N-ciclohexil-3-carboxamida-cumarina (3f): Sólido branco; 61%; **P.F.:** 185-187°C
(194-196°C, Helal *et al.*, 2010). **RMN ¹H (DMSO, 400**



MHz) δ: 8.86 (s, 1H, H4), 8.62 (d, J = 7.8 Hz, 1H, NH10), 7.99 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H, H5), 7.75 (ddd, J = 8.6, 7.3, 1.6 Hz, 1H, H6), 7.52 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H8), 7.45 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H, H7), 3.81 (dt, J = 9.6, 4.4 Hz, 1H, H11), 2.17 – 0.91

(m, 10H, H12a, H12b, H13a, H13b, H14a, H14b, H15a, H15b, H16a e H16b). **HRMS (ESI+) (m/z):** [M+H]⁺= 272,1276 Da (calculado: 272,1281 Da) e [M+Na]⁺= 294,1105 Da (calculado: (294,1101 Da).

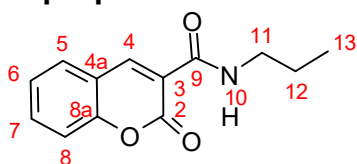
N-[3-(trifluorometil)fenil]-3-carboxamida-cumarina (3g): Sólido branco; 90%; **P.F.:**
219-220°C (210-211°C, Chimenti *et al.*, 2006). **RMN ¹H**



(DMSO, 400 MHz) δ: 10.88 (s, 1H, NH10), 8.92 (d, J = 0.6 Hz, 1H, H4), 8.26 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H16), 8.02 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H, H8), 7.93 (dd, J = 7.8, 2.1 Hz, 1H, H14), 7.80 (ddd, J = 8.7, 7.3, 1.6 Hz, 1H, H13), 7.64 (t, J = 8.0 Hz, 1H,

H7), 7.57 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H6), 7.54 – 7.48 (m, 1H, H12), 7.47 (d, J = 1.1 Hz, 1H, H17). **HRMS (ESI+) (m/z):** [M+H]⁺= 334,0682 Da (calculado: 334,0685 Da) e [M+Na]⁺= 356,0516 Da (calculado: (356,0505 Da).

N-propil-3-carboxiamida-cumarina (3h): Sólido branco; 74%; **P.F.:** 131-134°C (128-



130°C, Sepay *et al.*, 2015). **RMN ¹H (DMSO, 400 MHz) δ:**

8.86 (d, J = 0.7 Hz, 1H, H4), 8.70 (t, J = 5.8 Hz, 1H, NH10),

7.99 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H, H5), 7.75 (ddd, J = 8.8, 7.3,

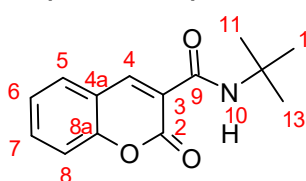
1.6 Hz, 1H, H7), 7.51 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H8), 7.45 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H, H6), 3.29

(td, J = 7.1, 5.9 Hz, 2H, H11a e H11b), 1.55 (h, J = 7.3 Hz, 2H, H12a e H12b), 0.91 (t,

J = 7.4 Hz, 3H, H13a, H13b e H13c). **HRMS (ESI+) (m/z):** [M+H]⁺ = 232,0938 Da

(calculado: 232,0968 Da) e [M+Na]⁺ = 254,0759 Da (calculado: 254,0787 Da).

N-(terc-butil)-3-carboxamida-cumarina (3i): Sólido castanho; 77%; **P.F.:** 122-124°C



(203-204°C, . **RMN ¹H (DMSO, 400 MHz) δ:** 8.84 (d, J = 0.6

Hz, 1H, H4), 8.57 (s, 1H, NH10), 7.96 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H,

H5), 7.74 (ddd, J = 8.7, 7.3, 1.6 Hz, 1H, H7), 7.51 (d, J = 8.4

Hz, 1H, H8), 7.44 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H, H6), 1.38 (s, 9H,

H11a, H11b, H11c, H12a, H12b, H12c, H13a, H13b e H14c). **HRMS (ESI+) (m/z):**

[M+H]⁺ = 246,1095 Da (calculado: 246,1125 Da) e [M+Na]⁺ = 268,0913 Da (calculado:

(268,0944 Da).

4.5 SÍNTESE DO ÁCIDO 7,8-DIHIDROXI-3-CARBOXYCUMARÍNICO

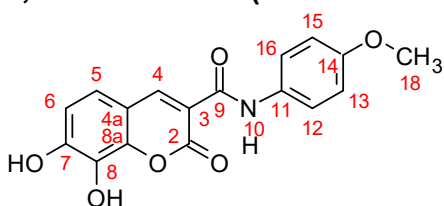
Em um reator de vidro encamisado de 500 mL equipado com agitação mecânica, adicionou-se 100 mL de água destilada, 2,3,4-trihidroxibenzaldeído (5,45 g; 0,035 mol) e Ácido de Meldrum (6,70g; 0,046 mol) com agitação de 200 rpm. A mistura reacional permaneceu sob agitação e aquecimento a 75°C durante 4-6 horas. Uma amostra do meio reacional foi coletada para análise da conversão em ácido 7,8-dihidroxi-3-hidroxycumarínico por cromatografia líquida de alta eficiência. A reação foi considerada concluída quando o teor de 2,3,4-trihidroxibenzaldeído encontrado fosse menor que 0,1% em normalização de área. Na sequência, a mistura reacional foi arrefecida à temperatura ambiente, e então, o precipitado foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada gelada (3 x 20 mL). A massa úmida foi levada à estufa a 70°C para secagem até que a massa fosse constante. O ácido 7,8-dihidroxi-3-hidroxycumarínico (Massa molecular: 222,15 g/mol) foi obtido como um sólido amarelo (7,15 g) com um rendimento de 91%.

4.6 SÍNTESE DE DIHIDROXI-CUMARILAMIDAS 6-A-I

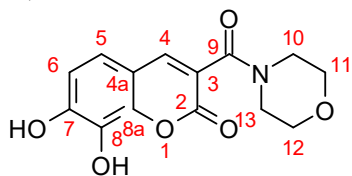
Em um balão de fundo redondo de 50 mL, adicionou-se 0,5 g do ácido 7,8-dihidroxi-3-carboxicumarínico (2,25 mmol), 20 mL de acetonitrila, 0,05 g de N,N-dimetilformamida (DMF) e 0,65 g de cloreto de tionila (5,46 mmol/2,4 eq.). A mistura reacional permaneceu em agitação a 40-50 °C por 2 horas. Uma amostra do meio reacional foi coletada para análise da conversão no respectivo cloreto ácido (**5**) por cromatografia líquida de alta eficiência. A reação foi considerada concluída quando o teor de ácido 7,8-dihidroxi-3-carboxicumarínico (**4**) encontrado fosse menor que 0,1% em normalização de área. Em seguida, ao cloreto de ácido 7,8-dihidroxi-cumarínico formado no meio reacional anterior, foi adicionada uma solução da amina (aromática, alifática, heterocíclica) correspondente (2,475 mmol, 1,1 eq) em 5 mL de acetonitrila. A reação permaneceu em agitação a 20-25°C por 2 horas. Uma amostra do meio reacional foi coletada para análise da conversão na cumarinamida correspondente por cromatografia líquida de alta eficiência e a reação foi considerada concluída quando o teor de cloreto ácido (**5**) encontrado fosse menor que 0,1% em normalização de área. Posteriormente, o solvente acetonitrila foi removido sob vácuo e o produto formado foi solubilizado em metanol e cristalizado por resfriamento até 0°C. Os cristais formados de dihidroxi-cumarilamidas foram filtrados e secos em estufa a 70°C até massa constante. Assim, obtiveram-se as substâncias **6a-i** com rendimentos entre 63–93%.

7,8-di-hidroxi-N-(4-metoxifenil)-3-carboxamida-cumarina (6a): Sólido amarelo;

76%; **P.F.:** >300°C (inédito). **RMN ¹H (DMSO, 400 MHz) δ:** 10.74 (s, 1H, NH10), 10.57 (s, 1H, OH7), 9.67 (s, 1H, OH8), 8.82 (s, 1H, H4), 8.02 – 7.52 (m, 2H, H12 e H16), 7.36 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H5), 6.99 – 6.93 (m, 2H, H13 e H15), 6.92 (d, J = 7.1 Hz, 1H, H6), 3.75 (s, 3H, H18a, H18b e H18c). **HRMS (ESI+) (m/z):** [M+H]⁺ 328,0790 Da (calculado 328,0816 Da) e [M+Na]⁺ = 350,0616 Da (calculado: (318,0635 Da).



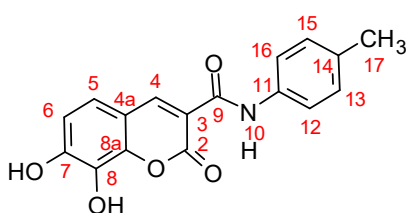
7,8-di-hidroxi-3-morfolinacarbonil-cumarina (6b): Sólido amarelo; 76%; **P.F.:** 259-



261°C (inédito). **RMN ¹H (DMSO, 400 MHz) δ:** 10.35 (s, 1H, OH7), 9.48 (s, 1H, OH8), 8.05 (s, 1H, H4), 7.09 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H5), 6.84 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H6), 3.64 – 3.50 (m,

8H, H10a, H10b, H11a, H11b, H12a, H12b, H13a e H14b). **HRMS (ESI+) (m/z):** [M+H]⁺ 292,0818 Da (calculado 292,0815 Da) e [M+Na]⁺ = 314,0649 Da (calculado: (314,0635 Da).

7,8-di-hidroxi-N-(4-metilfenil)-3-carboxamida-cumarina (6c): Sólido castanho;

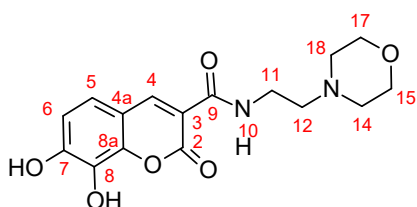


64%; **P.F.:** 255-258°C (inédito). **RMN ¹H (DMSO, 400 MHz) δ:** 10.75 (s, 1H, NH10), 10.64 (s, 1H, OH7), 9.67 (s, 1H, OH8), 8.82 (s, 1H, H4), 7.60 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H12 e H16), 7.36 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H5), 7.18 (d, J = 8.3

Hz, 2H, H13 e H15), 6.93 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H6), 2.28 (s, 3H, H17a, H17b e H17c).

HRMS (ESI+) (m/z): [M+H]⁺ 312,0876 Da (calculado 312,0866 Da) e [M+Na]⁺ = 334,0706 Da (calculado: (334,0685 Da).

7,8-di-hidroxi-N-[2-(morfolin-4-il)etil]-2-oxo-2H-1-benzopiran-3-carboxamida

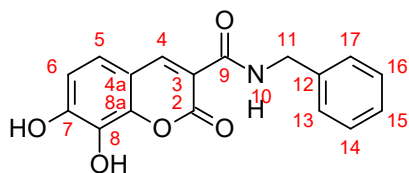


(6d): Sólido castanho, 83%; **P.F.:** 208-210°C (inédito).

RMN ¹H (DMSO, 400 MHz) δ: 10.83 (s, 1H, OH7), 9.62 (s, 1H, OH8), 8.94 (t, J = 6.0 Hz, 1H, NH10), 8.77 (s, 1H, H4), 7.35 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H5), 6.95 (d, J = 8.5

Hz, 1H, H6), 3.96 (d, J = 12.9 Hz, 2H, H11a e H11b), 3.82 – 3.69 (m, 4H, H15a, H15b, H17a e H17b), 3.52 (d, J = 12.6 Hz, 2H, H12a e H12b), 3.31 (s, 2H, H14a e H14b), 3.11 (s, 2H, H18a e H18b). **HRMS (ESI+) (m/z):** [M+H]⁺ 335,1247Da (calculado 335,1238Da).

7,8-di-hidroxi-N-(benzil)-3-carboxamida-cumarina (6e): Sólido castanho, 89%;

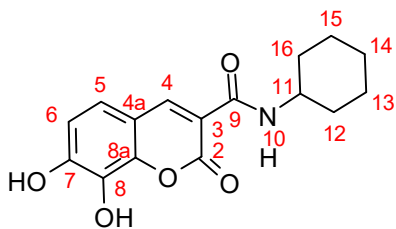


P.F.: 258-260°C (inédito). **RMN ¹H (DMSO, 400 MHz) δ:**

9.09 (t, J = 6.1 Hz, 1H, NH10), 8.76 (s, 1H, H4), 7.37 – 7.29 (m, 6H, H5, H13, H14, H15, H16 e H17), 6.89 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H6), 4.56 – 4.47 (m, 2H, H11a e H11b).

HRMS (ESI+) (m/z): [M+H]⁺ = 312,0885 Da (calculado 312,0866 Da).

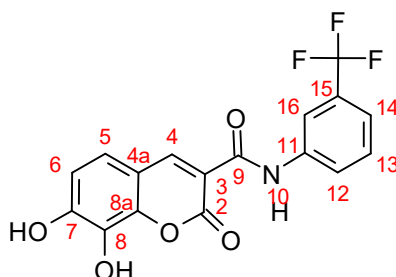
7,8-dihidroxi-N-ciclohexil-3-carboxiamida-cumarina (6f): Sólido bege; 68%; **P.F.:**



256-257°C (inédito). **RMN ¹H (DMSO, 400 MHz) δ:** 10.65 (s, 1H, OH7), 9.61 (s, 1H, OH8), 8.74 (s, 1H, H4), 8.61 (d, J = 7.8 Hz, 1H, NH10), 7.33 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H5), 6.90 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H6), 3.79 (q, J = 9.4, 8.4 Hz, 1H, H11), 1.94 – 0.99 (m, 10H, H11a, H11b, H12a, H12b, H13a, H13b, H14a, H14b, H15a, H15b, H16a e H16b).

HRMS (ESI+) (m/z): [M+H]⁺ 304,1187 Da (calculado 304,1179 Da) e [M+Na⁺]= 326,1016 Da (calculado: (326,0999 Da).

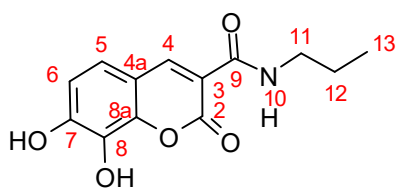
7,8-di-hidroxi-N-[3-(trifluorometil)fenil]-3-carboxamida-cumarina (6g): Sólido



amarelo; 90%; **P.F.:** >300°C (inédito). **RMN ¹H (DMSO, 400 MHz) δ:** 10.90 (s, 1H, NH10), 10.80 (s, 1H, OH7), 9.70 (s, 1H, OH8), 8.83 (s, 1H, H4), 8.26 (t, J = 2.0 Hz, 1H, H12), 7.94 – 7.87 (m, 1H, H16), 7.61 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H13), 7.52 – 7.45 (m, 1H, H14), 7.37 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H5), 6.94 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H6).

HRMS (ESI+) (m/z): [M+H]⁺ 366,0602 Da (calculado: 366,0584 Da).

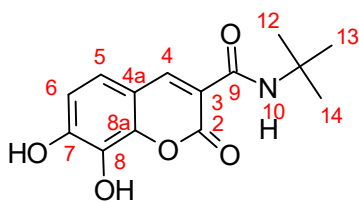
7,8-di-hidroxi-N-propil-3-carboxamida-cumarina (6h): Sólido verde, 91%; **P.F.:**



216-218°C (inédito). **RMN ¹H (DMSO, 400 MHz) δ:** 8.73 (s, 1H, H4), 8.68 (t, J = 5.8 Hz, 1H, NH10), 7.32 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H5), 6.89 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H6), 3.27 (q, J = 7.0 Hz, 2H, H11a e H11b), 1.53 (h, J = 7.3 Hz, 2H, H12a e H12b), 0.90 (t, J = 7.4 Hz, 3H, H13a, H13b e H13c).

HRMS (ESI+) (m/z): [M+H]⁺ 264,0865Da (calculado 264,0866 Da) e [M+Na⁺]= 286,0686 Da (calculado: (286,0686 Da).

7,8-di-hidroxi-N-(terc-butil)-3-carboxamida-cumarina(6i): Sólido amarelo, 93%;



P.F.: 283-285°C (inédito) **RMN ¹H (DMSO, 400 MHz) δ:** 10.65 (s, 1H, OH7), 9.60 (s, 1H, OH8), 8.72 (s, 1H, H4), 8.59 (s, 1H, NH10), 7.30 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H5), 6.90 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H6), 1.38 (s, 9H, H12a, H12b, H12c, H13a, H13b, H13c, H14a, H14b e H14c). **HRMS (ESI+) (m/z):** [M+H]⁺= 278,1020 Da (calculado 278,1023 Da) e [M+Na]⁺= 300,0850 Da (calculado 300,0842 Da).

4.7 ENSAIOS IN VITRO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Foram conduzidas duas rodadas de ensaios de inibição de germinação dos esporos, *in vitro*, utilizando a metodologia de germinação de esporos (Figura 30) de *P. pachyrhizi* em meio de cultura (BLUM, 2009) (BLUM; REIS, 2013), (HIRANO, 2009).

Os inóculos de ferrugem da soja, provenientes de amostras de população de uredósporos, foram obtidos através de coletas de plantas de soja naturalmente infectadas na safra de verão 2024/25, na região de Rolândia-PR. As amostras foram mantidas em geladeiras a 5°C até a condução dos testes de germinação.

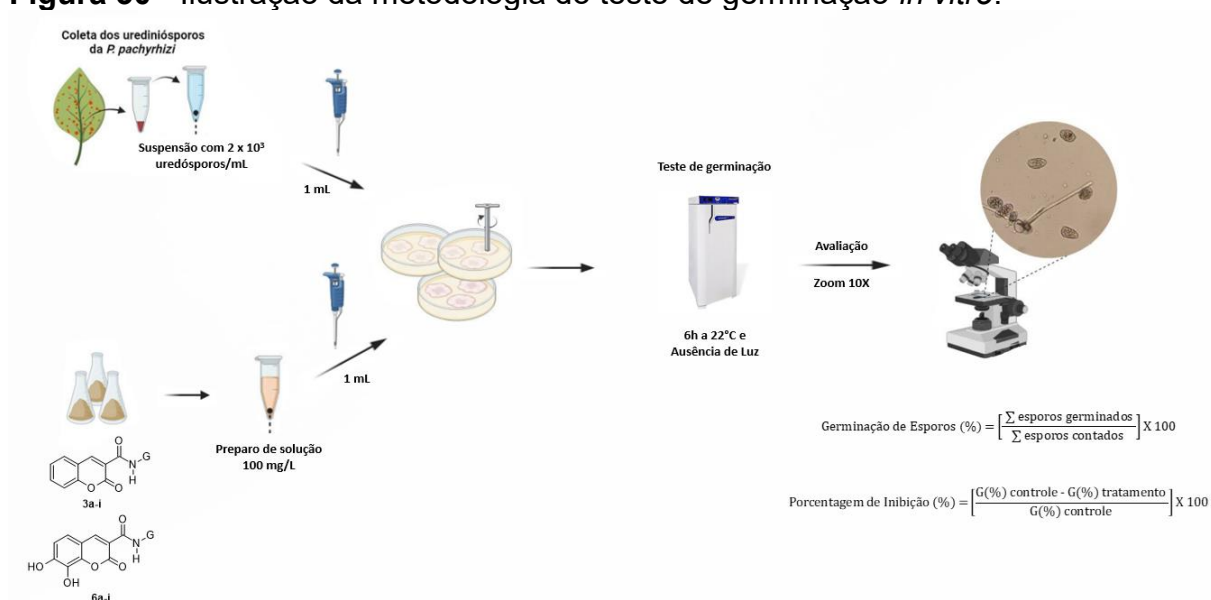
Os uredósporos de *P. pachyrhizi*, utilizados para os testes, foram removidos das folhas de soja por agitação manual, em água destilada com 0,5% de surfactante Tween 20 (marca registrada).

Utilizaram-se placas de Petri do tamanho 60 x 15 mm (esterilizadas e descartáveis), nas quais foi vertida uma solução de BDA 75% (Batata de dextrose Ágar) fundente, deixando-as resfriar à temperatura ambiente. Depositou-se um mililitro de suspensão de uredósporos (2 X 10³ por placa), quantificado com auxílio de uma câmara de “Neubauer”. Em seguida foi adicionada na placa com suspensão dos uredósporos o volume de um mililitro de solução na concentração de 100 mg.L⁻¹ de cada composto do presente trabalho, isoladamente preparado em água destilada. As placas foram incubadas em BOD (câmara de germinação) a 22°C ± 1°C pelo período de 6 horas em ausência de luz, tempo e condições ideais para o desenvolvimento do todo germinativo dos esporos. Foram conduzidas 3 repetições por composto (BLUM, 2009).

A germinação dos esporos foi quantificada em microscópio óptico (10X), sendo considerado germinado o esporo com tubo germinativo maior que o comprimento do

esporo. Foram observados 100 esporos por placa. Os testes de germinação foram considerados válidos quando os testes de controles obtiveram germinação superior a 50%.

Figura 30 - Ilustração da metodologia do teste de germinação *in vitro*.



5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, pode-se concluir que as duas séries de cumarilamidas (**3a-i** e **6a-i**) foram obtidas em bons rendimentos (63 a 93%). Ressalta-se que, dentre as dezoito amidas sintetizadas, nove pertencentes à série (**6a-i**) são inéditas na literatura, sendo todas caracterizadas com sucesso por meio de análises de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H) e espectrometria de massas de alta resolução por tempo de voo (QTOF-MS).

