



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

SÍNTESE PROMOVIDA POR ULTRASSOM DE 5-ARIL-3-(TIEN-2-IL)-4,5-DIIDRO-1H-AMIDINOPIRAZÓIS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Tainara A. do Nascimento^{1,†} (IC), Eric F. S. dos Santos¹ (PG), Débora R. H. Brait² (PG), Fabio J. Negrão² (PQ), Lucas Pizzuti^{1,*} (PQ)

¹Laboratório de Síntese e Caracterização Molecular, FACET/UFGD.

²Laboratório de Microbiologia Aplicada, FCS/UFGD.

[†]Aluna de Iniciação Científica PIBIC/CNPq. *Orientador PIBIC. E-mail: lucas.pizzuti@gmail.com

RESUMO

Este trabalho propõe o desenvolvimento de rotas sintéticas sustentáveis a fim de sintetizar os precursores 3-aril-1-(tien-2-il)-prop-2-en-1-onas via condensação de aldeídos aromáticos com 2-acetiltofeno utilizando um catalisador básico KOH 20% , sob temperatura ambiente, e posterior ciclocondensação dos precursores 3-aril-1-(tien-2-il)-prop-2-en-1-onas com cloridrato de aminoguanidina sob irradiação ultrassônica na presença de hidróxido de potássio gerando os 5-aril-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1H-amidinopirazóis. Os compostos de interesse foram obtidos em bons rendimentos e em tempos de reação entre 15 e 35 minutos, dependendo do substituinte. Os novos pirazóis foram avaliados quanto à sua atividade antibacteriana através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e mostraram-se eficazes na inibição de bactérias gram-positivas, quando comparados aos antibióticos padrões.

Palavras-chave: Ultrassom, Chalconas, Pirazóis, Sonoquímica, Atividade Antibacteriana

1 INTRODUÇÃO

Derivados de 4,5-diidropirazóis têm demonstrado numerosos efeitos farmacológicos proeminentes, tais como antimicrobianos, anti-inflamatórios, analgésicos, antidepressivos e anticancerígenos. Outros efeitos farmacológicos incluem

as atividades antiepilética, antitripanosomal, antiviral, MAO-inibitória, antinociceptiva, inseticida, hipotensora, antioxidante e antidiabética [1-3]. Sabendo que existe uma infinidade de moléculas orgânicas heterocíclicas encontradas na natureza com excelentes atividades farmacológicas buscamos inovações em rotas sintéticas para obtenção de heterociclos com substituições variadas buscando aplicações potenciais [4-10].

A fim de desenvolver rotas sintéticas ambientalmente corretas, procuramos enquadrar em nossas metodologias alguns princípios que a química verde nos dispõe, dentre eles evitar ou reduzir ao máximo o uso de solventes voláteis, realizando as sínteses em meio aquoso ou etanólico [7,8], e ativando as reações com ultrassom [11,12], procurando dispensar a utilização de catalisadores que possam poluir o meio ambiente e consequentemente não expondo em risco a saúde humana [12,13].

O ultrassom tem sido utilizado com sucesso como promotor ou acelerador de diversos tipos de reações orgânicas. Dentre as principais vantagens decorrentes do seu uso destacam-se a redução dos tempos de reação, o aumento nos rendimentos, a economia de energia e a possibilidade de utilização de solventes não convencionais. Neste sentido, nosso grupo de pesquisa tem sintetizado várias classes de compostos heterocíclicos pela metodologia sonoquímica.

Considerando tais precedentes, no presente trabalho apresenta uma rota eficiente e rápida para a síntese de uma série de 5-aril-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1*H*-amidinopirazóis pela ciclocondensação de chalconas com cloridrato de aminoguanidina utilizando o ultrassom, na presença de KOH, e avaliação da atividade antimicrobiana.

2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

Todos os reagentes e solventes foram utilizados como obtidos comercialmente, à exceção do benzaldeído que foi destilado sob pressão reduzida. Os materiais de partida 3-aril-1-(tien-2-il)-prop-2-en-1-onas (**1a-n**) foram preparados de acordo com a metodologia proposta por Vanangamudi e colaboradores em 2012 [15], reagindo respectivamente 1 equivalente de acetiltiofeno com 1 equivalente de benzaldeído em etanol, com um catalisador básico KOH 20% , sob temperatura ambiente.