Adicionalmente, observou-se que os compostos **3h** e **3i**, ambos da série A, apresentaram potencial antifúngico similar aos fungicidas de referência Proticonazol e Fluxaproxade em ensaios *in vitro* de inibição da germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*, agente etiológico da ferrugem asiática da soja. A análise da relação estrutura-atividade (SAR) evidenciou que pequenas modificações estruturais exerceram impacto significativo no potencial antifúngico. Na série A (**3a-i**), constituída por derivados sem substituintes hidroxila, destacou-se o efeito favorável de cadeias alifáticas curtas ligadas ao grupamento amídico, sugerindo que substituintes menos

volumosos poderiam favorecer o reconhecimento pelo alvo biológico, o que resulta em maior eficácia antifúngica.

Como perspectivas, propõe-se a complementação do estudo do potencial antifúngico dos compostos sintetizados, considerando a possibilidade de apresentarem mecanismos de ação adicionais não contemplados pelos ensaios *in vitro* de inibição da germinação. Para tal, pretende-se realizar estudos computacionais frente a alvos moleculares reconhecidamente importantes para essa classe de fungicidas, como a enzima succinato desidrogenase. Além disso, torna-se necessário avançar para avaliações *in vivo*, como em folhas destacadas. Nessa perspectiva, mesmo os compostos da série (**6a-i**) não devem ser descartados, uma vez que sua maior solubilidade em meios aquosos pode favorecer processos de absorção, translocação e ação sistêmica como agentes antifúngicos. Adicionalmente, pretende-se ampliar a investigação do potencial biológico dessas moléculas em diferentes frentes, incluindo atividades antibacteriana, antimicobacteriana, antioxidante, antiparasitária e, eventualmente, antitumoral.

REFERÊNCIAS

AGUDO-ÁLVAREZ, SANDRA; DÍAZ-MÍNGUEZ, SANDRA S. ; BENITO-ARENAS, Raúl. *The amide group and its preparation methods by acid-amine coupling reactions: an overview*. **Pure and Applied Chemistry**, v. 96, n. 5, p. 691-707, 2024.

ALLEN, C. L. ; WILLIAMS, J. M. J. Metal-catalysed approaches to amide bond formation. **Chemical Society Reviews**, v. 40, p. 3405–3415, 2011.

BRUNO HENRIQUE SILVA; FREITAS, CARLA DE SANT'ANNA; COERINI, LUCIANE FENDER; RYU, CHOONG-MIN; OLIVEIRA, JULIANA VELASCO DE CASTRO. The power of the smallest: The inhibitory activity of microbial volatile organic compounds against phytopathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.951130.

ANASTAS, P. T., & Warner, J. C. (1998). **Green Chemistry: Theory and Practice**. Oxford University Press.

ARMAREGO, W. L. E.; CHAI, C.L.L. **Purification of Laboratory Chemicals**. Elsevier Science, 2003.

ARNETT, E. M. ; MAROLDO, S.G.; et al. Ion Pairing and Reactivity of Enolate Anions. 5. Thermodynamics of Ionization of β -Di- and Tricarbonyl Compounds in Dimethyl Sulfoxide Solution and Ion Pairing of Their Alkali Salts. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 22, p. 6759–6767, 1984.

BALASUNDRAM, N. , Sundram, K. , & Samman, S. (2006). "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, 99(4), 191-203.

BHAT, R. , Shankar, S. , & Sharma, A. (2021). "Recent advances in transition-metal-catalyzed synthesis of polyphenols. **Chemical Reviews**, 121(14), 10247-10298.

BLUM, MARTA MARIA CASA. **Sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas**. 2009. 84 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

BLUM, MARTA MARIA CASA; REIS, ERLEI MELO. *Phakopsora pachyrhizi* in vitro sensitivity to fungicides. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n. 3, p. 215–216, set. 2013.

BROMFIELD, K. R. Soybean rust. St. Paul: **American Phytopathological Society**, 1984. 65p. (Monography, 11).

Chimenti, Franco; **European Journal of Medicinal Chemistry**, (2006), 41(2), 208-212, CAplus.

Chimenti, Franco; **Journal of Medicinal Chemistry**, (2009), 52(7), 1935-1942, CAplus.

CLAYDEN, JONATHAN; GREEVES, NICK; WARREN, STUART; WOTHERS, PETER. **Organic chemistry**. 1. ed. Oxford: Oxford University Press, 2001. ISBN 978-0-19-850346-0.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Safra de grãos está estimada em 332,9 milhões de toneladas, influenciada por boa produção de soja, milho e arroz. Portal Gov.br, 16 mai. 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/conab/pt-br/assuntos/noticias>. Acesso em: 08 jun. 2025.

CUNHA, S. ; IUNES, C. E.M.; et al. Síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos e sua aplicação na síntese total da aiapina, cumarina e umbeliferona. **Química Nova**, v. 38, n. 8, p. 1125–1131, 2015.

CUNHA, S. ; SANTANA, L. L.B. De Condensação de Knoevenagel de aldeídos aromáticos com o ácido de Meldrum em água: Uma aula experimental de química orgânica verde. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 642–647, 2012.

DEL PONTE EM, GODOY CV, LI X, YANG XB. Predicting severity of Asian soybean rust epidemics with empirical rainfall models. **Phytopathology** 96:797-803. 2006.

DESHMUKH, M. N. ; BURUD, R.; BALDINO, C.; CHAN, P. C. M.; LIU, J. A practical and environmentally friendly preparation of 3-carboxycoumarins. **Synthetic Communications**, Philadelphia, v. 33, n. 20, p. 3299–3303, 2003.

DITTMER, D. C. ; LI, Q.; et al. Synthesis of Coumarins, 4-Hydroxycoumarins, and 4-Hydroxyquinolinones by Tellurium-Triggered Cyclizations 1. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 12, p. 4682–4686, 2005.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Soja: dados econômicos. Londrina: Embrapa Soja, 11 Abr. 2025. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 08 jun. 2025.

EMBRAPA, **MANUAL DE IDENTIFICAÇÃO DE DOENÇAS DE SOJA**, 5ª EDIÇÃO, ABRIL 2014. ISSN 1516-781X.

FRAC – FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE. SDHI Fungicides – Working Group. Disponível em: <https://www.frac.info/frac-teams/working-groups/sdhi-fungicides/#open-tour>. Acesso em: 6 jun. 2025.

GHOLAP, S. S. ; DESHMUKH, U. P.; TAMBE, M. S. Synthesis and invitro antimicrobial screening of 3cinnamoyl coumarin and 3[3(1Hindol2yl)3arylpropanoyl]2Hchromen2ones. **Iranian Journal of Catalysis**, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 171–176, 2013.

GHOSH, A. K. ; SHAHABI, D. Synthesis of amide derivatives for electron deficient amines and functionalized carboxylic acids using EDC and DMAP and a catalytic amount of HOBT as the coupling reagents. **Bioorganic Chemistry**, v. 112, p. 104867, 2021.

GODOY CV. ; SEIXAS CDS; SOARES RM. *Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.51, n.5, p.407-421, 2016. DOI: 10.1590/S0100-204X2016000500002.

GODOY, C. V. , Utiamada, C.M., Meyer, M.C., Campos, H.D., Lopes, I. de O.N., Forcelini, C. A., Pimenta, C.B., Jaccoud Filho, D.S., Moreira, E.N., Borges, E.P., Andrade, E.R. de, Siqueri, F.V., Juliatti, F.C., Favero, F., Araújo Júnior, I.P., Nunes Junior, J., da Silva, L.H.C.P., Sato, L.N., Belufi, L.M. de R., Goussain, M., Volf, M.R., Debortoli, M. P., Martins, M.C., Balardin, R.S., Furlan, S.H., Madalosso, T., Carlin, V.J., Venancio, W.S., 2017. Eficiência de fungicidas multissítios e produto biológico no controle da ferrugem asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2016/17: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Circ. Técnica** **131**, 1–8.

GROTEWOLD, E. (2006). "The genetics and biochemistry of floral pigments. **Annual Review of Plant Biology**, 57, 761-780.

H. G. *Ghalehshahi*, S. Balalaie and A. Aliahmadi, **New J. Chem.**, 2018, 42, 8831–8842.

HARTMAN, G. L. ; SIKORA, E.J.; RUPE, J.C. Rust. In: HARTMAN, G.L.; RUPE, J.C.; SIKORA, E.J.; DOMIER, L.L.; DAVIS, J.A.; STEFFEY, K.L. (Ed.). **Compendium of soybean diseases and pests**. 5. ed. Saint Paul: APS Press, p. 56-59. 2015.

HASLAM, E. **Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 422 p. ISBN 0521465133.

He, Xu; **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, (2014), 22(14), 3732-3738, CAplus.

HELAL, MOHAMED H. ; **Journal of Chemical Research**, (2010), 34(8), 465-469, CAplus.

HIRANO, MARIO. **Produção e germinação de esporos de Phakopsora pachyrhizi em soja sob diferentes condições ambientais**. 2009. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Soja, milho, arroz e feijão apresentam as maiores estimativas previstas para 2025 . **Agência de Notícias IBGE**, Rio de Janeiro, 13 dez. 2024. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br>. Acesso em: 08 jun. 2025.

IVASIV, V. ; ALBERTINI, C. ; GONÇALVES, A. E.; ROSSI, M.; BOLOGNESI, M. L. Molecular hybridization as a tool for designing multitarget drug candidates for complex diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 19, n. 19, p. 1694–1711, 2019. DOI: 10.2174/1568026619666190619115735.

LI, YING; LI, MIN; ZHU, SHUHUA; FU, MENGYUE; HUANG, XIAONAN. Green preparation of morpholine-amide compound as tyrosinase inhibitor for agricultural fungicides. **China: CN119775207 A**, 08 abr. 2025.

MANACH, C. , Scalbert, A. , Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 79(5), 727-747.

MELCHING JS, DOWLER WM, KOOGLER DL, ROYER MH. Effect of duration, frequency, and temperature of leaf wetness period on soybean rust. **Plant Disease** 73:117-122. 1989.

MI, X. ; WANG, C. ; *et al.* Preparation of 3-Acyl-4-arylcoumarins via Metal-Free Tandem Oxidative Acylation/Cyclization between Alkynoates with Aldehydes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 148–155, 2015.

MLADENOVIĆ, MILAN; VUKOVIĆ, NENAD; SUKDOLAK, SLOBODAN; SOLUJIĆ, SLAVICA. Design of novel 4-hydroxy-chromene-2-one derivatives as antimicrobial agents. **Molecules, Basel**, v. 15, n. 6, p. 4299–4310, 2010.

PADMANABHAN, S.; OGAWA, T.; *et al.* Formation of Furan Derivatives from Phenacyl Bromides and Sodium Telluride; Attempted Extension to Coumarin Synthesis. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 62, n. 6, p. 2114–2116, 1989.

PANDEY, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2(5), 270-278.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

PIHLAJA, K. ; SEILO, M. ; *et al.* The Acidity and General Base-Catalyzed Hydrolysis of Meldrum's Acid and Its Methyl Derivatives. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 23, p. 3003–3010, 1969. 92.

PRETORIUS, Z. A. ; KLOPPERS, F.J.; FREDERICK, R.D. First report of soybean rust in South Africa. **Plant Disease**, v.85, p.1288, 2001. DOI: 10.1094/PDIS.2001.85.12.1288C.

PROCOPIO, D. ; SICILIANO, C. ; DI GIOIA, M. L. Reactive deep eutectic solvents for EDC-mediated amide synthesis. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 1012–1023, 2024.

QUIDEAU, S. , Deffieux, D. , Douat-Casassus, C., & Pouysegu, L. (2011). "Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis." **Angewandte Chemie International Edition**, 50(3), 586-621.

ROSSI, R. L. *First report of Phakopsora pachyrhizi*, the causal organism of soybean rust in the province of Misiones, Argentina. **Plant Disease**, v.87, p.102, 2003. DOI: 10.1094/PDIS.2003.87.1.102A.

RYTTER, J. L. , W. M. DOWLER, and K. R. BROMFIELD. Additional alternative hosts of *Phakopsora pachyrhizi*, causal agent of soybean rust. **Plant Disease** 68:818-819. 1984.

SAEED, A. ; ZAIB, S. ; *et al.* *Synthesis*, cholinesterase inhibition and molecular modelling studies of coumarin linked thiourea derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 63, p. 58–63, 2015.

SALEM, M. A. ; HELAL, M.H.; *et al.* An overview on synthetic strategies to coumarins. **Synthetic Communications**, v. 48, n. 13, p. 1534–1550, 2018.

SCALBERT, A. , Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). "Polyphenols: antioxidants and beyond. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 81(1), 215S-217S.

SCHNEIDER, R. W. ; HOLIER, C.A.; WHITAM, H.K; PALM,M.E.; McKEMY, J.M.; HERNÁNDEZ, J.R.; LEVY, L.; DEVRIES-PATERSON, R. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. **Plant Disease**, v.89, p.774, 2005. DOI: 10.1094/PD-89-0774A.

SEPAY, Nayim; GUHA, Chayan; KOOL, Arpan; MALLIK, Asok K. An efficient three-component synthesis of coumarin-3-carbamides by use of Ni-NiO nanoparticles as magnetically separable catalyst. **RSC Advances**, v. 5, n. 93, p. 76123-76133, 2015.

SILVA, MARCUS SIDRÔNIO LIMA DA. **Principais doenças da cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, Rio Verde, 2019.

SLAMINKO, T. L. , M. R. MILES, R. D. FREDERICK, M. R. BONDE, and G. L. HARTMAN. New legume hosts of *Phakopsora pachyrhizi* based on greenhouse evaluations. **Plant Disease** 92(5):767-771. 2008.

SMITH, MICHAEL B. **March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure**. 8th ed. Hoboken: Wiley, 2019. 2144 p. ISBN 978-1-119-37179-3.

YORINORI, J. T. ; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F.; HARTMAN, G.E.; GODOY, C.V.; NUNES JUNIOR, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v.89, p.675-677, 2005. DOI: 10.1094/PD-89-0675.

Yu, Xiang; **Fitoterapia**, (2018), 127, 387-395, CAplus.

YU, Xiang; TENG, Peng; ZHANG, Ya-Ling; XU, Zhao-Jun; ZHANG, Ming-Zhi; ZHANG, Wei-Hua. Design, synthesis and antifungal activity evaluation of coumarin-3-carboxamide derivatives. **Fitoterapia**, v. 127, p. 387–395, jun. 2018. DOI: 10.1016/j.fitote.2018.03.013.

Zhou, Xiang; **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, (2008), 16(17), 8011-8021, CAplus.

APÊNDICES

APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO ÁCIDO 3-CARBOXICUMARÍNICO

Figura 1A – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **1** em DMSO- d_6 .

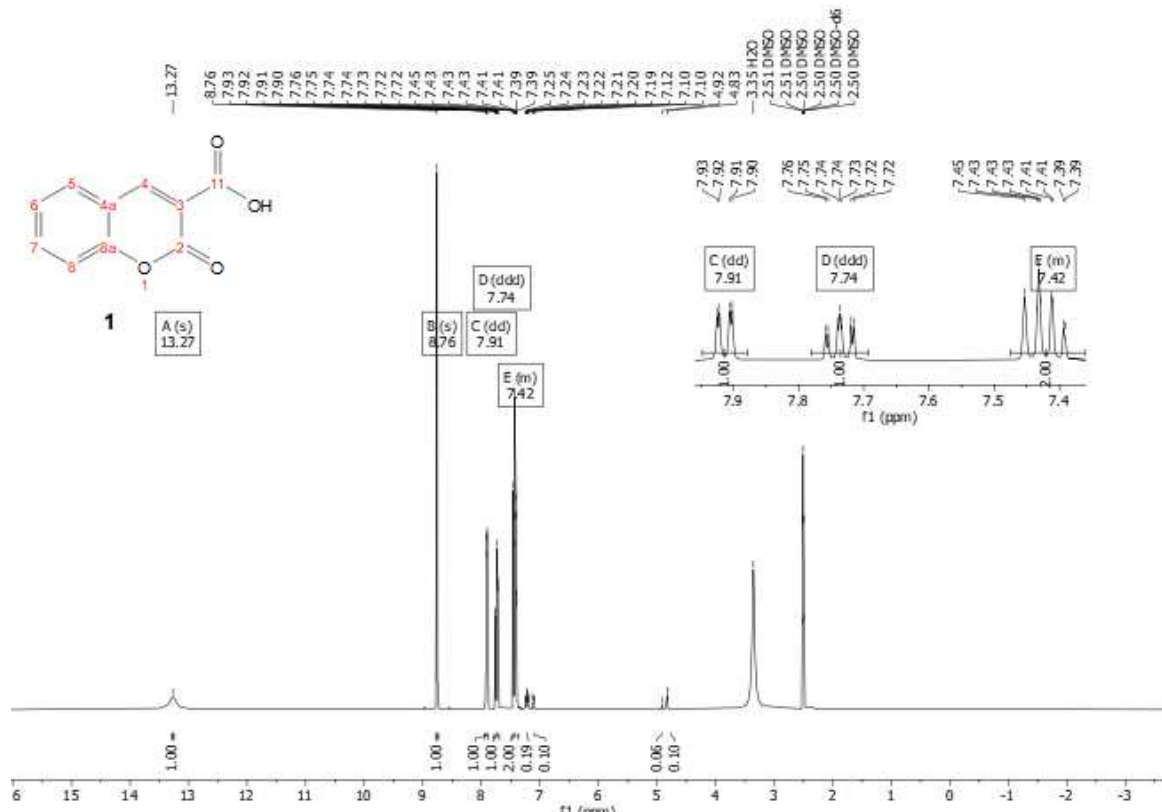
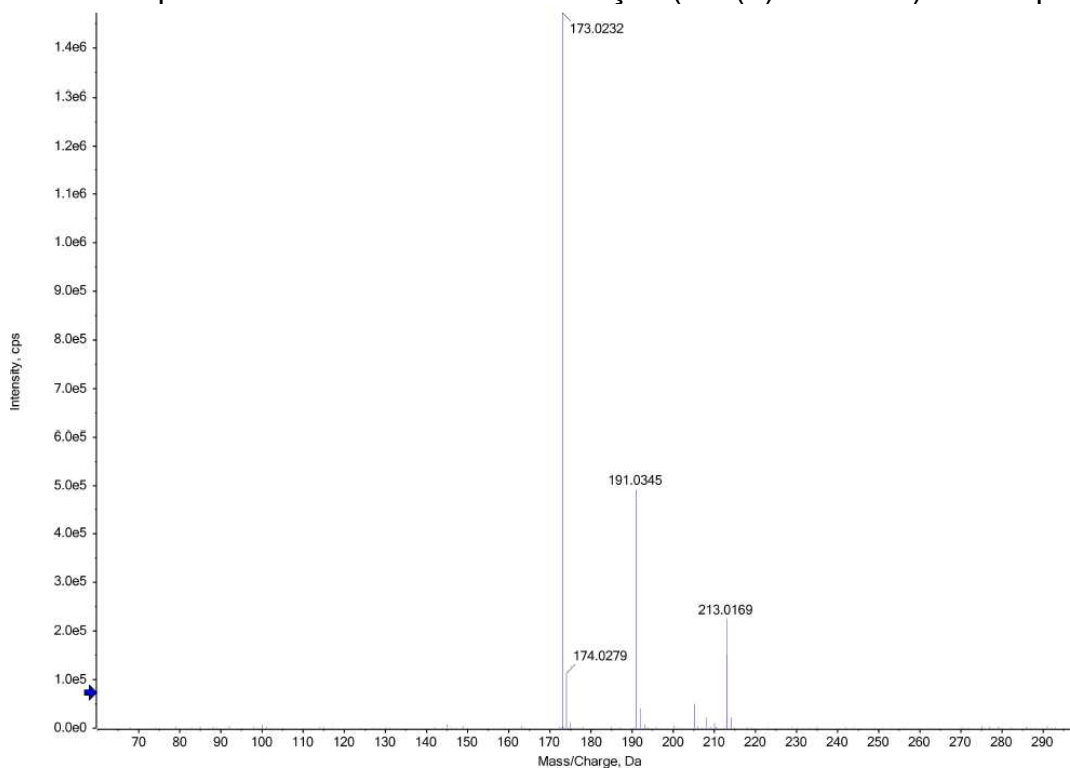


Figura 2A - Espectro de massas de alta resolução (ESI(+))QTOFMS do composto **1**.



APÊNDICE B – CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO ÁCIDO 7,8-DI-HIDROXI-3-CARBOXICUMARÍNICO

Figura 1B – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **4** em $\text{DMSO-}d_6$.