As reações sonoquímicas foram realizadas em um frasco tipo *vial* com uma sonda emissora de ultrassom conectada em um processador ultrassônico de 500 W, modelo Sonics Vibracell, operando a 20 kHz e 20% da potência máxima de saída. O progresso das reações foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD). Os

pontos de fusão foram obtidos em um aparelho Instrutherm DF-3600 II, usando capilares abertos e termômetro não aferido. Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em um espectrômetro de massas (EM) Varian 210 MS conectado a um cromatógrafo gasoso (CG) Varian 431, equipado com injetor *split-splitless* e coluna capilar Varian Factor Four™ (30 m × 0.25 mm), utilizando hélio como gás de arraste.

Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro Bruker DPX400 (400,13 MHz para ^1H e 100,62 MHz para ^{13}C) em tubos de 5 mm, a 298 K em CDCl_3 ou $\text{DMSO-}d_6$. Para os espectros de RMN de ^1H adquiridos em CDCl_3 , os deslocamentos químicos foram apresentados em ppm e calibrados a partir do TMS como padrão interno. Para os espectros de RMN de ^1H adquiridos em $\text{DMSO-}d_6$, os deslocamentos químicos foram calibrados pelo deslocamento do DMSO residual. Para os espectros de RMN de ^{13}C , os deslocamentos foram apresentados em ppm e calibrados em relação ao CDCl_3 ou $\text{DMSO-}d_6$.

Para as análises de massas de alta resolução, os compostos foram dissolvidos em uma solução 50% (v/v) de acetonitrila grau cromatográfico, 50% (v/v) de água deionizada e 0,1% de ácido fórmico. As soluções foram injetadas diretamente e individualmente na fonte ESI ao fluxo de $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. ESI(+)-MS foram adquiridos usando espectrômetro de massas Bruker Scientific microTof (Q-TOF) de alta resolução e acurácia, nas seguintes condições: voltagens capilares e do cone foram estabelecidas em +3500 V e +40 V, respectivamente, com temperatura de de-solvatação de 100°C . Os dados foram obtidos na faixa de 70–700 (m/z), com resolução de 50000 (FWHM) na m/z 200.

2.1 Procedimento geral de síntese dos cloridratos de 5-aryl-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1H-amidinopirazóis 2a-n

Em um frasco tipo *vial*, foi adicionada a 3-aryl-1-(tien-2-il)-prop-2-en-1-ona **1a-n** apropriada (2 mmol), o cloridrato de aminoguanidina (0,22 g, 2 mmol) e etanol (15 mL). Em seguida, foi adicionado o KOH em pó (0,11 g, 2 mmol). A mistura foi sonicada por 15-35 minutos, conforme o precursor **1a-n** utilizado. Após o tempo de sonicação apropriado, a mistura foi transferida para um funil de extração ao qual foi adicionado HCl 10% (10 mL). O produto foi extraído com clorofórmio ($3 \times 20 \text{ mL}$) e as fases orgânicas combinadas. Posteriormente, a fase orgânica foi secada com sulfato de magnésio anidro, filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. Após

recristalização do sólido resultante em acetato de etila, o produto **2a-n** foi obtido na forma de sólido amorfo.

2.2 Procedimento geral dos testes antibacterianos *in vitro*

Os testes para determinação da CIM e de sensibilidade foram regidos pelas Normas de Desempenho para os testes de Susceptibilidade Antimicrobiana; Vigésima Segunda Informação Suplementar (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Information Supplement), utilizando antibióticos padrões testados e recomendados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Foram utilizadas cinco cepas de bactérias, sendo duas gram-positivas, a *Staphylococcus aureus* – 37664 e a *Enterococcus faecalis* – 51299, e três gram-negativas, a *Salmonella sp.* – 13076, *Escherichia coli* – 25922 e a *Pseudomonas aeruginosa* – 27853.

2.2.1 Preparo do inóculo microbiano

Os microrganismos foram ativados em tubos com caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), incubados a 35°C por 24 horas. Para o isolamento de colônias, uma alíquota de cada cultura ativada foi transferida com o auxílio de uma alça calibrada para placa de Petri com Agar Mueller-Hinton e incubado a 35°C por 24 horas. Após esse processo, algumas colônias foram transferidas para um tubo de ensaio com 3 mL de solução salina (0,90%). A suspensão de microrganismos foi preparada em solução salina de acordo com a escala de turbidez padrão Mc Farland na escala ½. O teste foi adaptado de acordo com o procedimento para a realização do experimento a fim de determinar a concentração inibitória mínima (CIM).