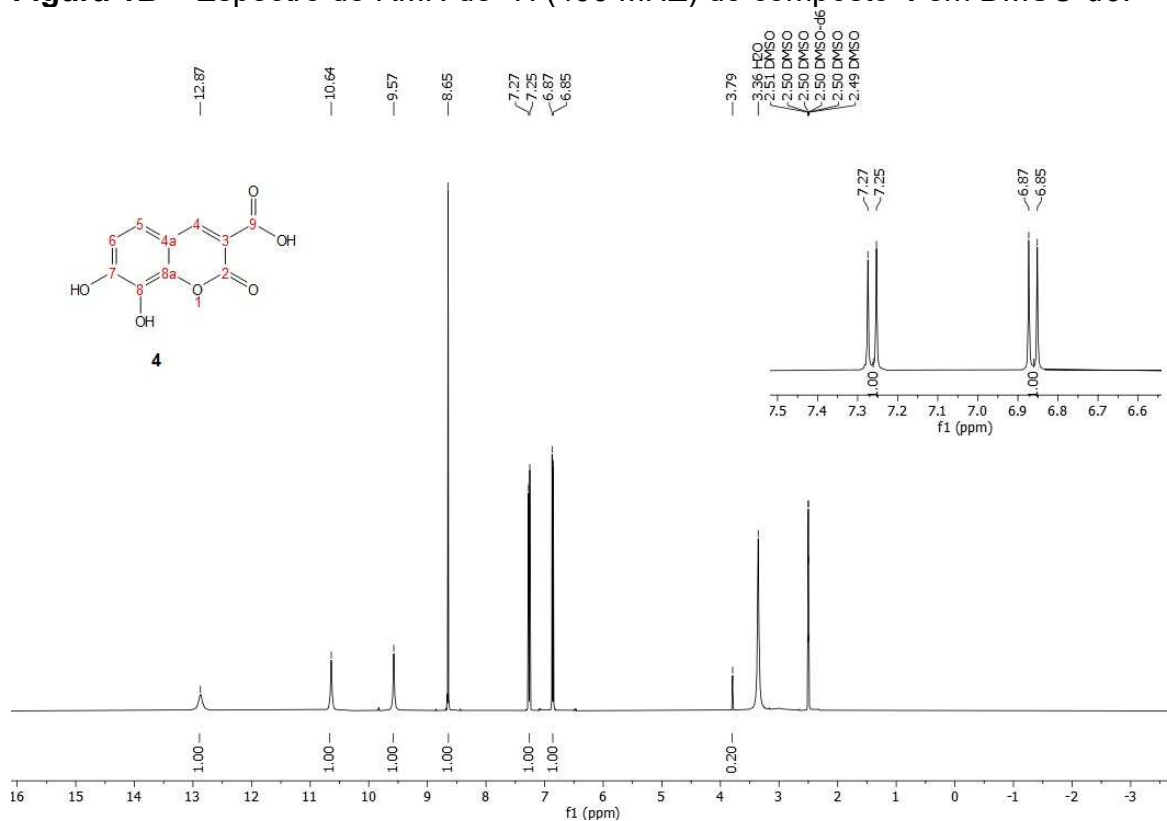
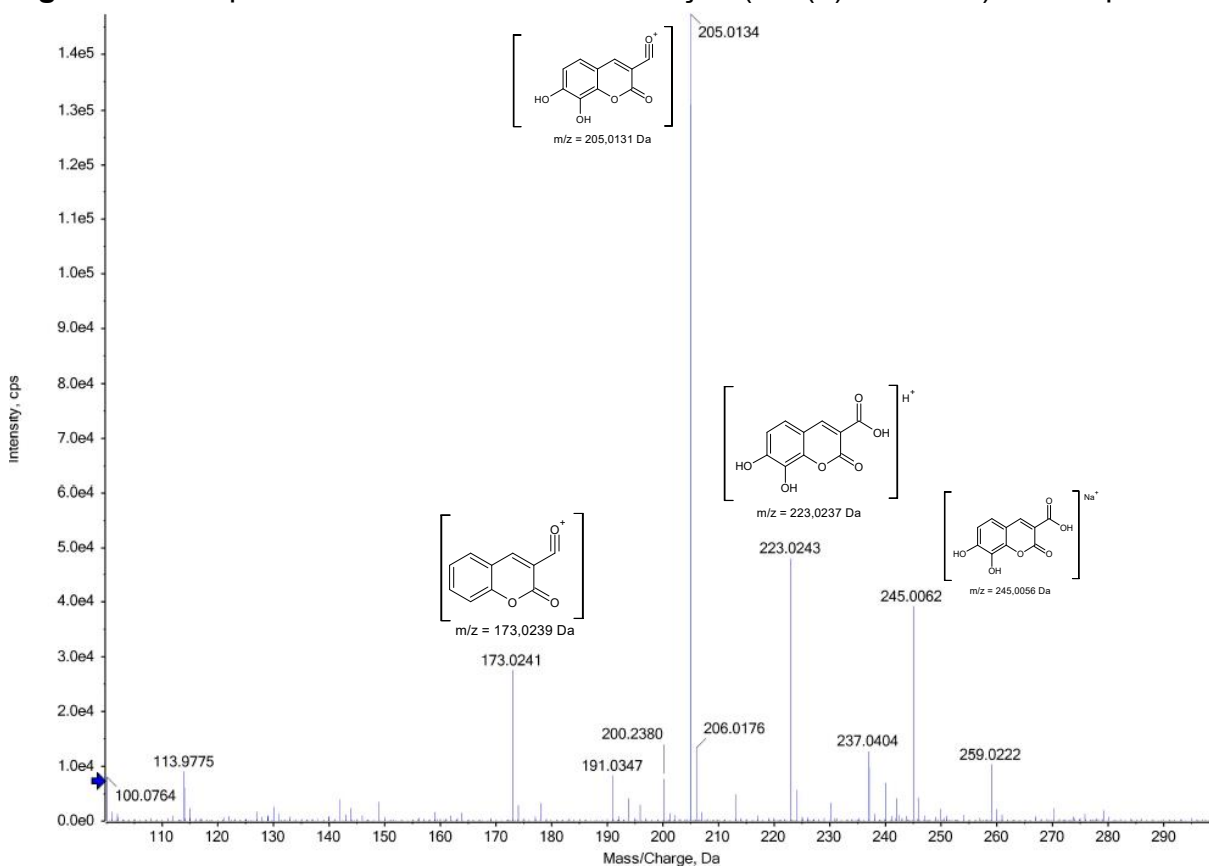


Figura 2B – Espectro de massas de alta resolução (ESI(+))QTOFMS do composto **4**.



APÊNDICE C – CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DAS CUMARILAMIDAS (3A-I)

Figura 1C - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **3a** em $\text{DMSO-}d_6$.

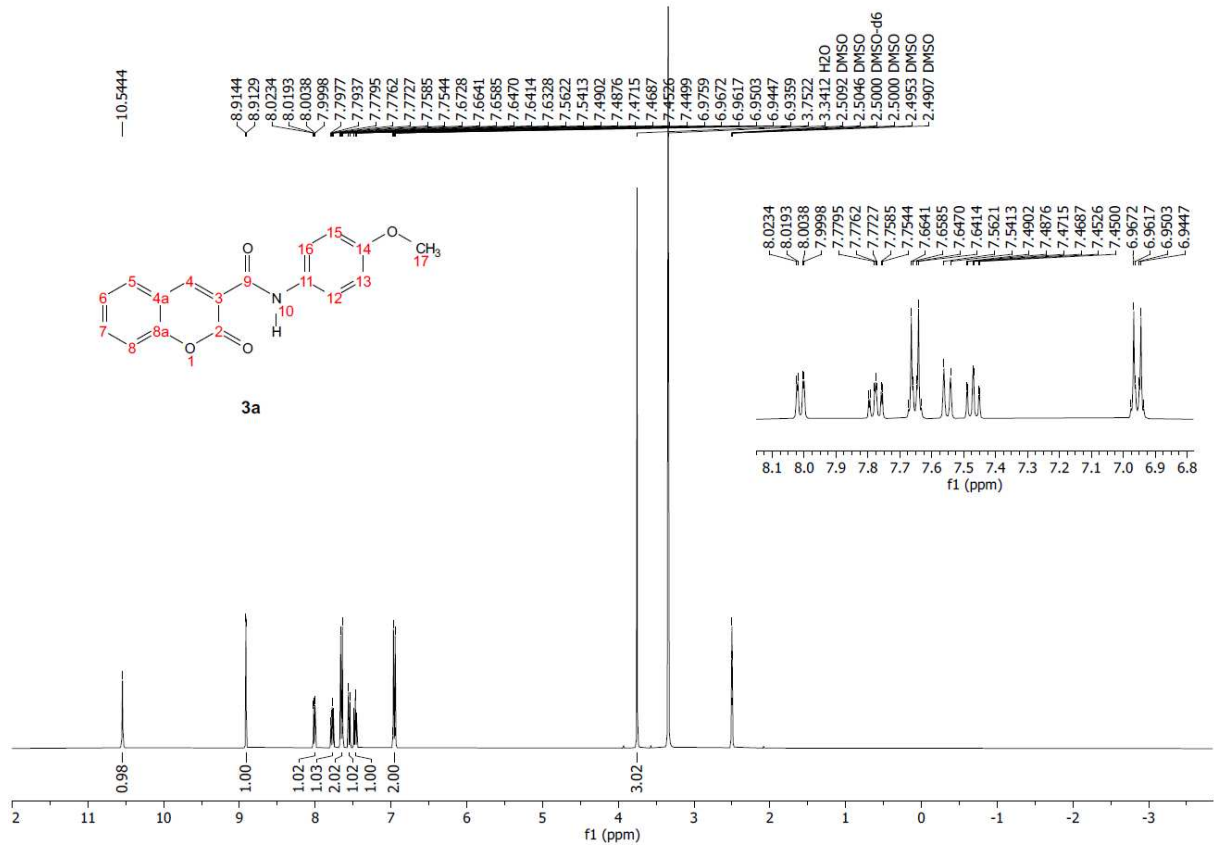


Figura 2C - Espectro de massas de alta resolução (ESI(+))QTOFMS do composto **3a**.

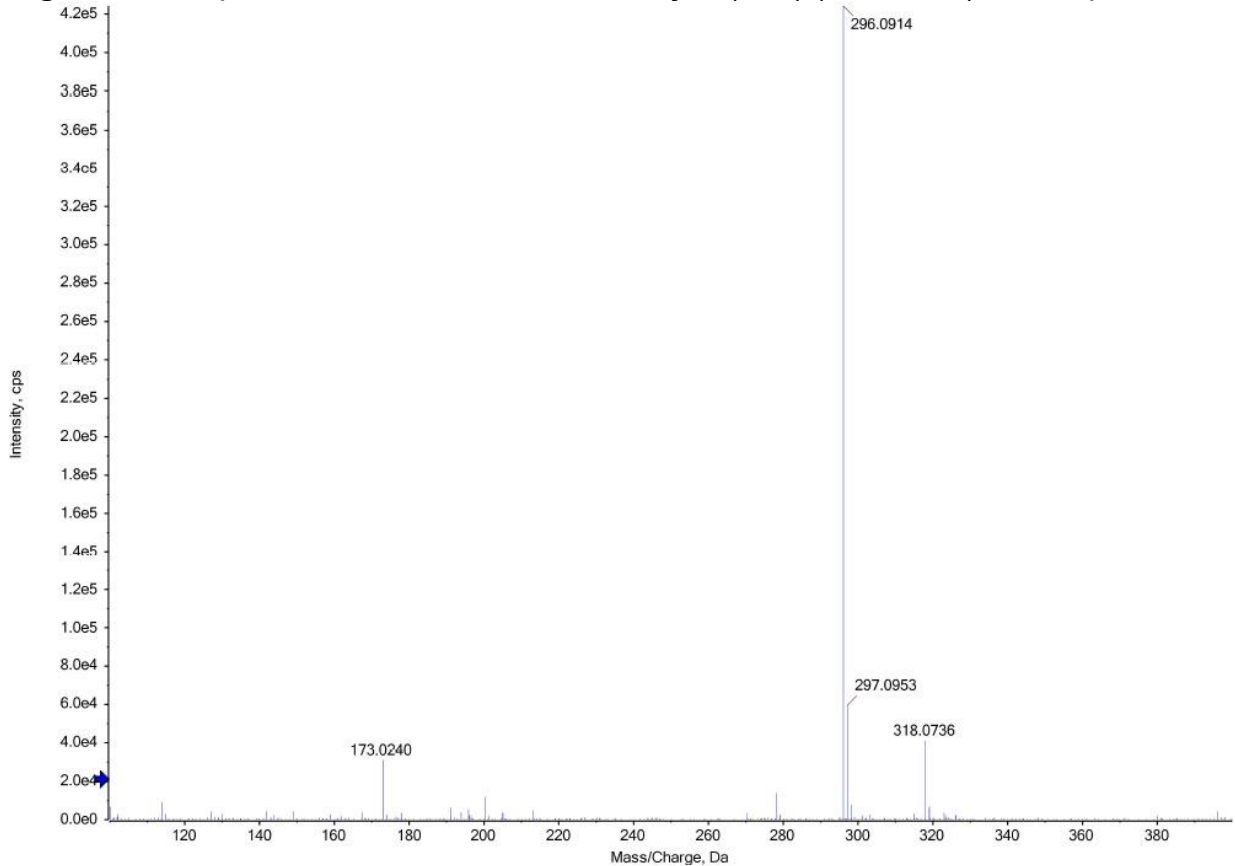


Figura 3C - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **3b** em $\text{DMSO-}d_6$.

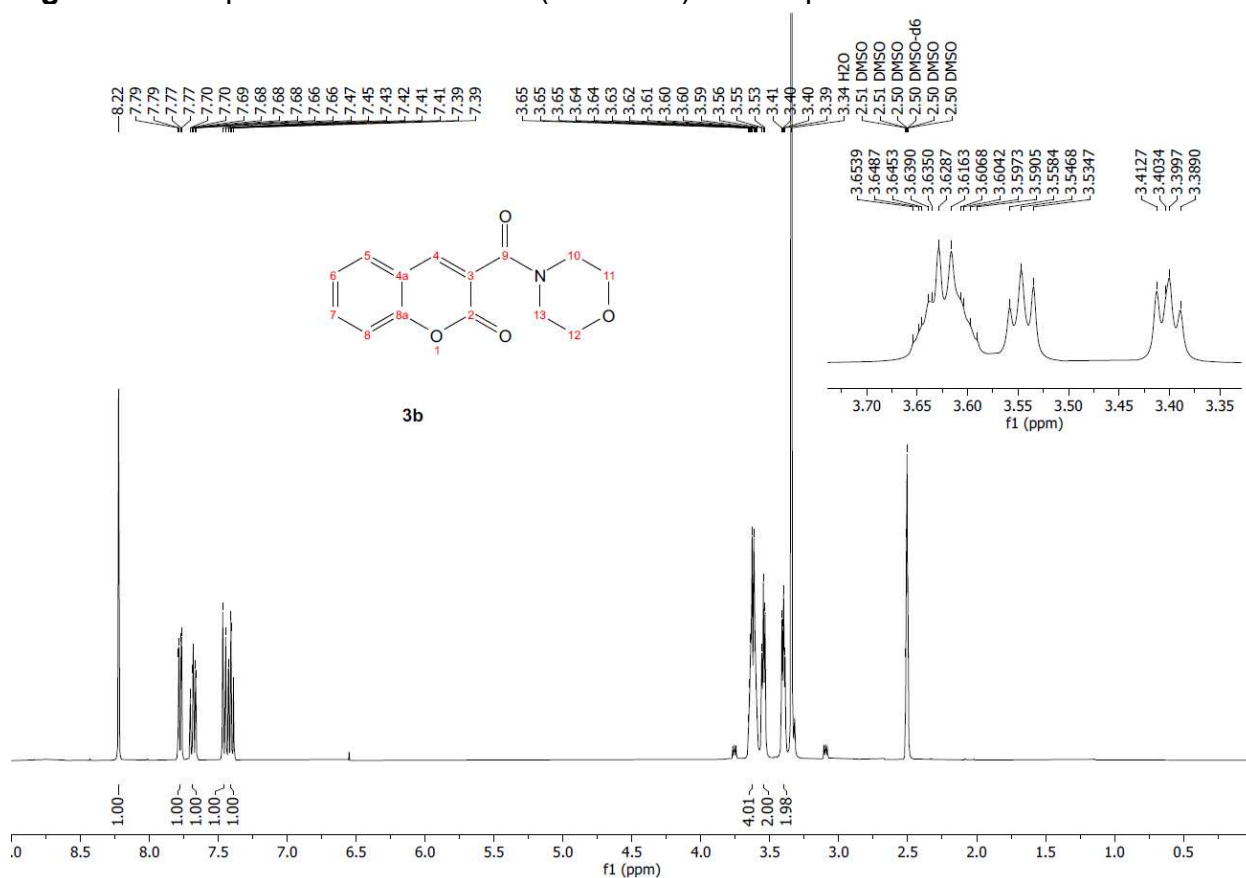


Figura 4C - Espectro de massas de alta resolução (ESI+)QTOFMS do composto **3b**.

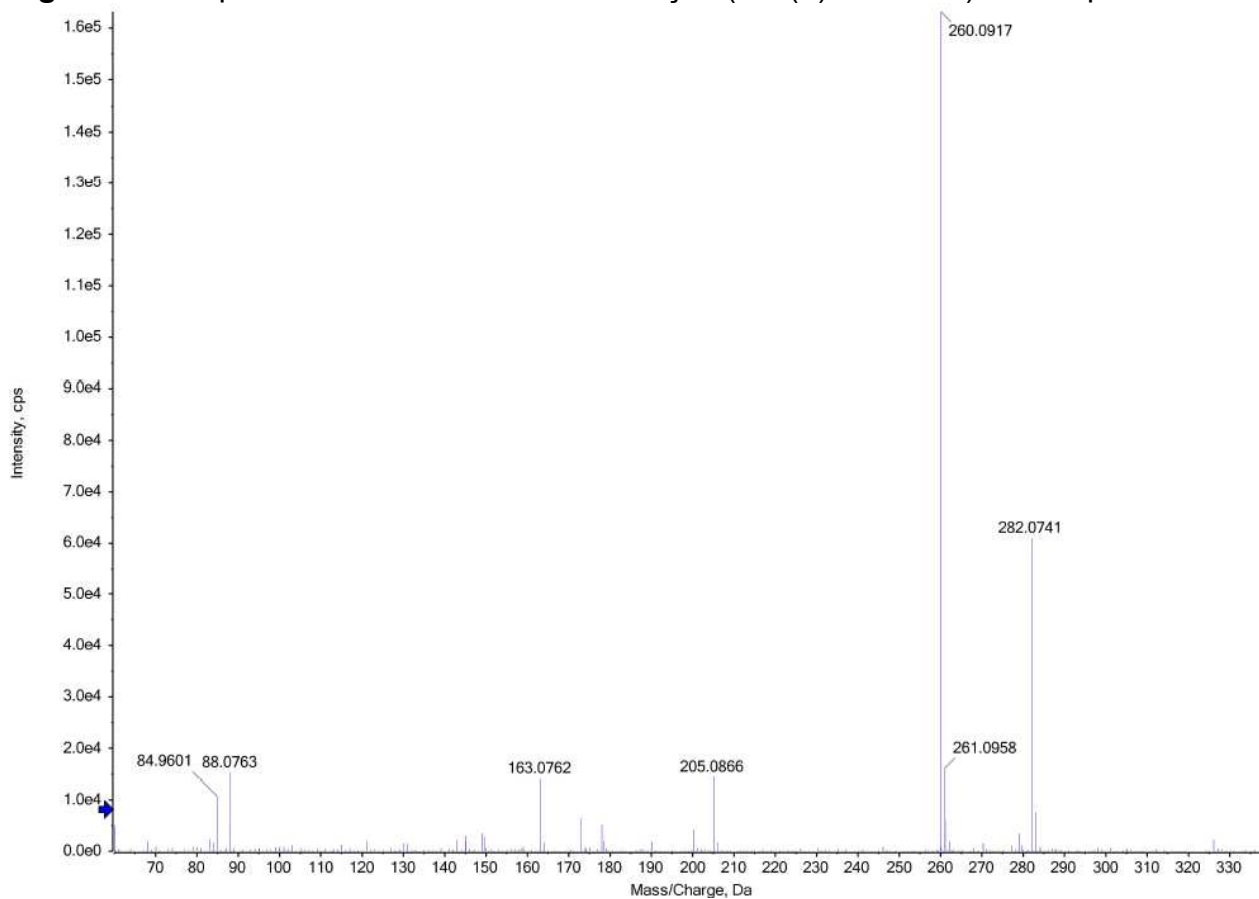


Figura 5C – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **3c** em $\text{DMSO-}d_6$.

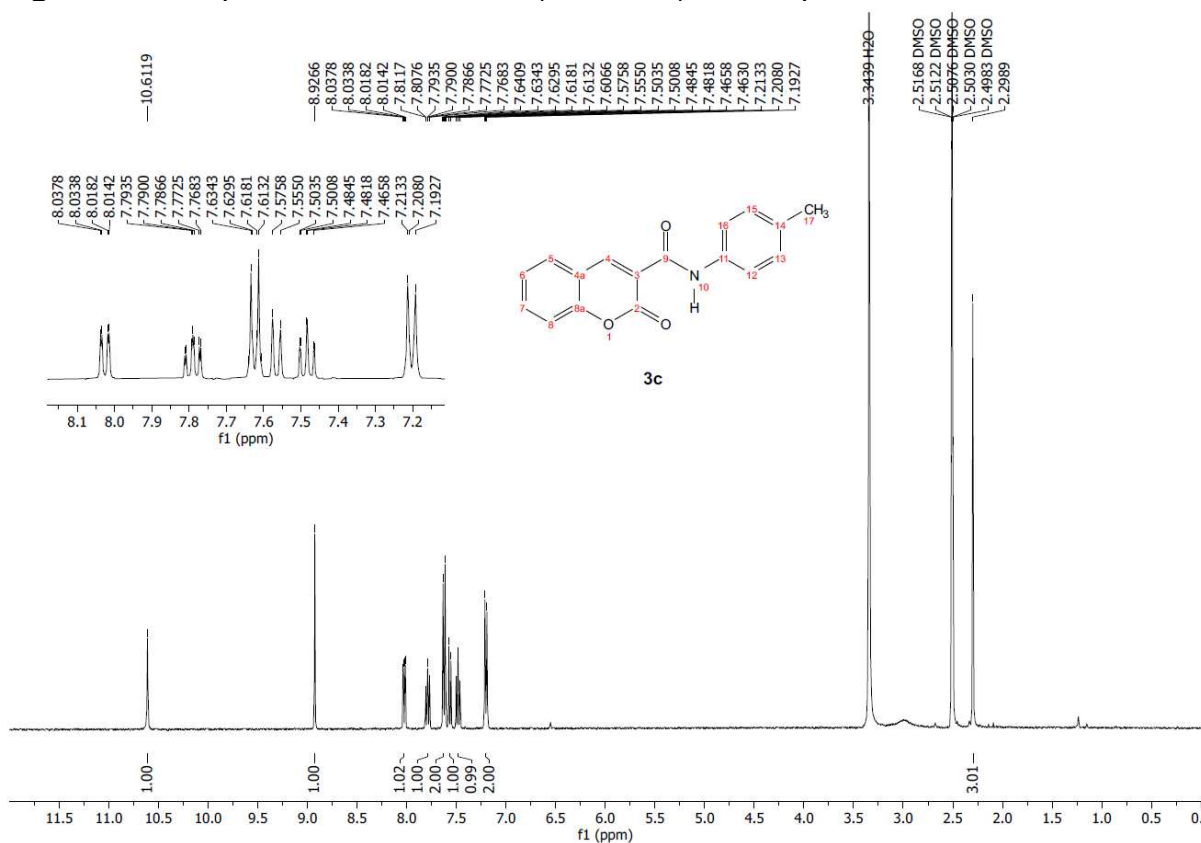


Figura 6C - Espectro de massas de alta resolução (ESI+)QTOFMS do composto **3c**.

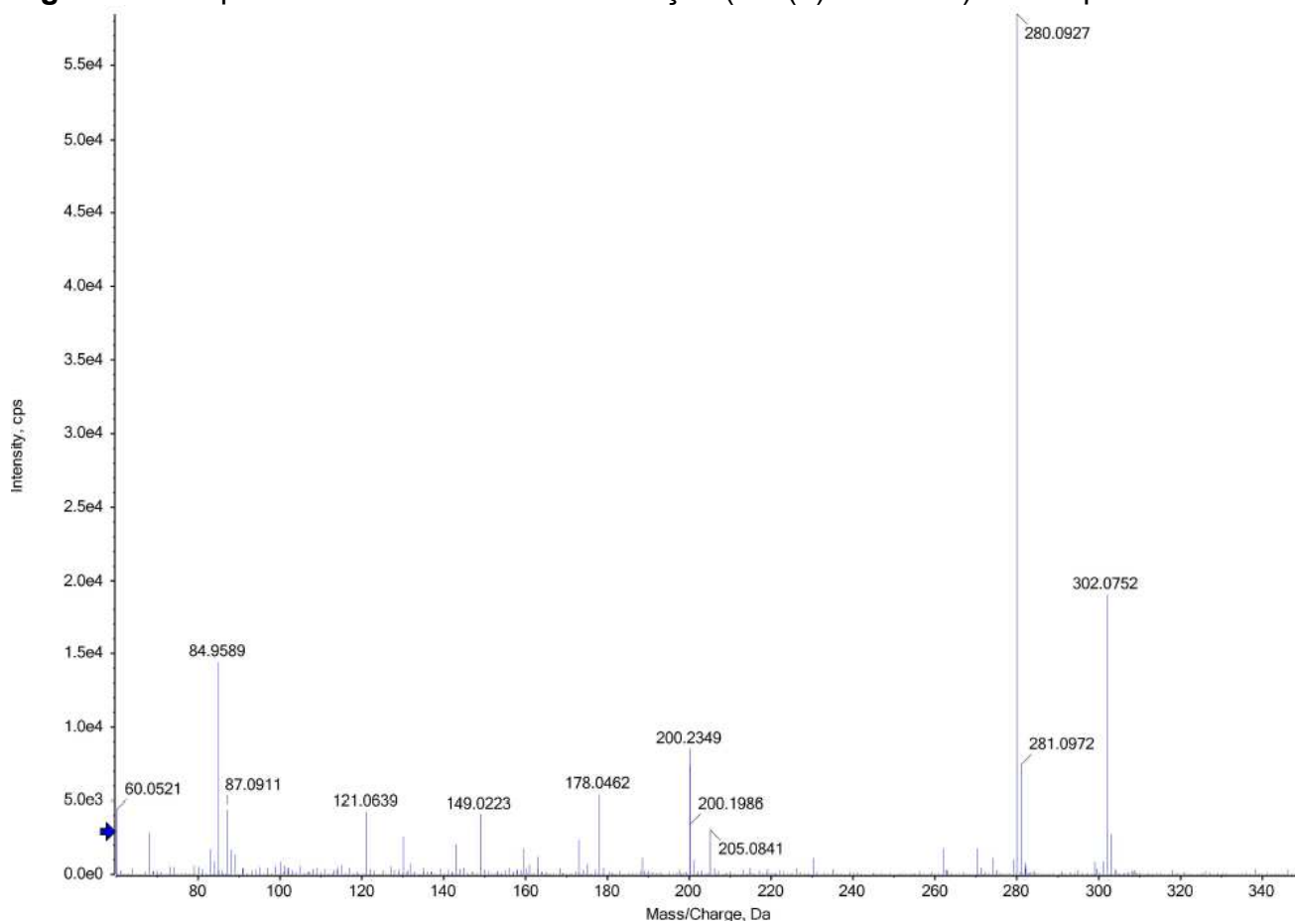


Figura 7C – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **3d** em $\text{DMSO-}d_6$.

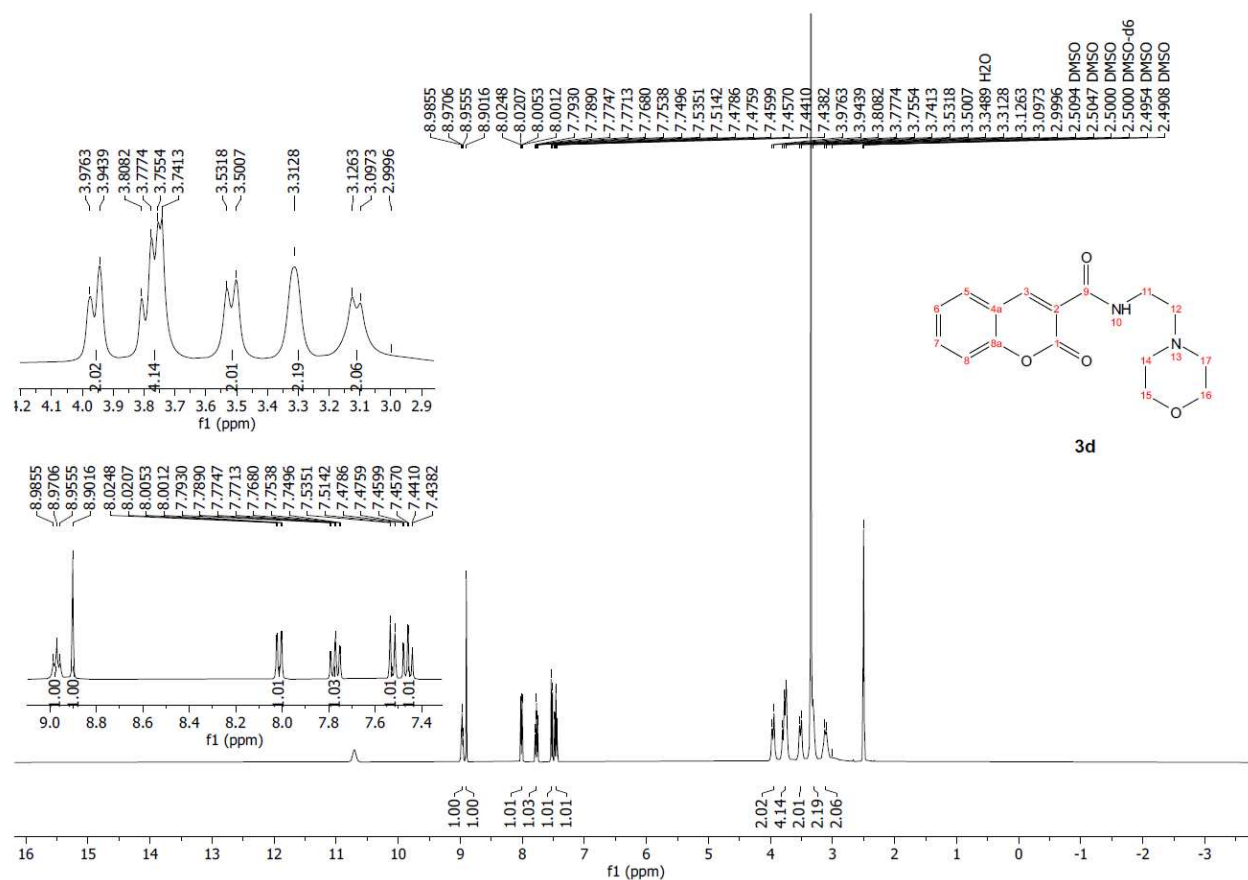


Figura 8C - Espectro de massas de alta resolução (ESI(+))QTOFMS do composto **3d**.

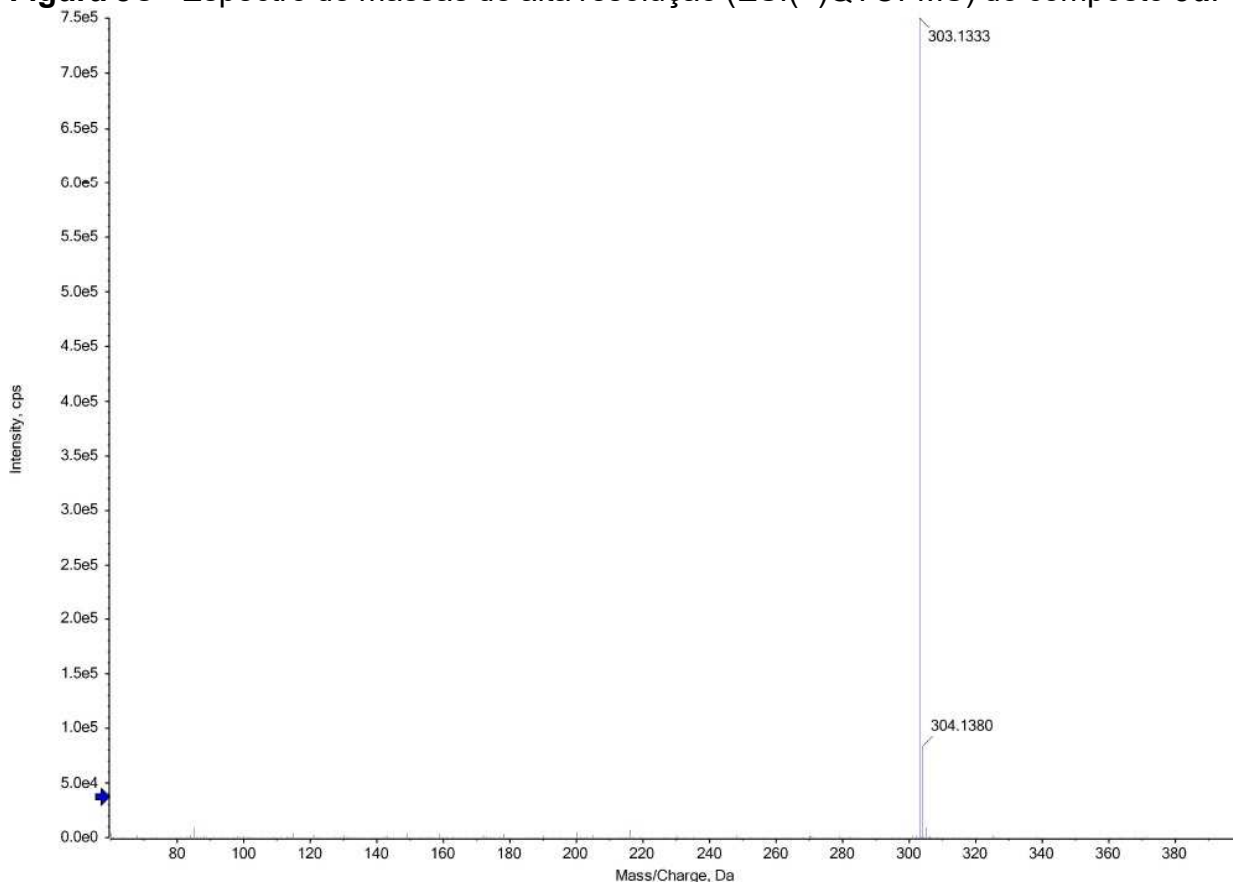


Figura 9C - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **3e** em $\text{DMSO-}d_6$.

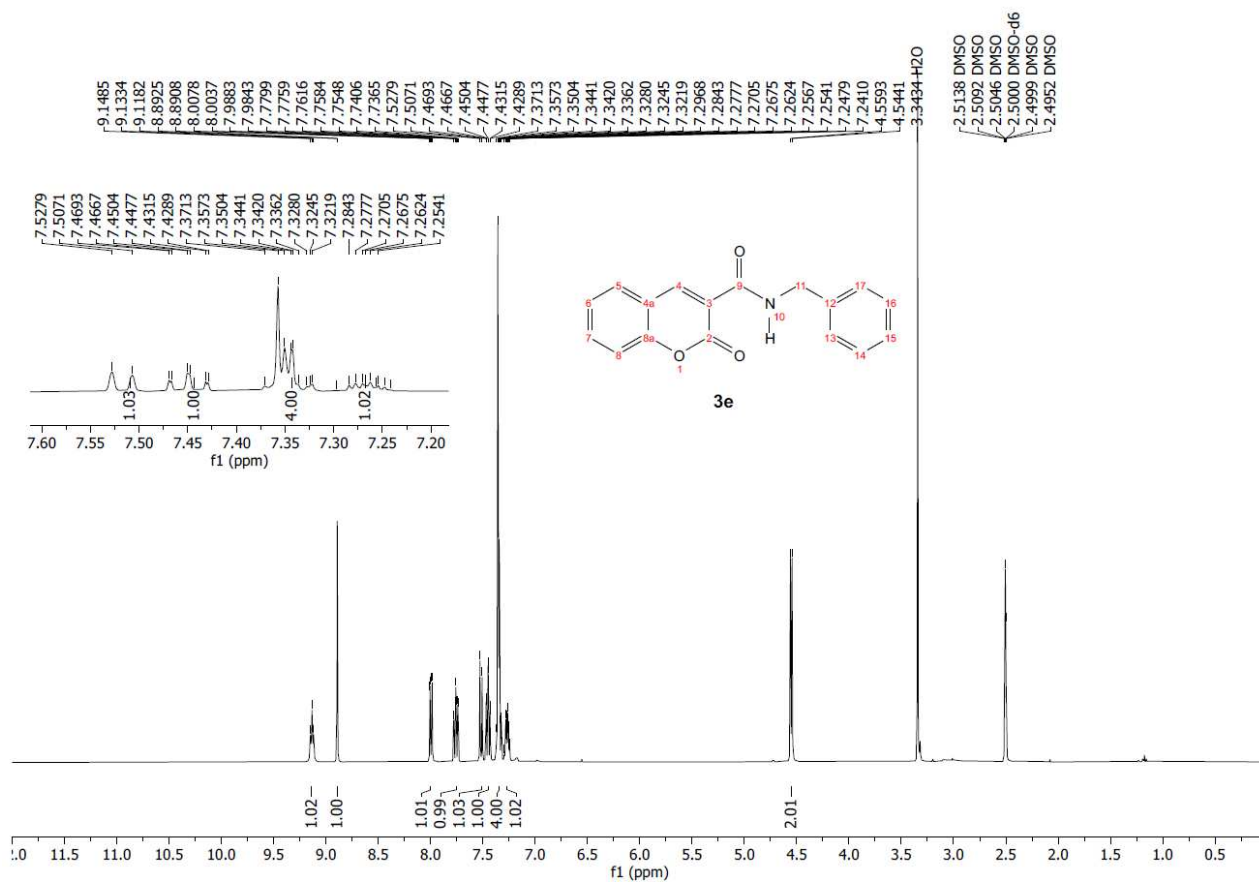


Figura 10C - Espectro de massas de alta resolução (ESI(+))QTOFMS composto **3e**.

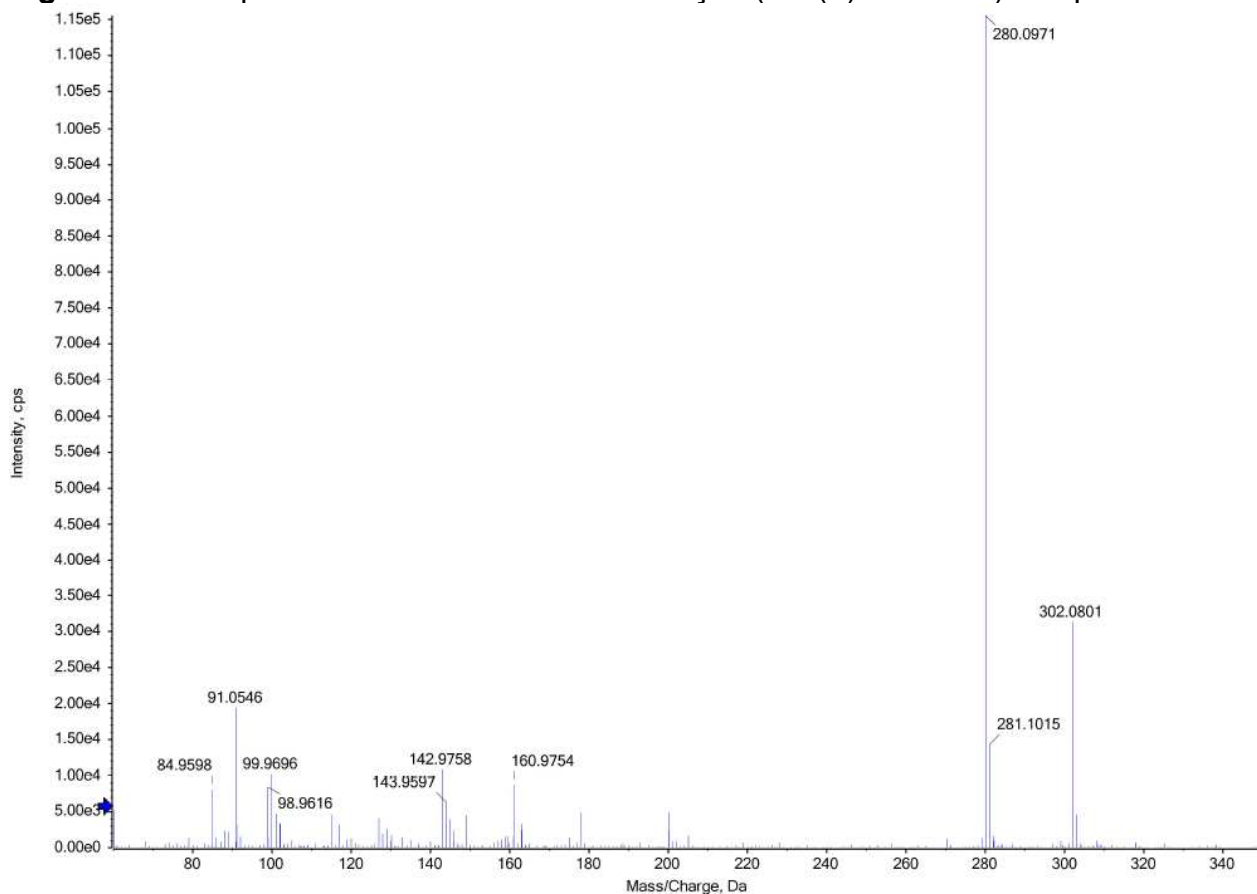


Figura 11C - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **3f** em $\text{DMSO-}d_6$.

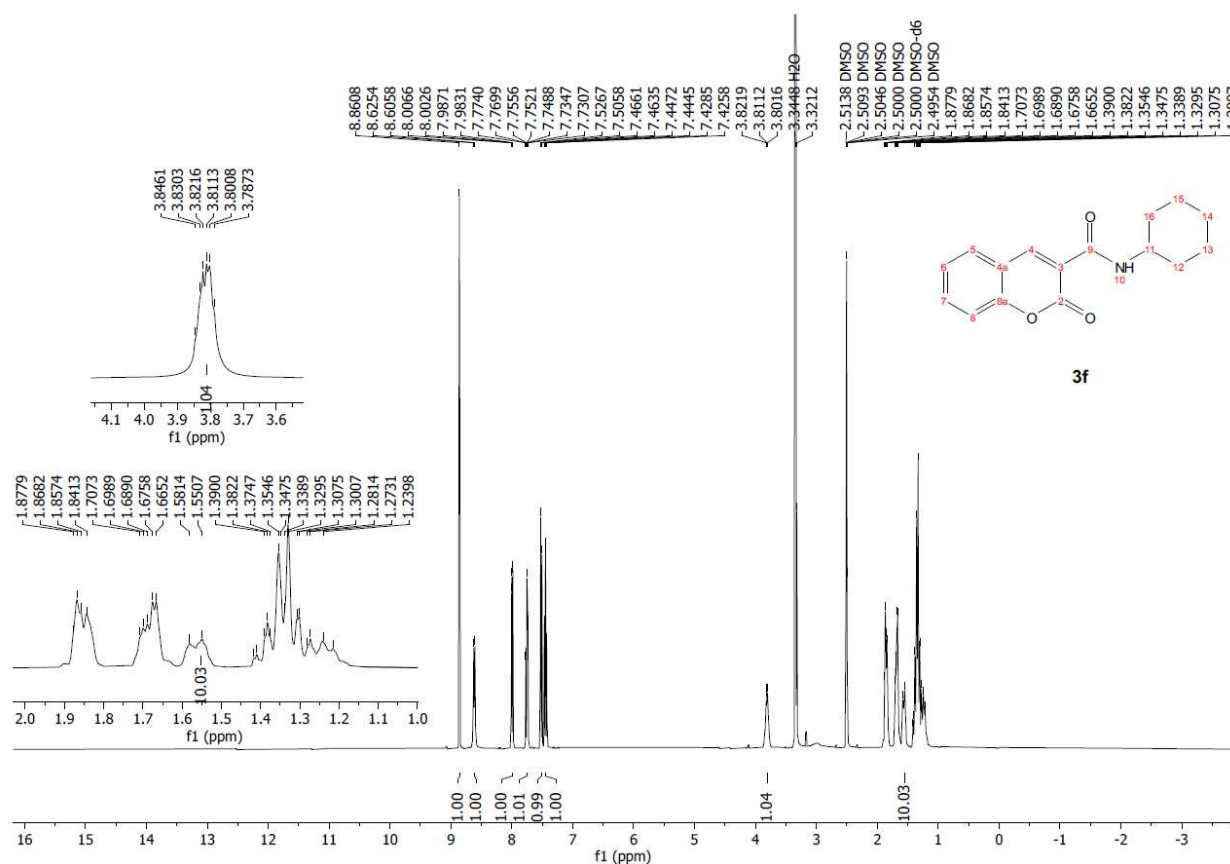


Figura 12C - Espectro de massas de alta resolução (ESI(+))QTOFMS composto **3f**.