2.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada em triplicata, em placas de Elisa de fundo U, nas quais foi adicionado em cada pocinho 100 µL de meio líquido Muller-Hinton devidamente esterilizado, 50 µL da suspensão de bactérias e 50 µL da solução estoque de 4,5-diidro-1*H*-amidinopirazol. As soluções estoque dos compostos **2a-n** foram preparadas em DMSO na concentração de 12000 µg/mL. As concentrações que foram trabalhadas nas placas variaram de 3000 µg/mL a 0,011 µg/mL.

Foi realizado um controle para cada microrganismo, composto por um branco contendo apenas o meio de cultura e outro contendo o solvente empregado na diluição das amostras (DMSO). As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas.

2.2.3 Teste de sensibilidade *in vitro*

Após os ensaios da concentração inibitória mínima foi avaliada a sensibilidade *in vitro* das bactérias nas CIM. Para isso, foram feitas novas inoculações dos meios em que ocorreram a CIM, com auxílio de alça de platina, cada pocinho foi inoculado novamente em Agar Mueller-Hinton e incubados em por 24 horas a 35°C. No pocinho em que houve crescimento da bactéria o composto teve ação bacteriostática ou efeito intermediário (I) e onde não houve crescimento bacteriano o composto teve ação bactericida ou a bactéria foi sensível (S) a ele, nas concentrações inibitórias mínimas.

2.3 Dados físicos e espectroscópicos dos compostos 2a-n

Cloridrato de 5-fenil-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1H-amidinopirazol (2a): 95%, sólido amarelo; p.f. 266-268°C; IV (KBr): ν (cm^{-1}) 3337, 3115, 1609, 1430; RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 7,95 (s, 4H, C(NH $_2$) $_2$), 7,85 (dd, 1H, $J = 0,9$ Hz, $J = 5,0$ Hz, tienil), 7,56 (dd, 1H, $J = 1,0$ Hz, $J = 3,6$ Hz, tienil), 7,39 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz, Ar), 7,33 (t, 1H, $J = 7,3$ Hz, Ar), 7,22 (d, 2H, $J = 7,4$ Hz, Ar), 7,17 (dd, 1H, $J = 3,8$ Hz, $J = 4,9$ Hz, tienil), 5,95 (m, 1H $_c$), 4,09 (dd, 1H, $J_{bx} = 11,2$ Hz, $J_{ba} = 17,8$ Hz, H $_b$), 3,36 (dd, 1H, $J_{ax} = 3,0$ Hz, $J_{ab} = 17,9$ Hz, H $_a$); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 153,0, 152,8, 139,5, 132,6, 131,9, 131,2, 128,9, 128,1, 125,2, 60,2, 55,9; 44,3; CG/MS [m/z (%)]: 226 (100), 227 (15), 197 (25). EMAR: m/z [MH] $^+$ calcd. para C $_{14}$ H $_{16}$ N $_4$ S: 271.1017, exp.: 271.1019.

Cloridrato de 5-(2-dimetoxifenil)-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1H-amidinopirazol (2b): 80%, sólido amarelo, p.f. 287-288°C; IV (KBr): ν (cm^{-1}) 3255, 3190, 3103, 1618, 1423, 1243; RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 7.86 (s, 4H, C(NH $_2$) $_2$), 7.82 (dd, 1H, $J = 0.9$ Hz, $J = 5.0$ Hz, Ar), 7.54 (dd, 1H, $J = 1.0$ Hz, $J = 3.6$ Hz, tienil), 7.34 (m, 1H, Ar), 7.16 (dd, 1H, $J = 3.8$ Hz, $J = 4.9$ Hz, tienil), 7.11 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, Ar), 6.94 (m, 2H, tienil e Ar), 5,87 (dd, 1H, $J_{xa} = 3,2$ Hz, $J_{xb} = 11,1$ Hz, H $_x$), 4,04 (dd, 1H, $J_{bx} = 11,2$ Hz, $J_{ba} = 17,7$ Hz, H $_b$), 3,83 (s, 1H, Ar-OCH $_3$), 3,24 (dd, 1H, $J_{ax} = 3,2$ Hz, $J_{ab} = 17,7$ Hz, H $_a$); RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 156,1, 153,6, 152,8, 132,7, 131,7, 131,0, 129,4, 128,0, 126,2, 124,8, 120,2, 111,7, 57,1, 55,6, 43,2; EMAR: m/z [MH] $^+$ calcd. para C $_{15}$ H $_{17}$ N $_4$ OS: 301,1123, exp.: 301,1148.