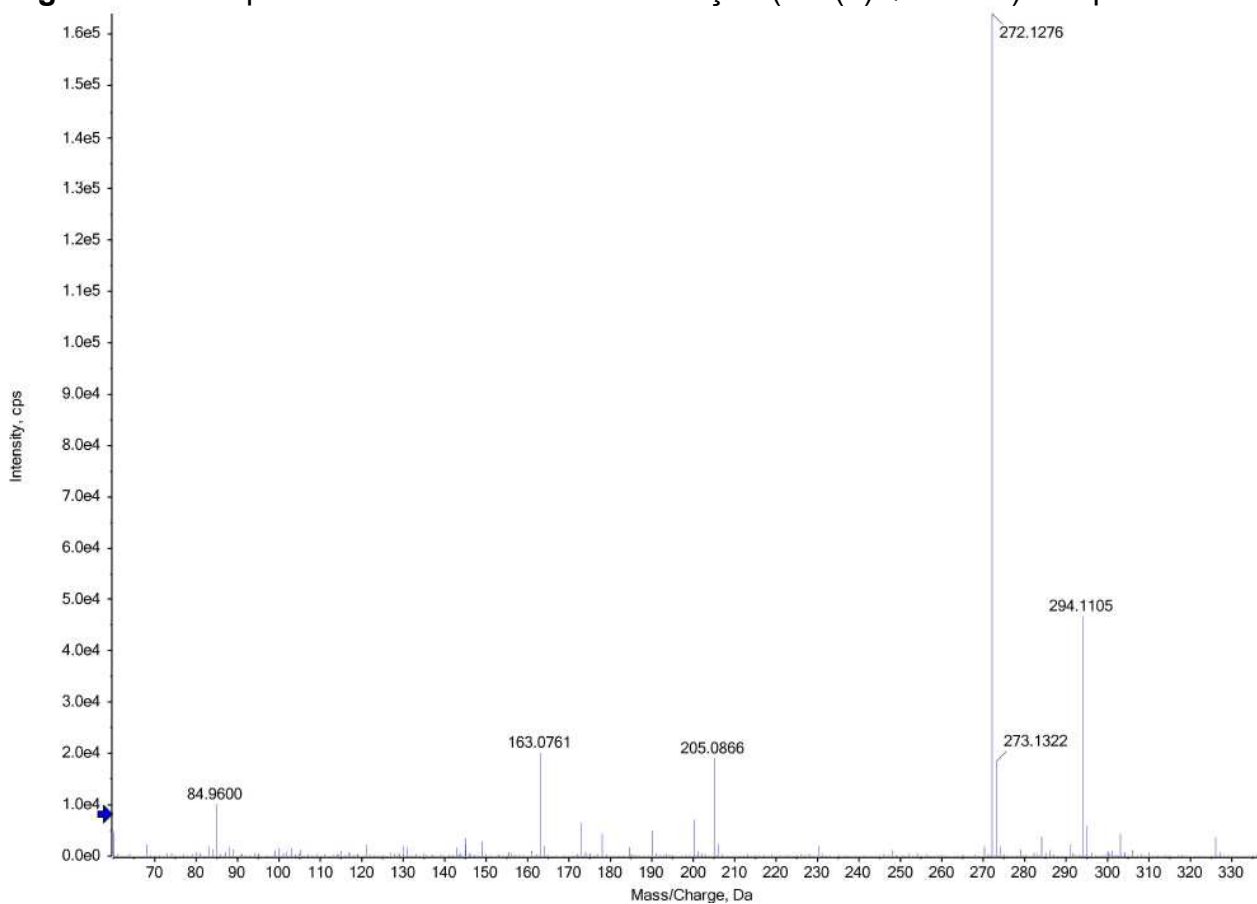


Figura 13C - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **3g** em $\text{DMSO-}d_6$.

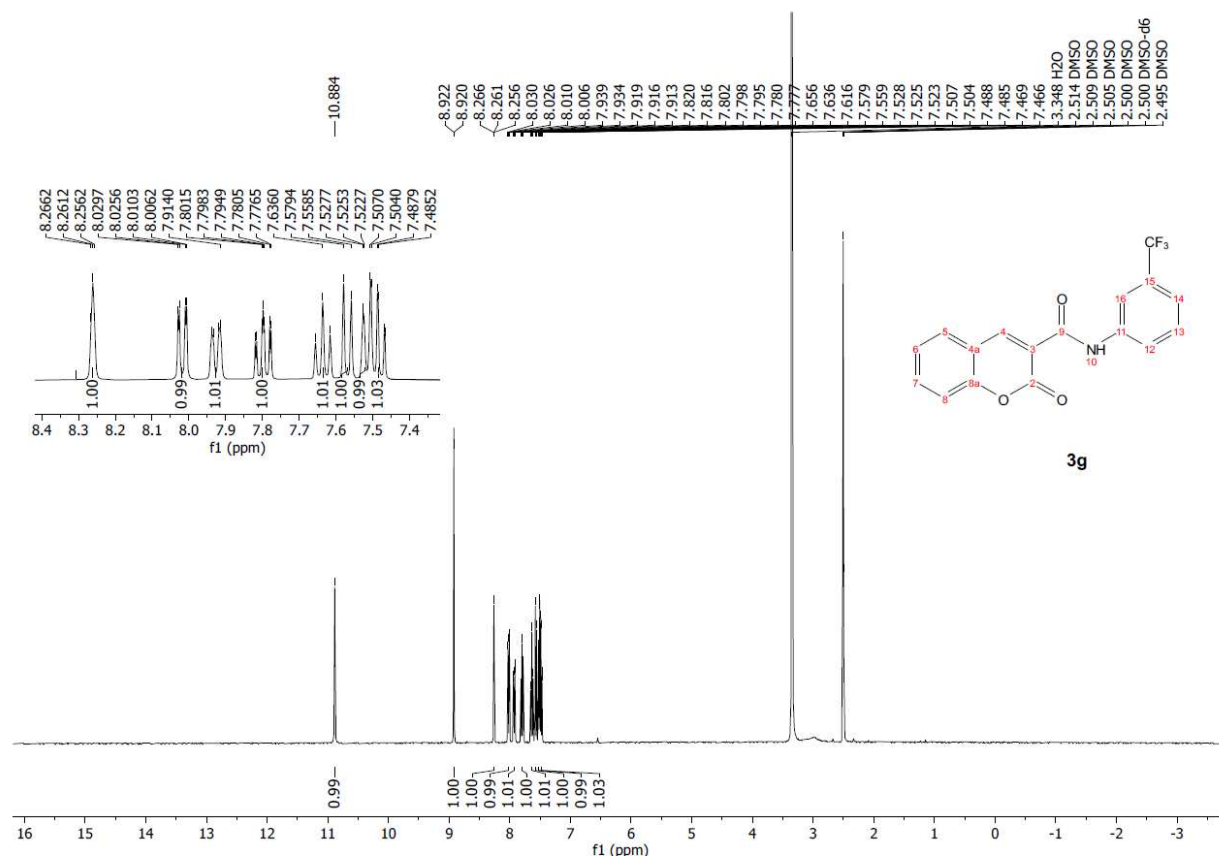


Figura 14C - Espectro de massas de alta resolução (ESI(+))QTOFMS composto **3g**.

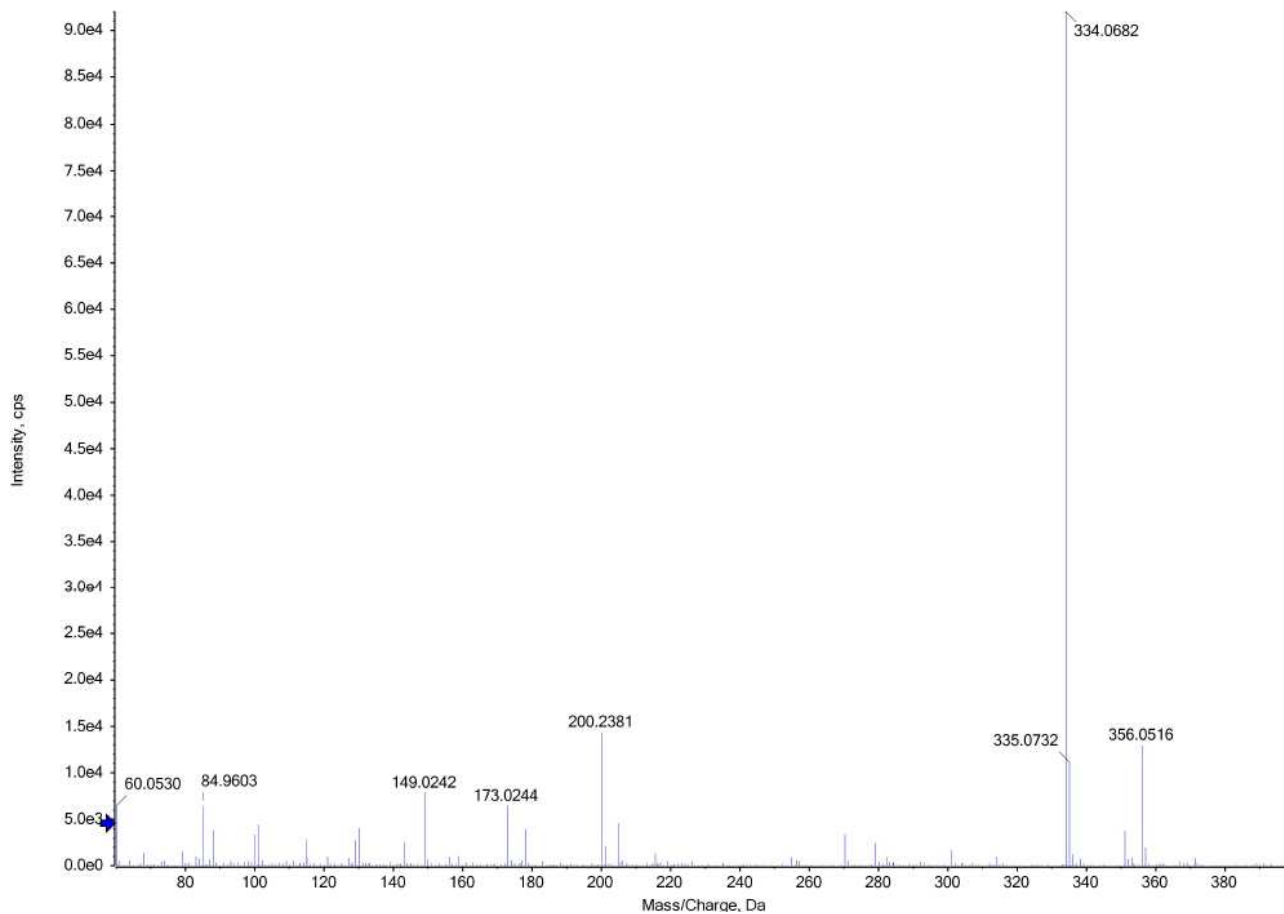


Figura 15C - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **3h** em $\text{DMSO-}d_6$.

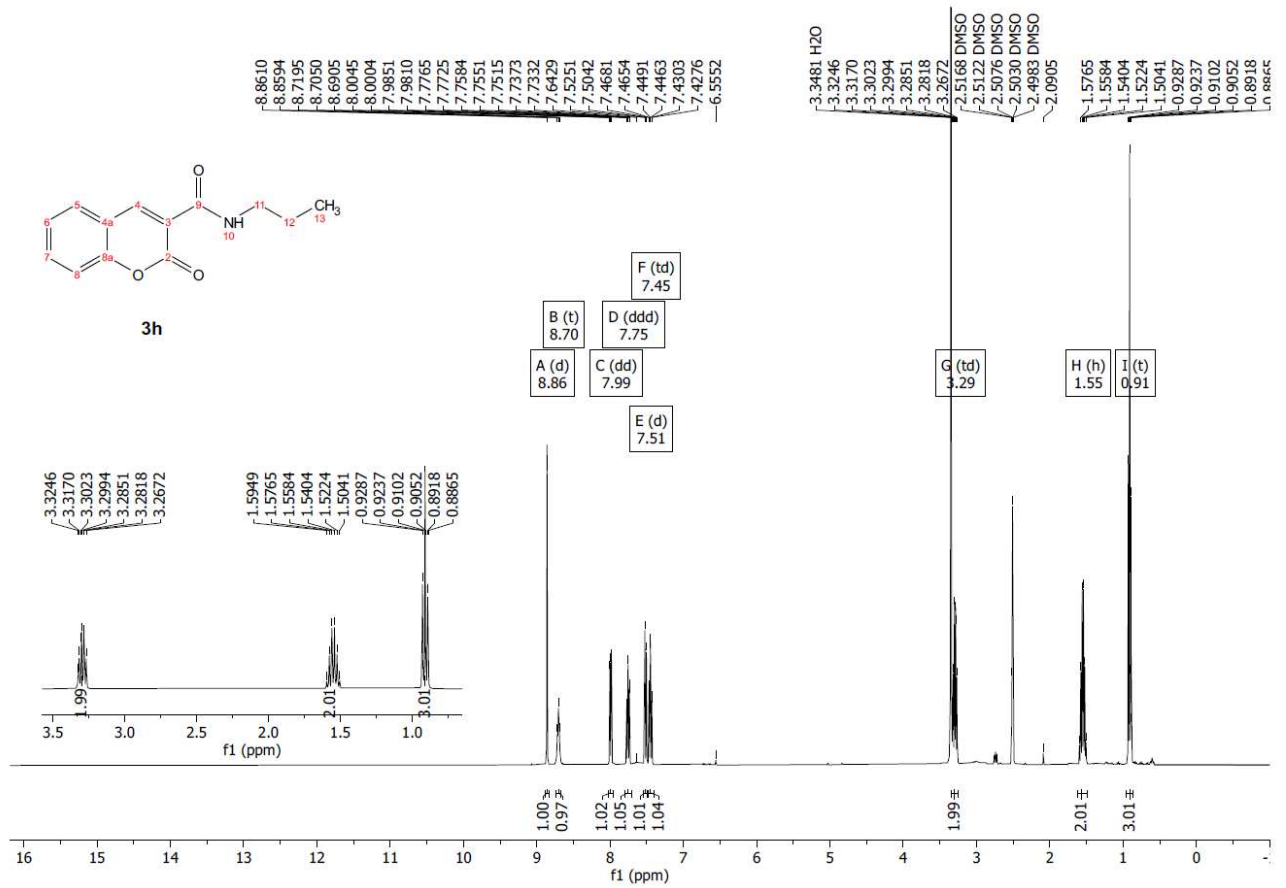


Figura 16C - Espectro de massas de alta resolução (ESI+)QTOFMS composto **3h**.

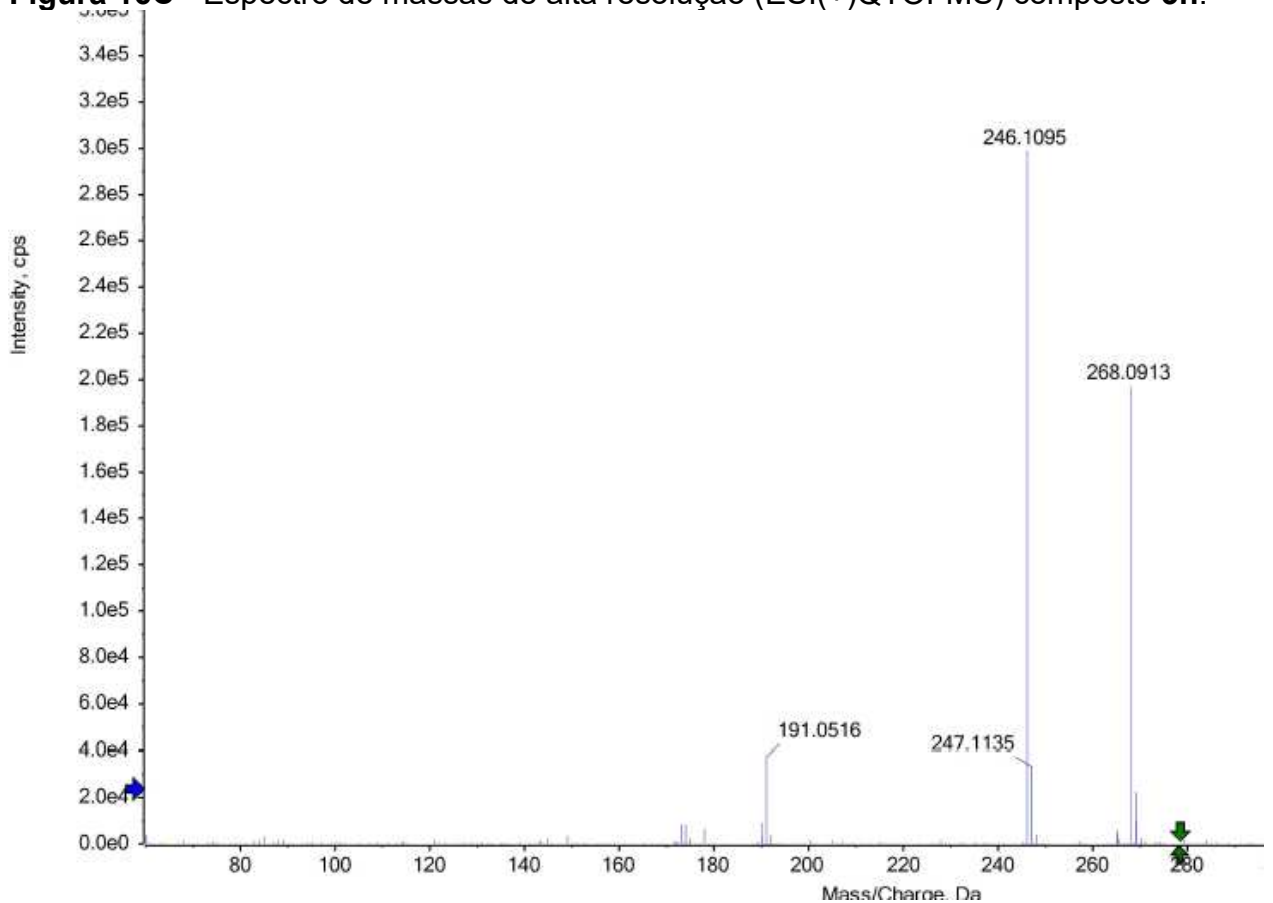


Figura 17C - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **3i** em $\text{DMSO-}d_6$.

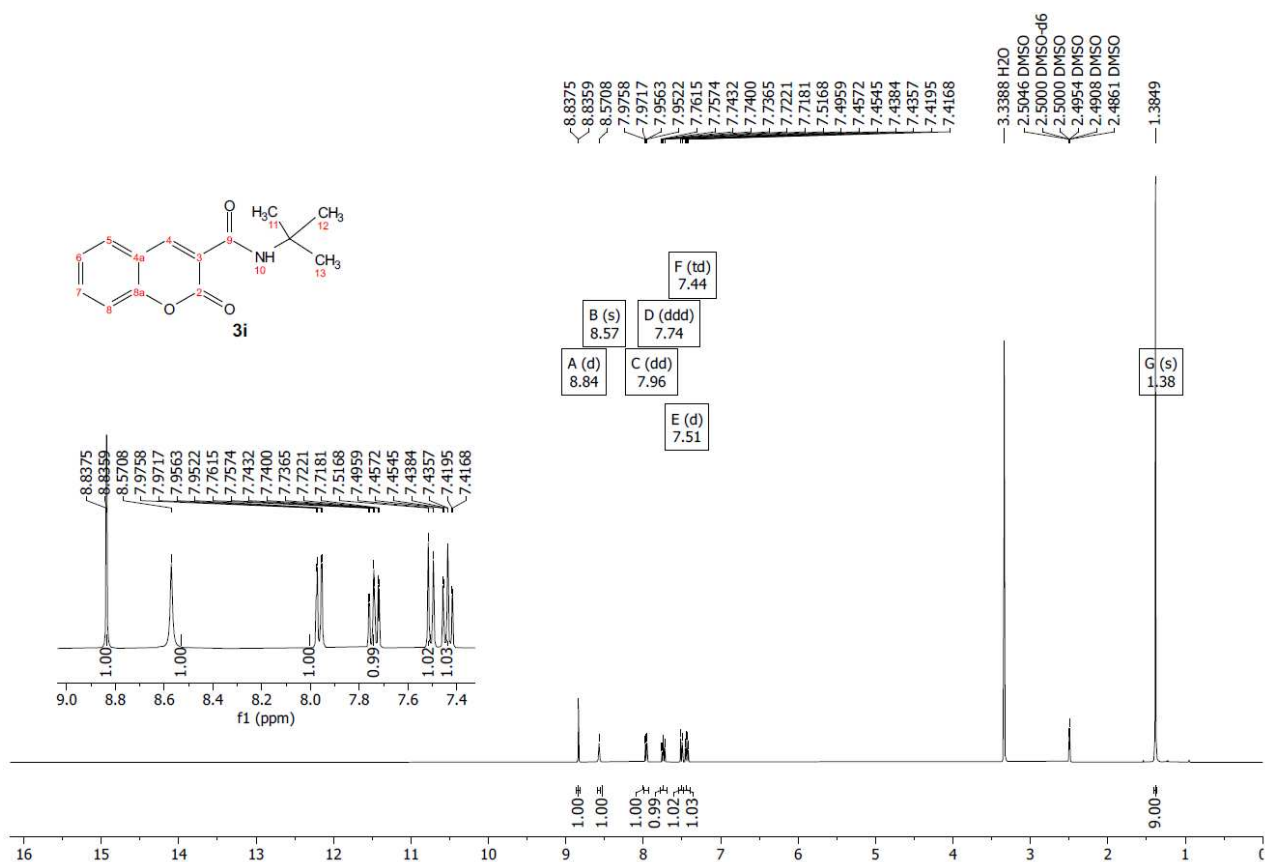
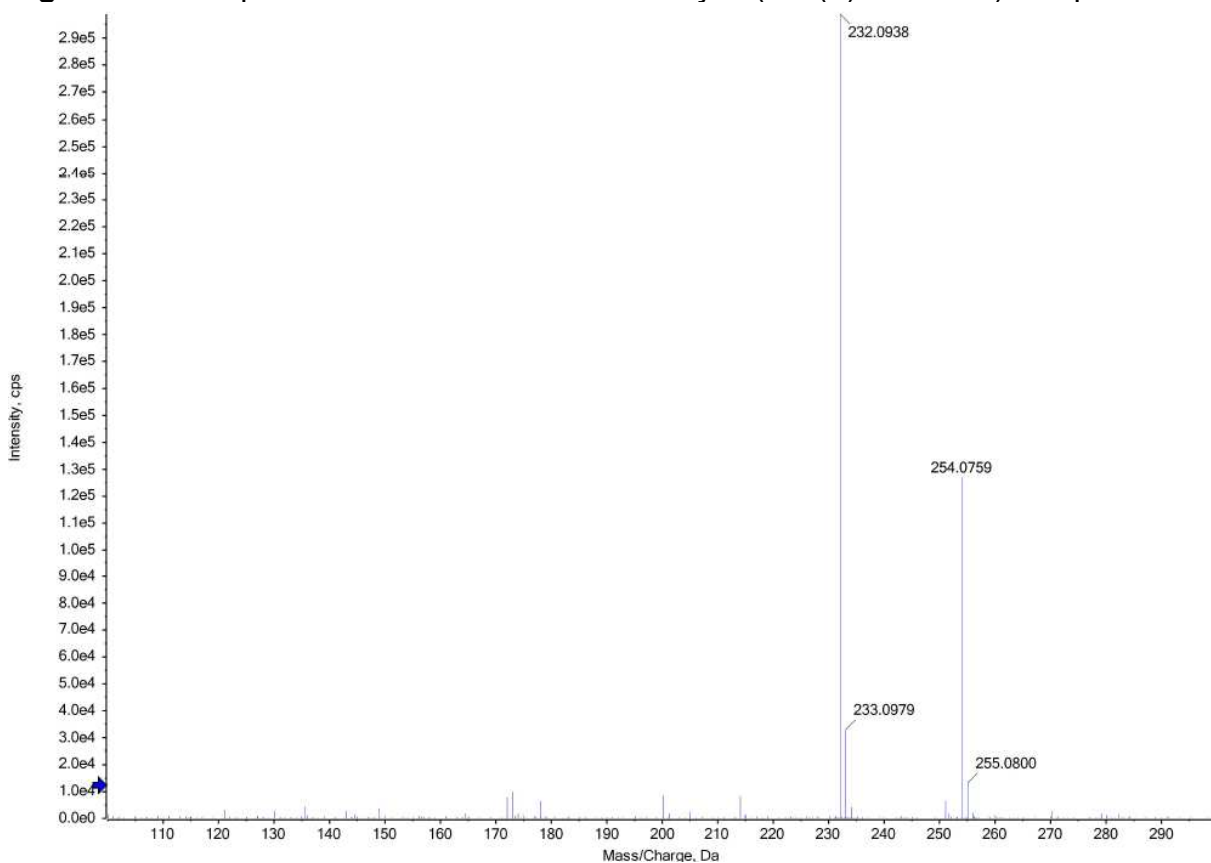


Figura 18C - Espectro de massas de alta resolução (ESI(+))QTOFMS composto **3i**.



APÊNDICE D-CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DAS DIHIDROXI-CUMARILAMIDAS (6A-I)

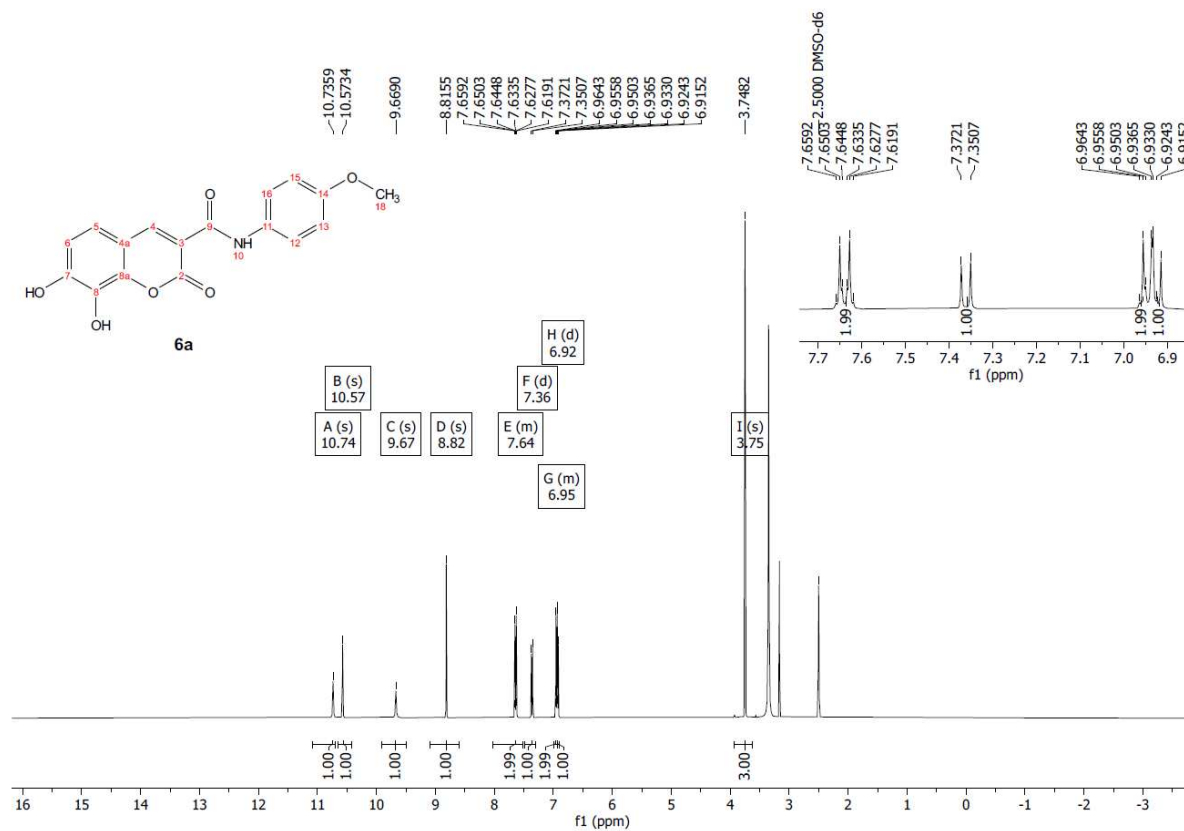
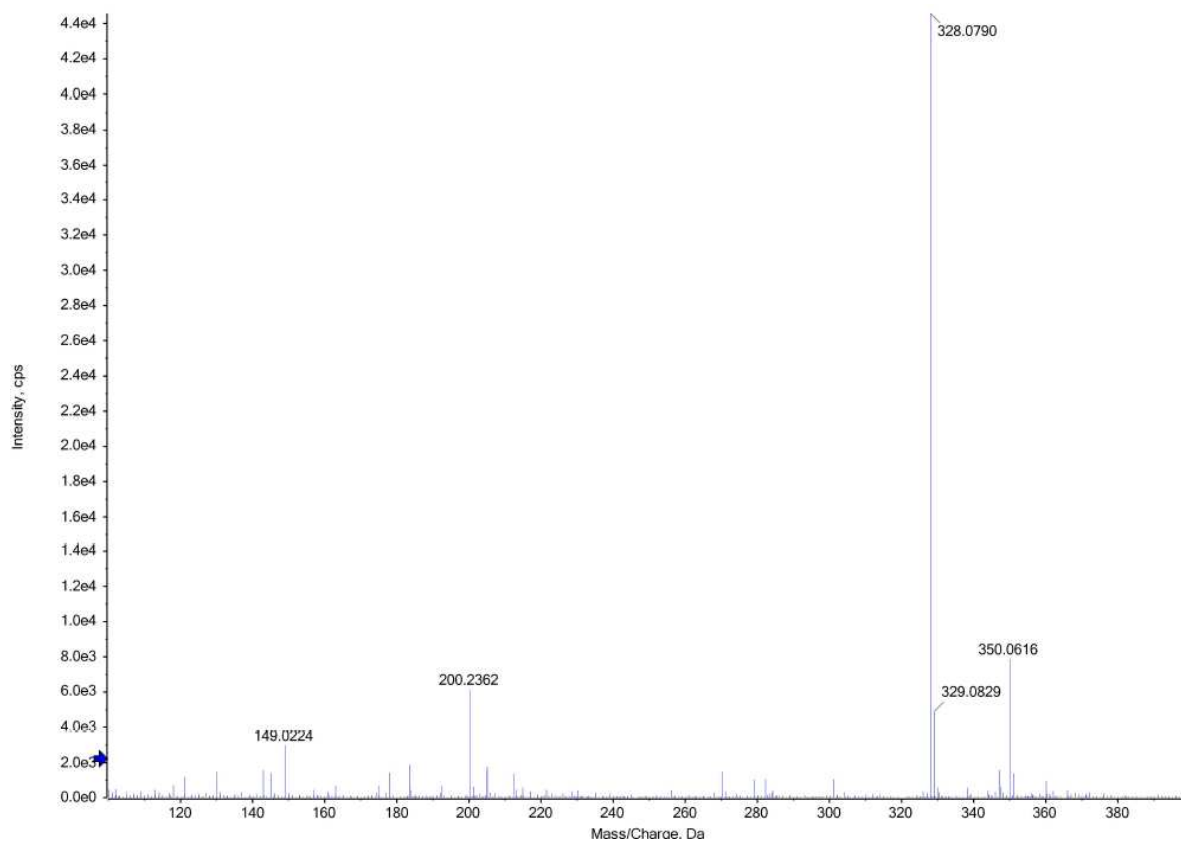
Figura 1D - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **6a** em $\text{DMSO-}d_6$.Figura 2D – Espectro de massas de alta resolução (ESI(+))QTOFMS) composto **6a**.

Figura 3D – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **6b** em $\text{DMSO-}d_6$.

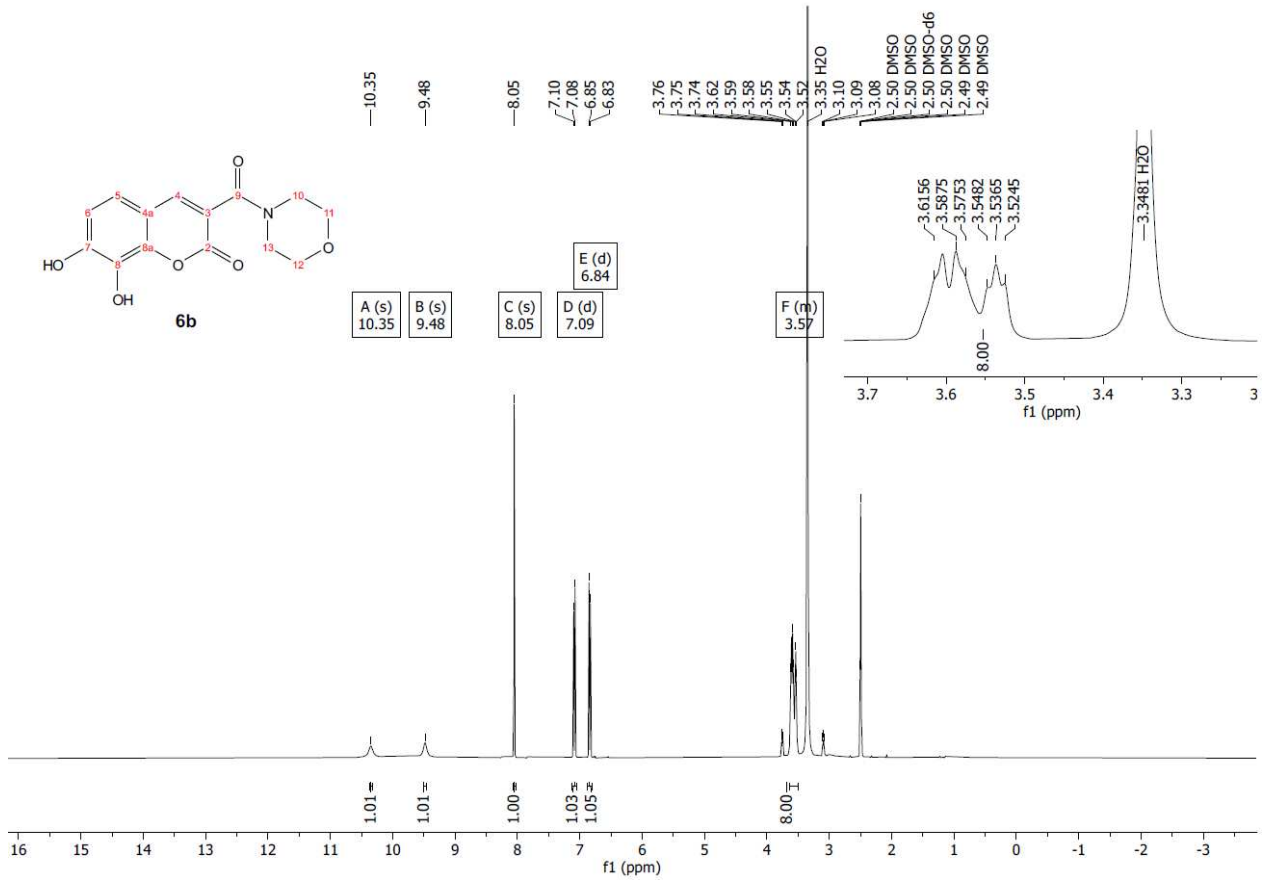


Figura 4D – Espectro de massas de alta resolução (ESI(+))QTOFMS) composto **6b**.

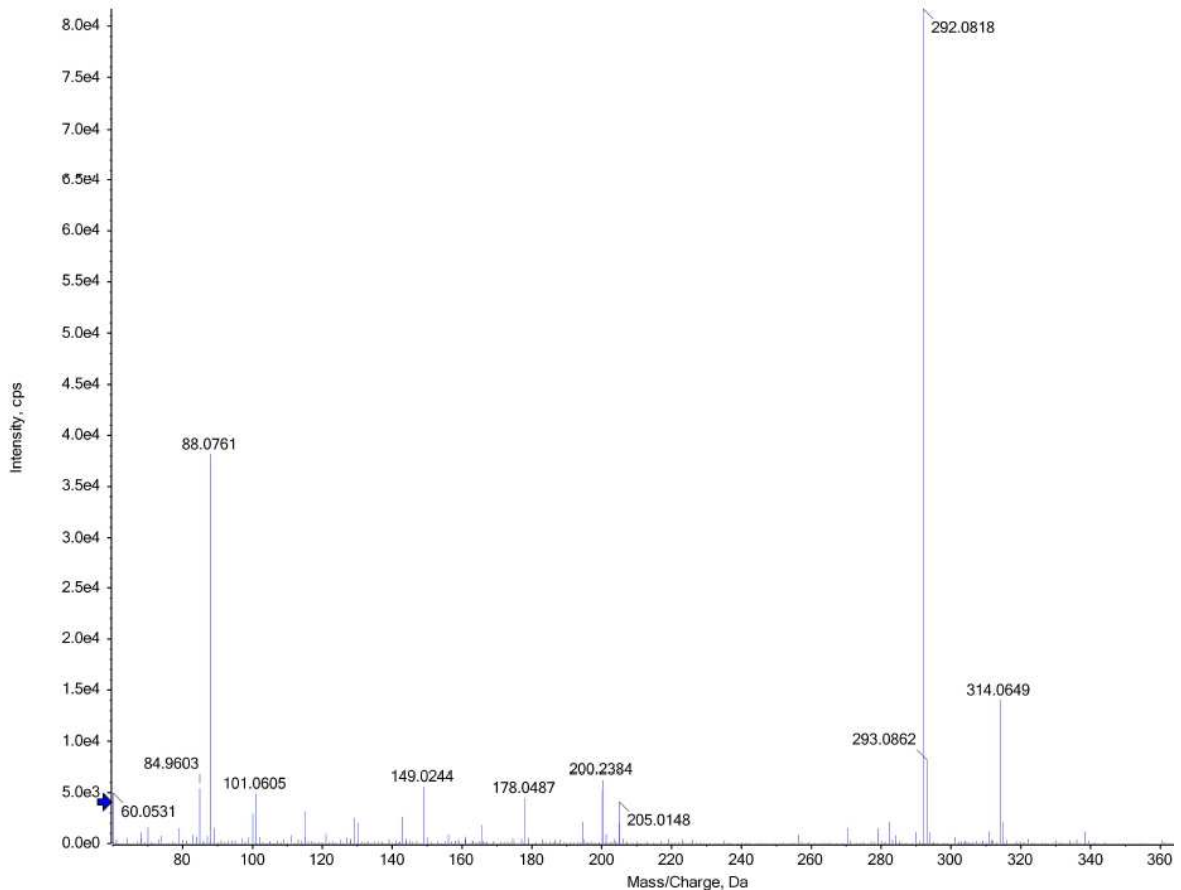


Figura 5D – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **6c** em DMSO- d_6 .

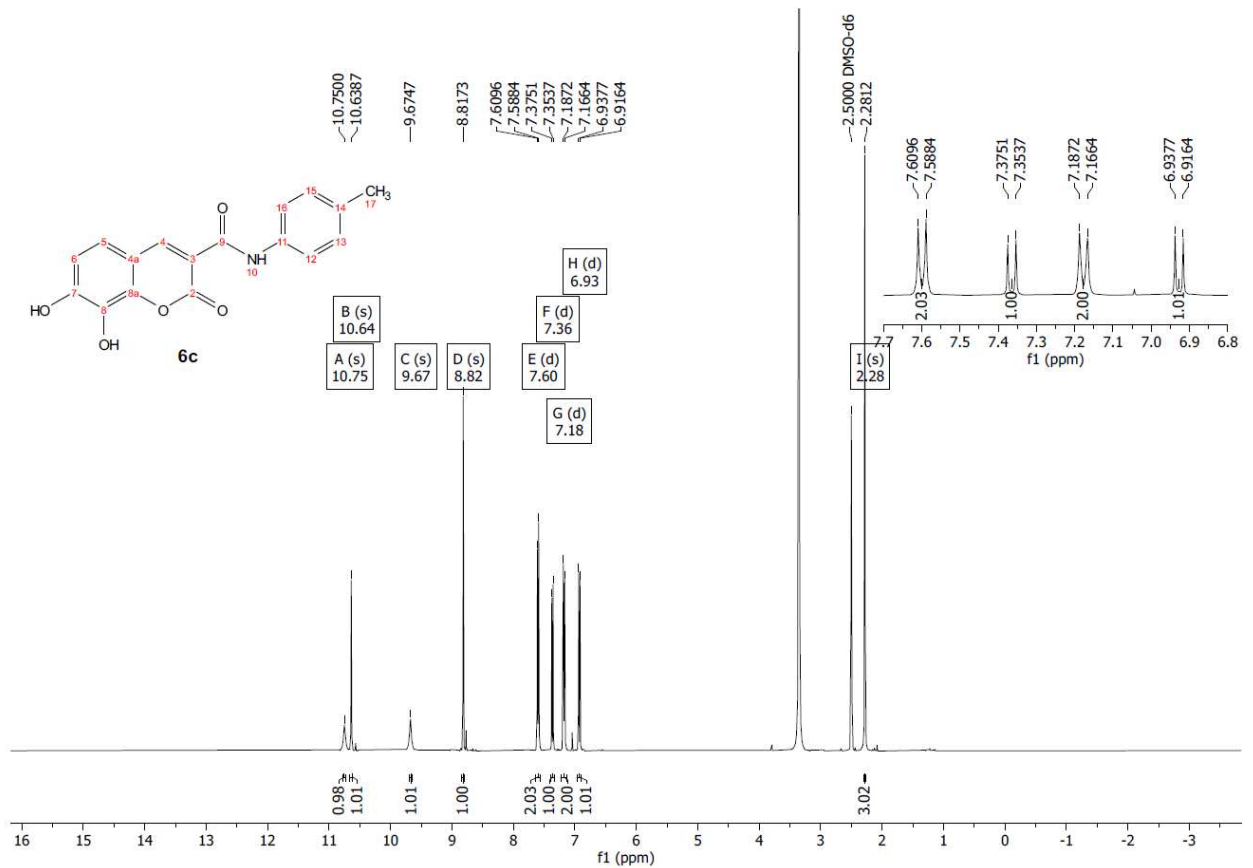


Figura 6D – Espectro de massas de alta resolução (ESI(+))QTOFMS) composto **6c**.