Cloridrato de 5-(2-bromofenil)-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1H-amidinopirazol (2c): 62%; sólido amarelado; p.f. 285-288°C; IV (KBr): ν (cm^{-1}) 3290, 3117, 1603, 1423; RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 8,01 (s, 4H, C(NH $_2$) $_2$), 7,84 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz, tienil), 7,75 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, Ar), 7,55 (d, 1H, $J = 3,4$ Hz, tienil), 7,52 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz,

Ar), 7,36 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 7,16 (d, 1H, 4,8 Hz, tienil), 6,01 (dd, 1H, $J_{xa} = 2,8$ Hz, $J_{xb} = 11,1$ Hz, H_x), 4,09 (dd, 1H, $J_{bx} = 11,2$ Hz, $J_{ba} = 17,9$ Hz, H_b), 3,40 (dd, 1H, $J_{ax} = 2,9$ Hz, H_a); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 153,1, 152,0, 135,7, 132,6, 132,5, 132,2, 132,0, 131,2, 129,7, 128,0, 127,5, 126,6, 58,5, 43,1.; CG/MS [m/z (%)]: 306 (100), 294 (89), 151 (79), 43 (96). EMAR: m/z [MH] $^+$ calcd. para $C_{14}H_{14}BrN_4S$: 349,0122, exp.: 349,0129.

Cloridrato de 5-(3-nitrofenil)-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1H-amidinopirazol (2d): 65%, sólido amarelo, p.f. 288-291°C; IV (KBr): ν (cm^{-1}) 3363, 3284, 3204, 3103, 1611, 1524, 1423, 1344, 847; RMN 1H (500 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 8,21 (dd, 1H, $J = 1,4$ Hz, $J = 8,2$ Hz, Ar), 8,10 (s, 1H), 7,97 (s, 4H, $C(NH_2)_2$), 1H-NMR (500 MHz) ppm 7,86 (dd, 1H, $J = 1,0$ Hz, $J = 5,0$ Hz, tienil), 7,73 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz, Ar), 7,65 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar), 7,54 (dd, 1H, $J = 0,9$ Hz, $J = 3,6$ Hz, tienil), 7,19 (dd, 1H, $J = 3,7$ Hz, $J = 5,0$ Hz, tienil), 6,07 (dd, 1H, $J_{xa} = 3,1$ Hz, $J_{xb} = 11,3$ Hz, H_x), 4,15 (dd, 1H, $J_{bx} = 11,4$ Hz, $J_{ba} = 18,0$ Hz, H_b), 3,47 (dd, 1H, $J_{ax} = 3,3$ Hz, $J = 18,0$ Hz, H_a); RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 153,1, 152,7, 147,8, 141,4, 132,4, 132,1, 131,9, 131,4, 130,8, 128,1, 123,1, 120,06, 59,6, 44,2; EMAR: m/z [MH] $^+$ calcd. para $C_{14}H_{14}N_5O_2S$: 316,0868, exp.: 316,0878.

Cloridrato de 5-(3-bromofenil)-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1H-amidinopirazol (2e): 62%; sólido amarelado, p.f. 298-300°C; RMN 1H (500 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 7,94 (s, 4H, $C(NH_2)_2$), 7,85 (dd, 1H, $J = 1,0$ Hz, $J = 5,0$ Hz, tienil), 7,75 (d, 1H, $J = 0,8$ Hz, Ar), 7,54 (dd, 1H, $J = 1,1$ Hz, $J = 3,1$ Hz, tienil), 7,44 (s, 1H, Ar), 7,38 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 7,19 (m, 1H, tienil), 7,17 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, Ar), 5,92 (dd, 1H, $J_{xa} = 2,8$ Hz, $J_{xb} = 11,2$ Hz, H_x), 4,08 (dd, 1H, $J_{bx} = 11,3$ Hz, $J_{ba} = 17,9$ Hz, H_b), 3,42 (dd, 1H, $J_{ax} = 3,1$ Hz, $J = 17,9$ Hz, H_a); RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 153,1, 152,7, 142,0, 132,5, 132,1, 131,3, 131,2, 131,0, 128,4, 128,1, 124,0, 121,9, 59,6, 44,2; CG/MS [m/z (%)]: 306 (100), 294 (89), 151 (79), 43 (96).