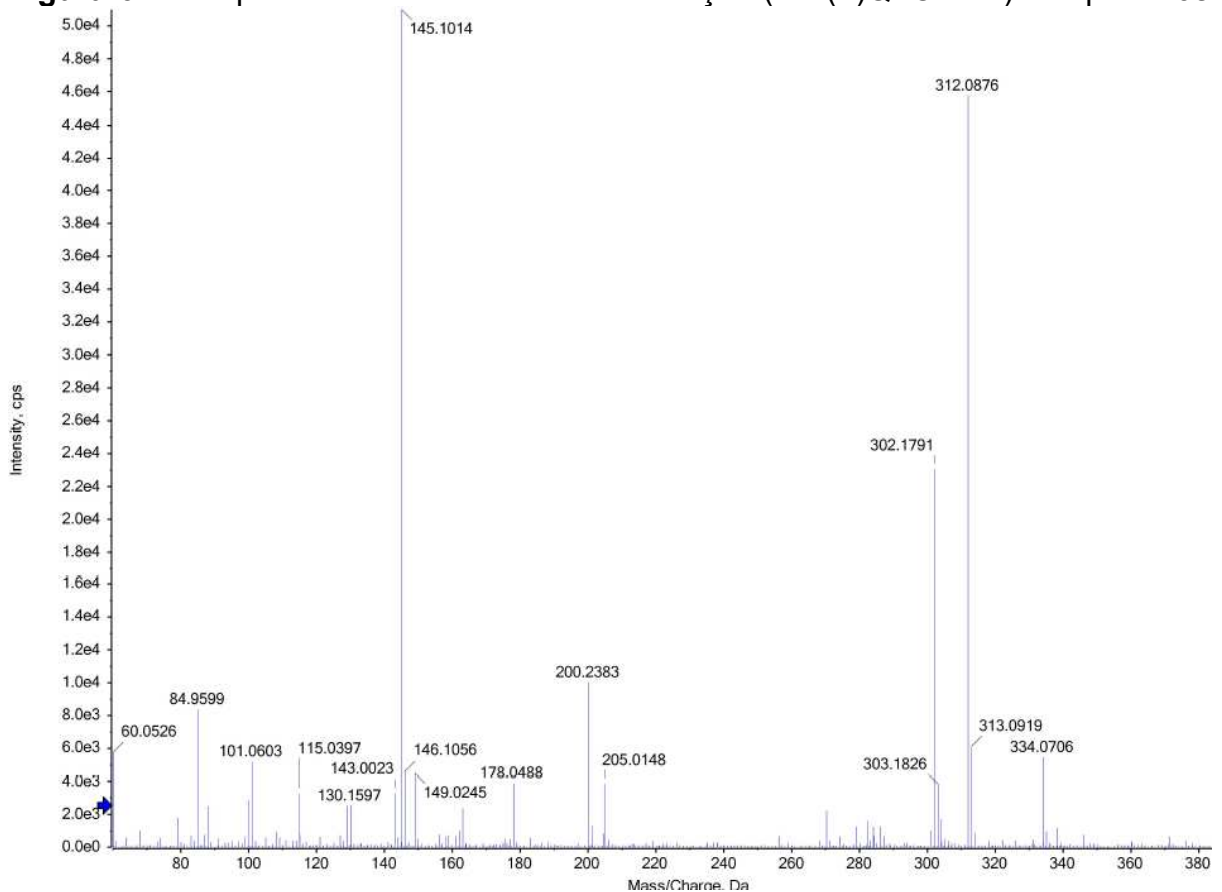


Figura 7D – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **6d** em $\text{DMSO-}d_6$.

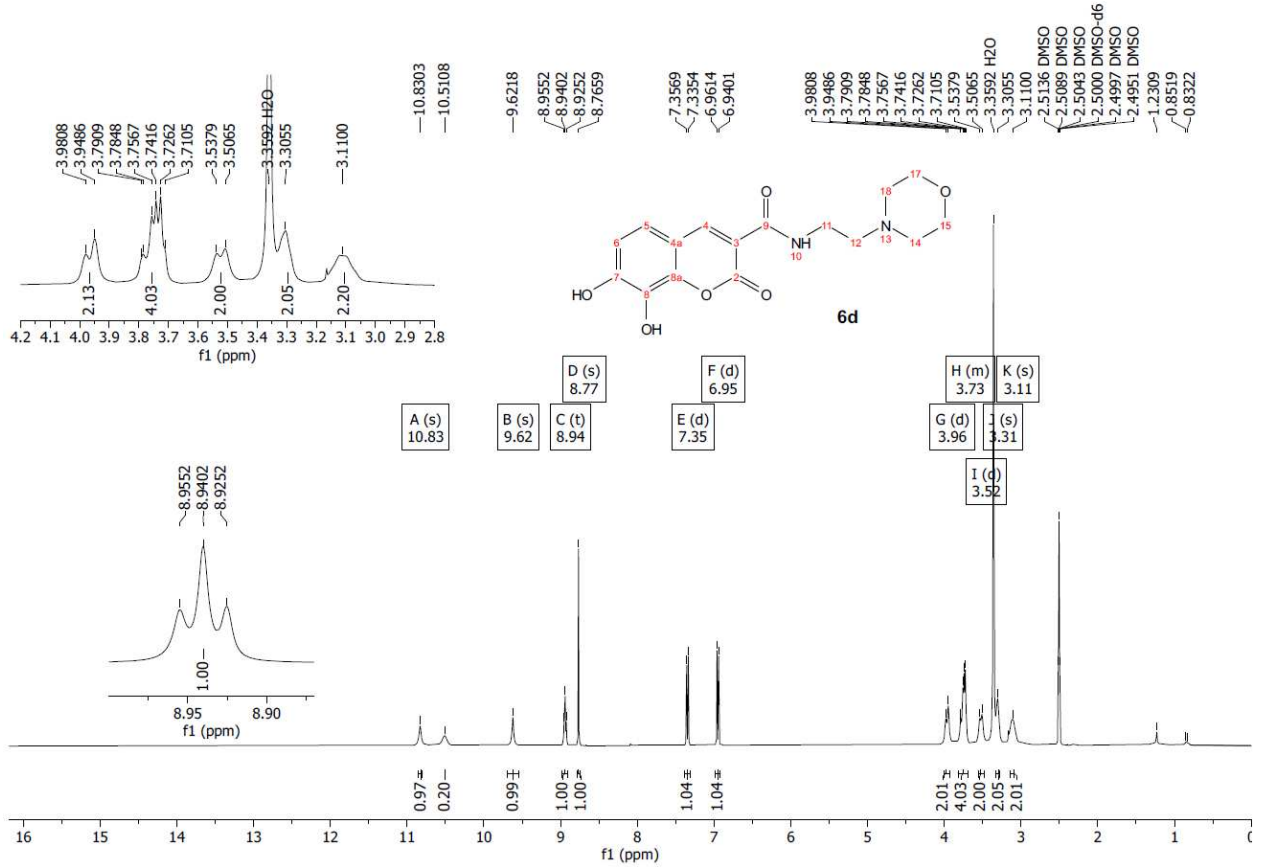


Figura 8D – Espectro de massas de alta resolução (ESI(+))QTOFMS) composto **6d**.

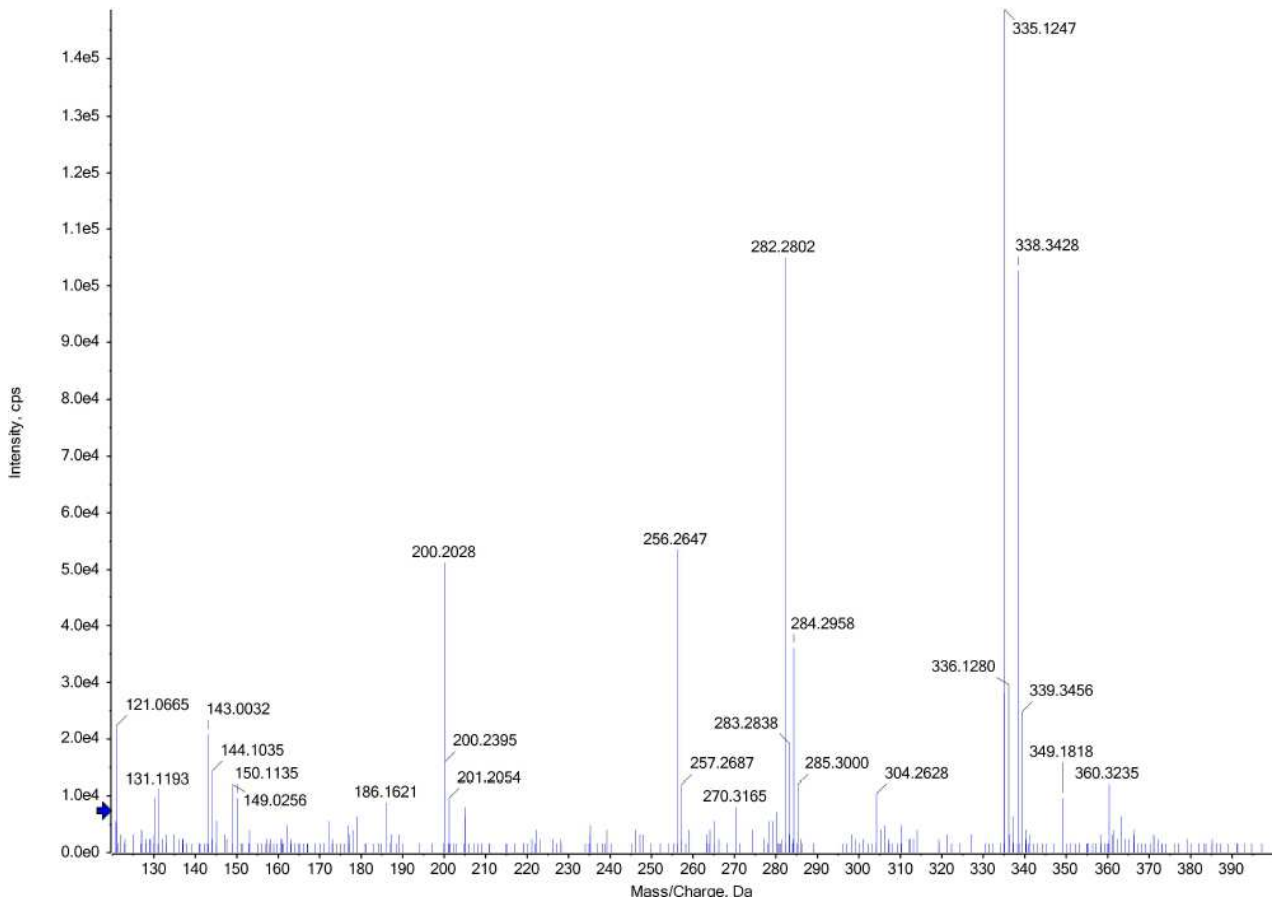


Figura 9D – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **6e** em DMSO- d_6 .

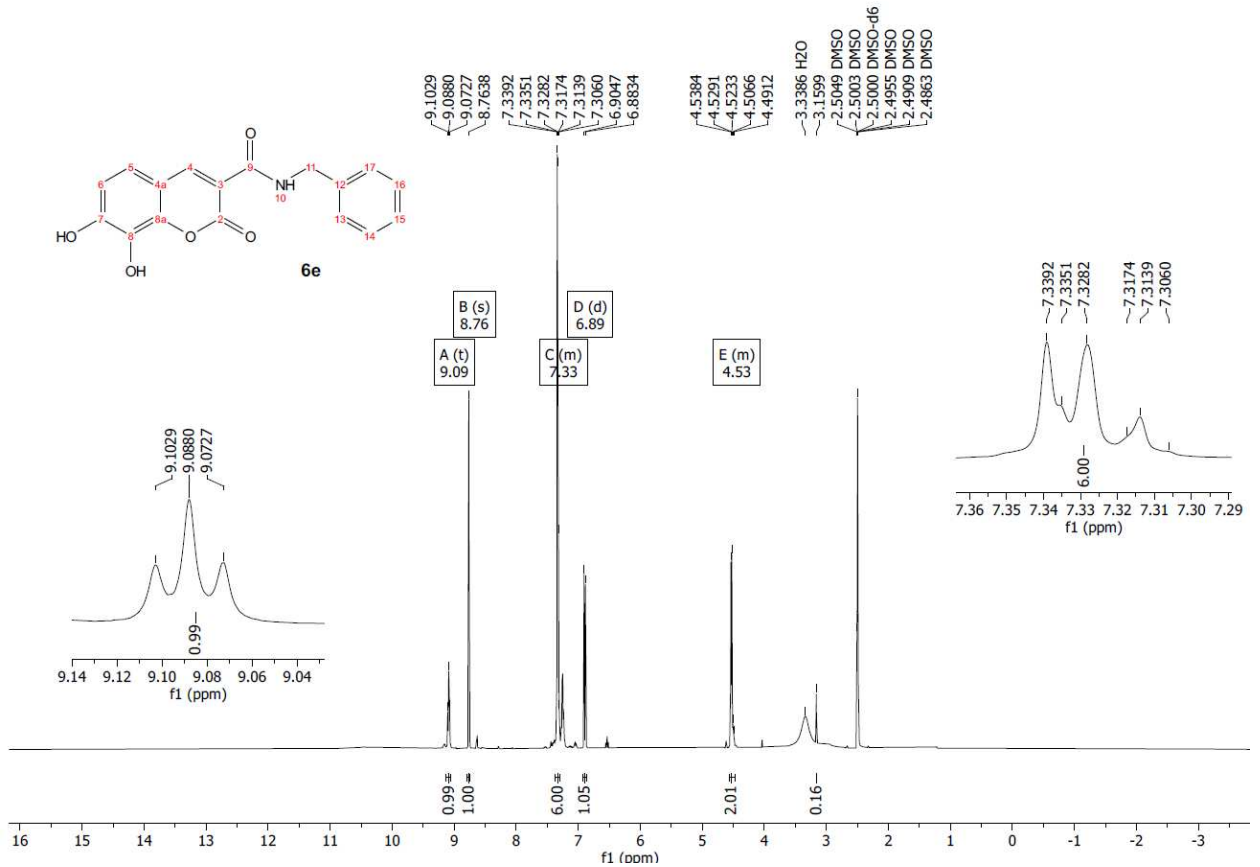


Figura 10D – Espectro de massas de alta resolução (ESI+)QTOFMS) composto **6e**.

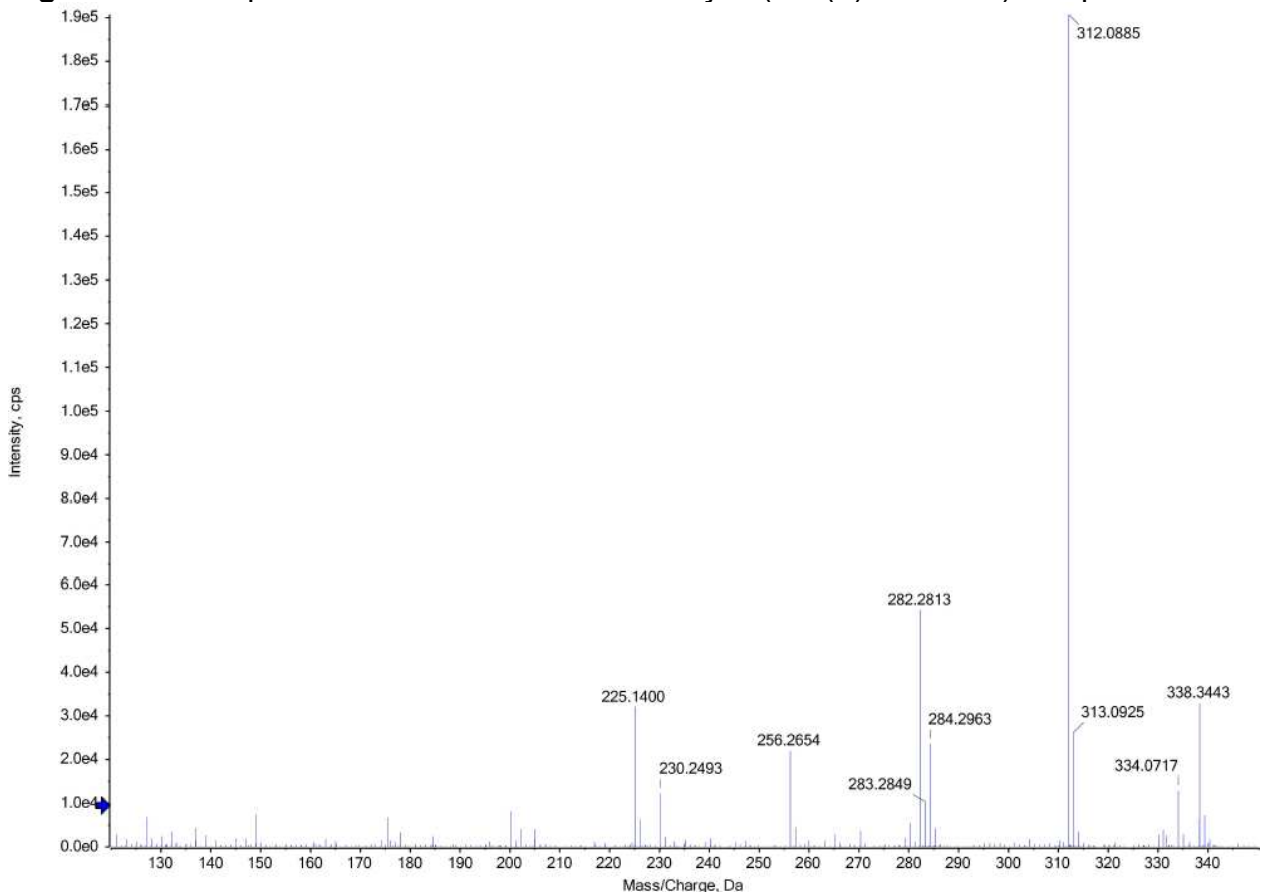


Figura 11D – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **6f** em DMSO- d_6 .

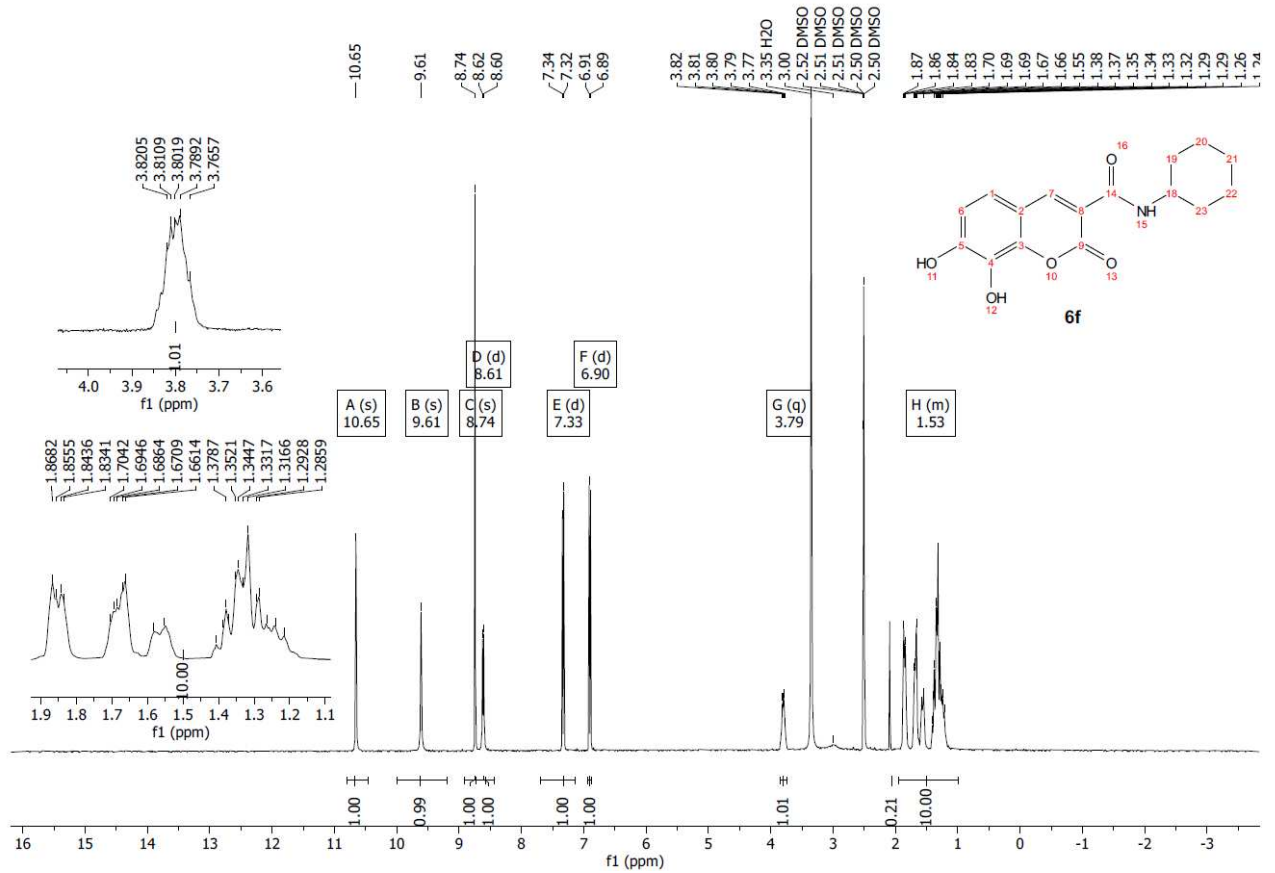


Figura 12D – Espectro de massas de alta resolução (ESI+)QTOFMS) composto **6f**.