Cloridrato de 5-(4-metilfenil)-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1H-amidinopirazol (2f): 80%; sólido amarelado; p.f. 278-280°C; IV (KBr): ν (cm^{-1}) 3255, 3096, 1611, 1430; RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 7,90 (s, 4H, $C(NH_2)_2$), 7,83 (d, 1H, $J = 5,0$ Hz, tienil), 7,55 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, Ar), 7,55 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, tienil), 7,20 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, Ar), 7,18 (t, 1H, tienil), 5,91 (dd, 1H, $J_{xa} = 3,0$ Hz, $J_{xb} = 11,2$ Hz, H_x), 4,06 (dd, 1H, $J_{bx} = 11,2$ Hz, $J_{ba} = 17,7$ Hz, H_b), 3,31 (dd, 1H, $J_{ax} = 3,0$ Hz, $J_{ab} = 17,7$ Hz, H_a), 2,27 (s, 1H, Ar- CH_3); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 153,0, 152,9, 137,5, 136,5, 132,7, 131,8, 131,1, 129,4, 12,1, 125,2, 60,1, 44,2; 20,54; CG/MS [m/z (%)]: 243 (28),

242 (100), 241 (52), 240 (43), 44 (9), 244 (7). EMAR: m/z $[MH]^+$ calcd. para $C_{15}H_{18}N_4S$: 285,1174, exp.: 285,1179.

Cloridrato de 5-(4-trifluorometilfenil)-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1H-amidinopirazol (2g): 62%; sólido amarelo, p.f. 295-298°C; IV (KBr): ν (cm^{-1}) 3370, 3290, 31068, 1603, 1423, 1315-1113, 839; RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 8,10 (s, 4H, $C(NH_2)_2$), 7,84 (d, 1H, $J = 4,7$ Hz, tienil), 7,75 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, Ar), 7,55 (d, 1H, $J = 3,1$ Hz, tienil), 7,48 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, Ar), 7,17-7,15 (m, 1H, tienil), 5,91 (dd, 1H, $J_{xa} = 2,4$ Hz, $J_{xb} = 11,0$ Hz, H_x), 4,15 (dd, 1H, $J_{bx} = 11,3$ Hz, $J_{ba} = 17,8$ Hz, H_b), 3,40 (dd, 1H, $J_{ax} = 2,8$ Hz, $J_{ab} = 17,9$ Hz, H_a); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 153,0, 152,9, 143,8 (q, $J_{CF} = 1,3$ Hz), 132,4, 131,9, 131,2, 128,6 (q, $J_{CF} = 32,0$ Hz), 128,0, 126,2, 125,7 (q, $J_{CF} = 3,7$ Hz), 123,9 (q, $J_{CF} = 272,2$ Hz), 59,8, 44,1; CG/MS [m/z (%): 294 (100), 295 (16), 265 (9), 44 (8). EMAR: m/z $[MH]^+$ calcd. para $C_{15}H_{14}F_3N_4S$: 339,0891, exp.: 339,0881.

Cloridrato de 5-(4-metoxifenil)-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1H-amidinopirazol (2h): 86%; sólido amarelado; IV (KBr): ν (cm^{-1}) 3334-3132, 1611, 1438, 1243, 839; RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 7,85 (s, 4H, $C(NH_2)_2$), 7,85 (dd, 1H, $J = 0,8$ Hz, $J = 4,9$ Hz, tienil), 7,56 (dd, 1H, $J = 0,9$ Hz, $J = 3,6$ Hz, tienil), 7,19 (dd, 1H, $J = 3,8$ Hz, $J = 5,0$ Hz, tienil), 7,15 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, Ar), 6,95 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, Ar), 5,83 (dd, 1H, $J = 2,9$ Hz, $J = 11,1$ Hz, H_x), 4,04 (dd, 1H, $J_{bx} = 11,1$ Hz, $J_{ba} = 17,8$ Hz, H_b), 3,73 (s, 1H, metila) 3,33 (m, 1H, H_a); RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 159,0, 153,1, 152,7, 132,7, 131,9, 131,4, 131,2, 128,1, 126,6, 114,3, 59,8, 55,1, 44,2; EMAR: m/z $[MH]^+$ calcd. para $C_{15}H_{18}N_4OS$: 301.1123, exp.: 301.1132.