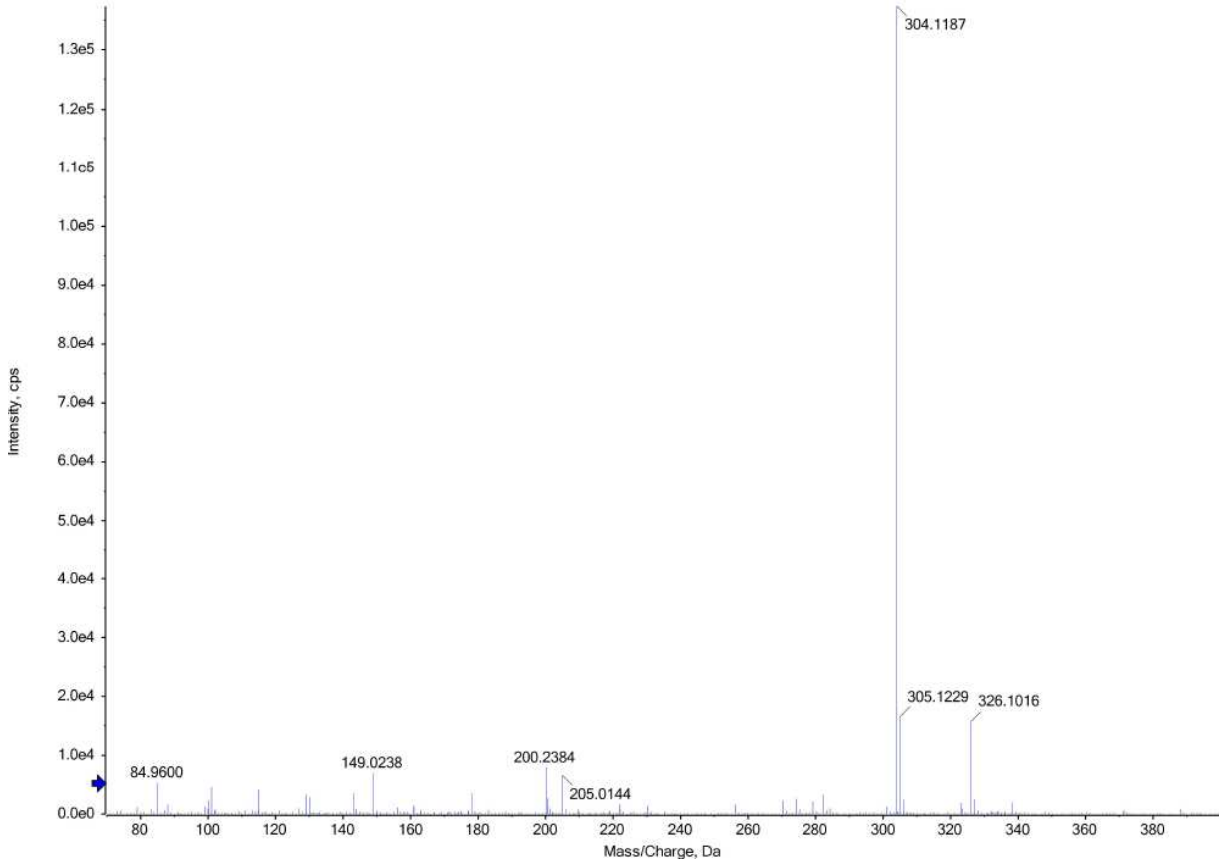


Figura 13D – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **6g** em $\text{DMSO-}d_6$.

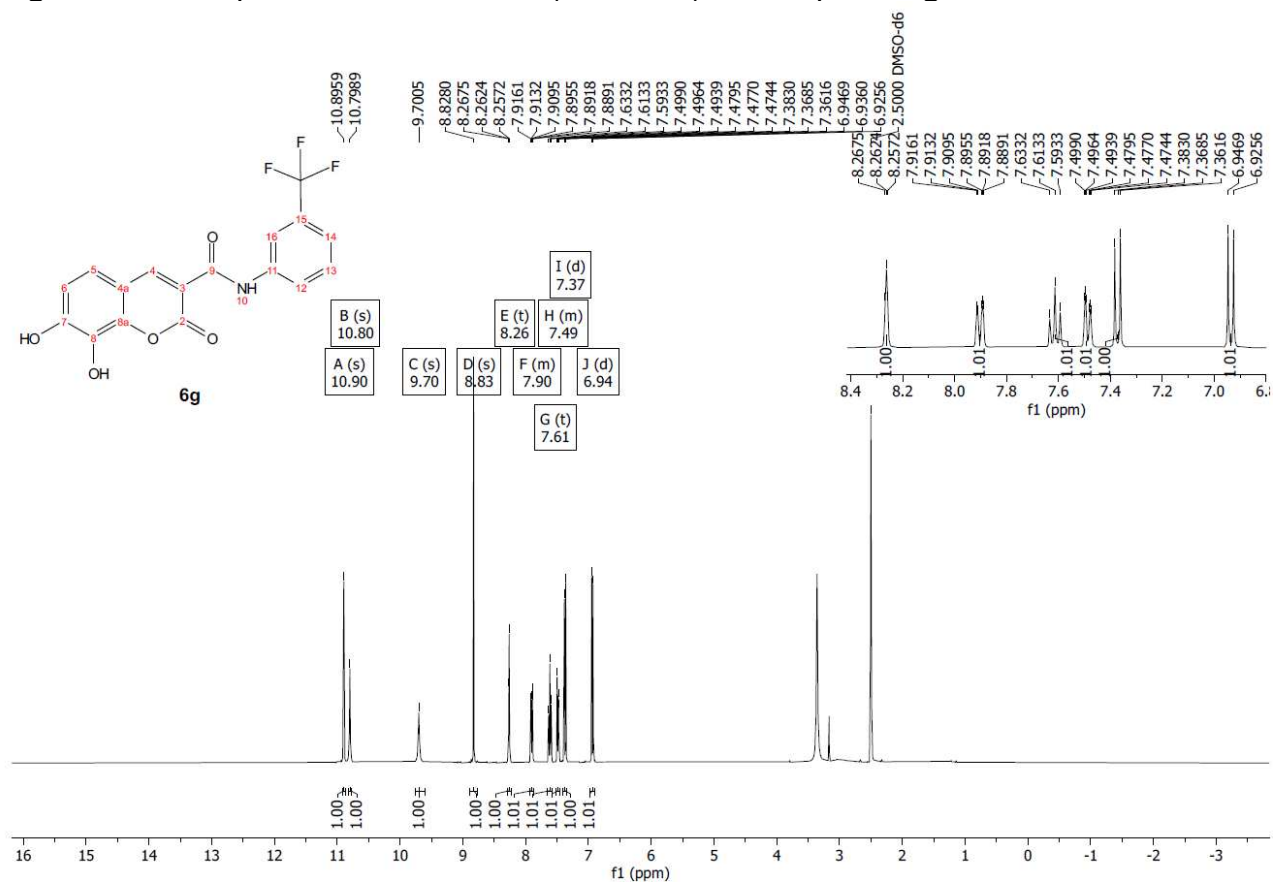


Figura 14D – Espectro de massas de alta resolução (ESI+)QTOFMS) composto **6g**.

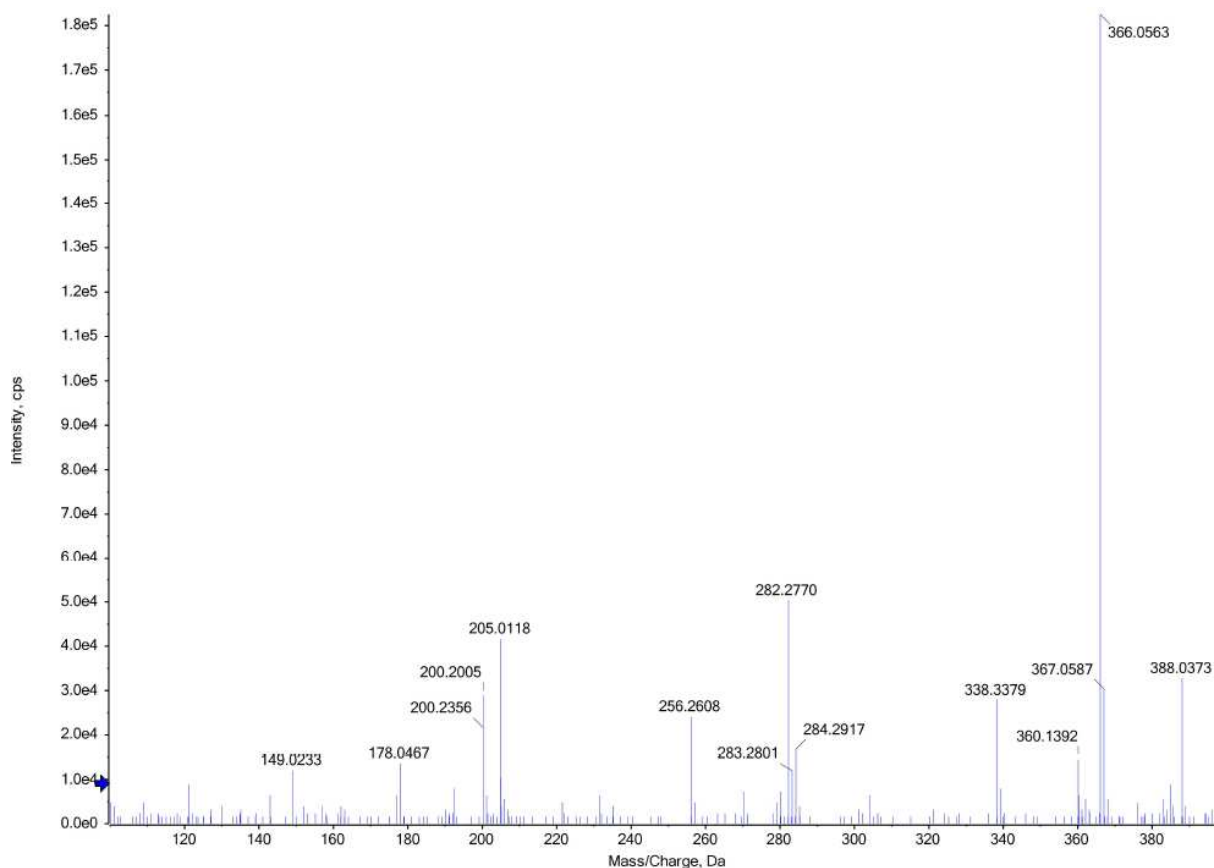


Figura 15D – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **6h** em $\text{DMSO-}d_6$.

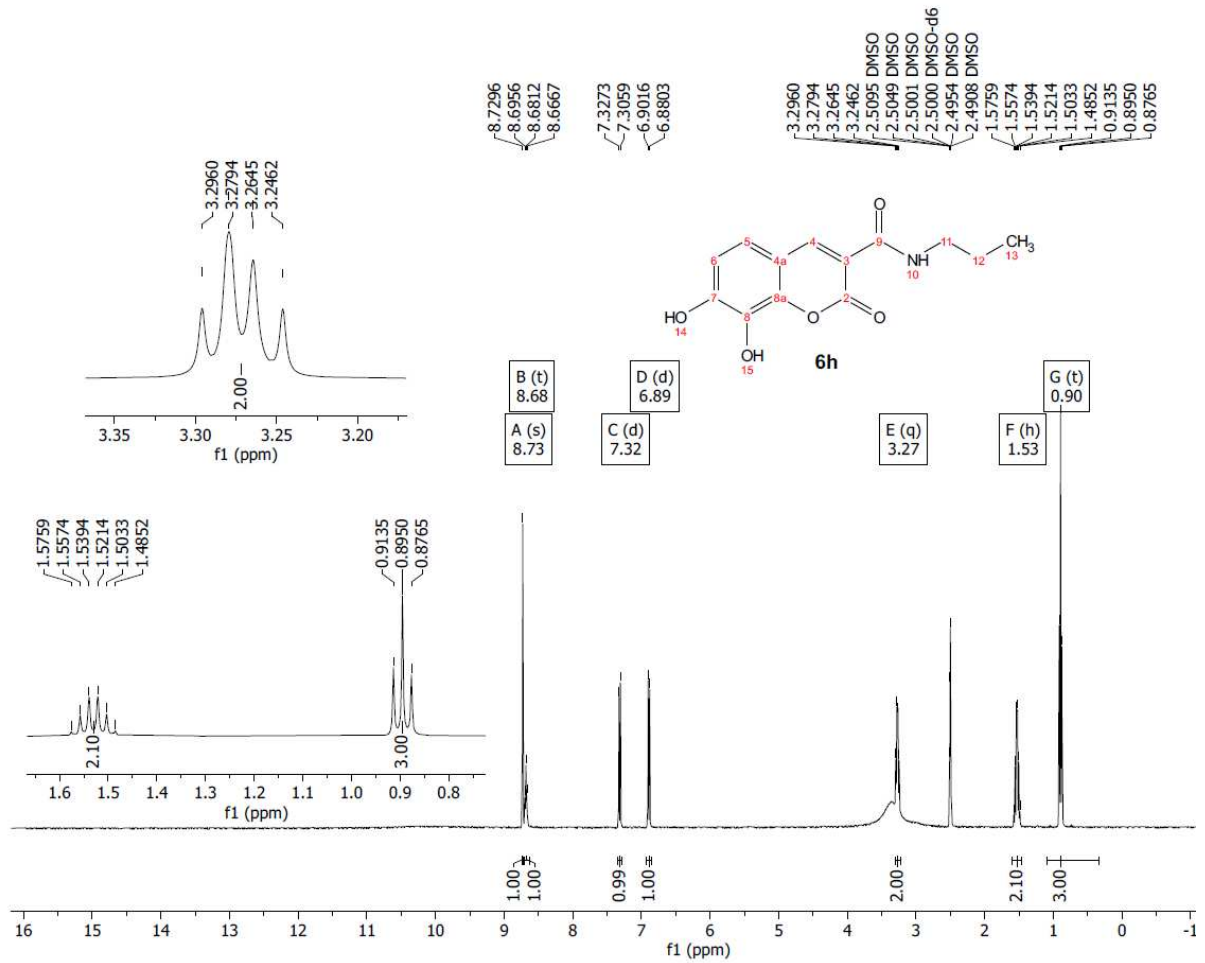


Figura 16D – Espectro de massas de alta resolução (ESI(+))QTOFMS) composto **6h**.

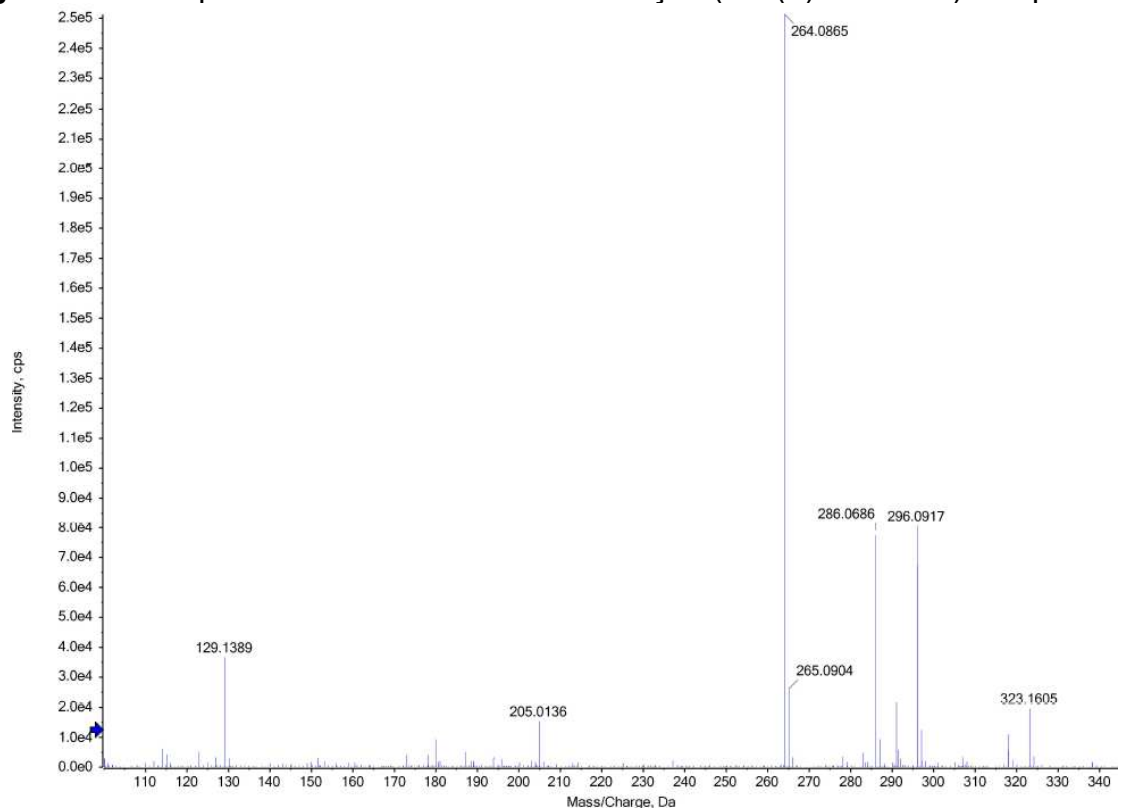


Figura 17D – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto **6i** em $\text{DMSO-}d_6$.

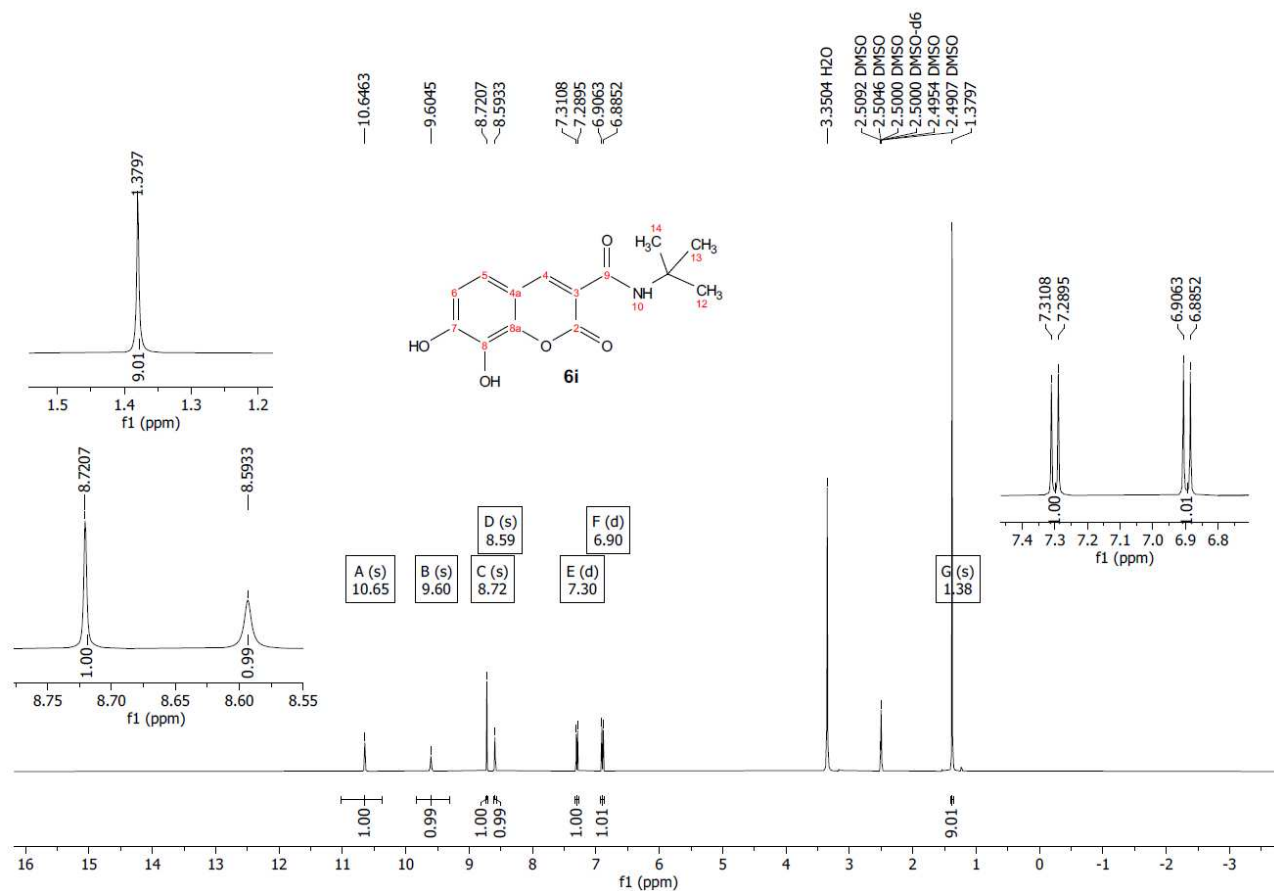


Figura 18D – Espectro de massas de alta resolução (ESI(+))QTOFMS composto **6i**.