Cloridrato de 5-(4-fluorfenil)-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1H-amidinopirazol (2i): 73%; sólido esverdeado, p.f. 243-245°C; IV (KBr): ν (cm^{-1}) 3348-3103, 1596, 1416, 1229, 832; RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 7,93 (s, 4H, $C(NH_2)_2$), 7,85 (dd, 1H, $J = 0,9$ Hz, $J = 5,0$, tienil), 7,56 (m, 1H, tienil), 7,26 (m, 4H, Ar), 7,18 (dd, 1H, $J = 3,7$ Hz, $J = 5,0$ Hz, tienil), 7,18-7,16 (m, 1H, tienil), 5,95 (dd, 1H, $J = 2,6$ Hz, $J = 10,8$ Hz, H_x), 4,08 (dd, 1H, $J_{bx} = 11,2$ Hz, $J_{ba} = 17,8$ Hz, H_b), 3,37 (dd, 1H, $J_{ax} = 2,9$ Hz, $J_{ba} = 17,6$ Hz, H_a); RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 153,0, 152,7, 135,7, 132,6, 132,0, 131,2, 128,1, 127,6, 127,5, 115,9, 59,7, 44,2; CG/MS [m/z (%): 246 (100), 245 (37), 151 (16), 44 (11); EMAR: m/z $[MH]^+$ calcd. para $C_{14}H_{14}FN_4S$: 289,0923, exp.: 289,0936.

Cloridrato de 5-(4-clorofenil)-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1H-amidinopirazol (2j): 71%; sólido amarelado; p.f. 257-260°C; IV (KBr): ν (cm^{-1}) 3070, 1606, 1425, 825; RMN 1H

(400 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 7,96 (s, 4H, C(NH₂)₂), 7,83 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz, tienil), 7,55 (d, 1H, $J = 3,1$ Hz, tienil), 7,45 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, Ar), 7,25 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, Ar), 7,18-7,16 (m, 1H, tienil), 5,98 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H_x), 4,06 (dd, 1H, $J_{bx} = 11,2$ Hz, $J_{ba} = 17,7$ Hz, H_b), 3,31 (d, 1H, $J_{ax} = 3,2$ Hz, H_a); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 153,6, 152,8, 138,4, 138,8, 132,5, 131,9, 131,3, 128,9, 128,1, 127,3, 59,7, 44,2; CG/MS [m/z (%)]: 262 (M, 100), 264 (M+1), 151 (22), 44 (15). EMAR: m/z [MH]⁺ calcd. para C₁₄H₁₄ClN₄S: 305,0628, exp.: 305,0629.

Cloridrato de 5-(4-bromofenil)-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1H-amidinopirazol (2k): 75%; sólido amarelado, p.f. 265-266°C; IV (KBr): ν (cm⁻¹) 3269, 3190, 3103, 1611, 1430; RMN ¹H (400 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 7,99 (s, 4H, C(NH₂)₂), 7,83 (d, 1H, $J = 5,0$ Hz, tienil), 7,58 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, Ar), 7,55 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, tienil), 7,20 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, Ar), 7,18-7,16 (m, 1H, tienil), 6,02 (dd, 1H, $J_{xa} = 2,6$ Hz, $J_{xb} = 11,0$ Hz, H_x), 4,09 (dd, 1H, $J_{bx} = 11,3$ Hz, $J_{ba} = 17,9$ Hz, H_b), 3,36 (dd, 1H, $J = 2,7_{ax}$ Hz, $J_{ab} = 17,9$ Hz, H_a); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 152,9, 152,8, 138,7, 132,4, 131,8, 131,7, 131,1, 128,0, 127,5, 121,2, 59,6, 44,0; CG/MS [m/z (%)]: 308 (100), 309 (19), 307 (57), 306 (96), 305 (28), 151 (27), 44 (15). EMAR: m/z [MH]⁺ calcd. para C₁₄H₁₅N₄SBr: 349.0122, exp.: 349.0172.

Cloridrato de 5-(2,4-diclorofenil)-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1H-amidinopirazol (2l): 66%; sólido amarelado, p.f. 290-293°C; IV (KBr): ν (cm⁻¹) 3334, 3175, 3103, 1611, 1423, 825; RMN ¹H (400 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 8,10 (s, 4H, C(NH₂)₂), 7,84 (d, 1H, $J = 4,7$ Hz, tienil), 7,75 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, Ar), 7,55 (d, 1H, $J = 3,1$ Hz, tienil), 7,48 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, Ar), 7,17-7,15 (m, 1H, tienil), 5,91 (dd, 1H, $J_{xa} = 2,4$ Hz, $J_{xb} = 11,0$ Hz, H_x), 4,15 (dd, 1H, $J_{bx} = 11,3$ Hz, $J_{ba} = 17,8$ Hz, H_b), 3,40 (dd, 1H, $J_{ax} = 2,8$ Hz, $J_{ab} = 17,9$ Hz, H_a); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 153,0, 152,8, 141,9, 132,4, 131,8, 131,2, 131,1, 130,9, 128,3, 128,0, 124,0, 121,8, 59,5, 44,1; CG/MS [m/z (%)]: 294 (100), 151 (22). EMAR: m/z [MH]⁺ calcd. para C₁₄H₁₄Cl₂N₄S: 339.0238, exp.: 339.0237.

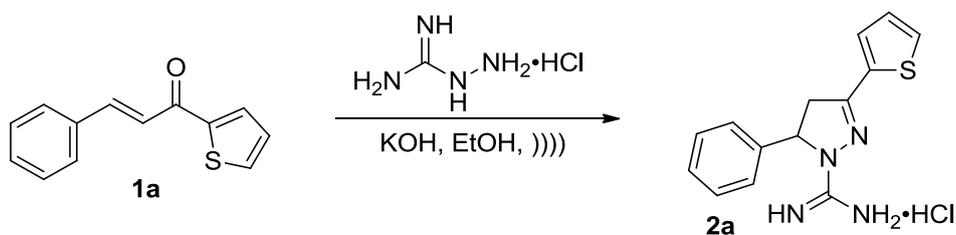
Cloridrato de 5-(3,4-dimetoxifenil)-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1H-amidinopirazol (2m): 83%; sólido amarelo, p.f. 287-291°C. IV (KBr): ν (cm⁻¹) 3298, 3139, 2830, 1618, 1430; RMN ¹H (500 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 7,85 (s, 1H, C(NH₂)₂), 7,85 (dd, 1H, $J = 0,9$ Hz, $J = 5,0$ Hz, Ar), 7,56 (dd, 1H, $J = 0,9$ Hz, $J = 3,6$ Hz, tienil), 7,19 (dd, 1H, $J = 3,8$ Hz, $J = 5,0$ Hz, tienil), 6,95 (d, 1H, $J = 6,5$ Hz, Ar), 6,94 (s, 1H, Ar), 6,66 (dd, 1H, $J = 2,0$ Hz, $J = 8,3$ Hz, tienil), 5,81 (dd, 1H, $J_{xa} = 3,2$ Hz, $J_{xb} = 11,1$ Hz, H_x), 4,05 (dd, 1H, $J_{bx} = 11,1$ Hz, $J_{ba} = 17,8$ Hz, H_b), 3,74 (s, 1H, Ar-OCH₃), 3,72 (s, 1H, Ar-OCH₃), 3,38 (dd,

^1H , $J_{ax} = 3,2$ Hz, $J_{ab} = 17,8$ Hz, H_a); RMN ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ ppm 153,1, 152,8, 148,7, 148,6, 132,7, 131,8, 131,7, 131,1, 128,1, 116,7, 112,1, 110,0, 60,1, 55,5, 55,4, 44,2; EMAR: m/z $[\text{MH}]^+$ calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$: 331.1229, exp.: 331.1293.

Cloridrato de 5-(3,4,5-trimetoxifenil)-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1H-aminopirazol (**2n**): 72%; sólido amarelo, p.f. 303-304; IV (KBr): ν (cm^{-1}) 3341, 3125, 2923, 2837, 1618, 1423, 1127; EMAR: m/z $[\text{MH}]^+$ calcd. para $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$: 361.1334, exp.: 361.1342.

3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A rota sintética empregada na síntese dos compostos **2a-n** foi a ciclocondensação dos precursores 3-aryl-1-(tien-2-il)-prop-2-en-1-onas **1a-n** com cloridrato de aminoguanidina na presença de hidróxido de potássio (**Esquema 1**). O etanol foi o solvente escolhido, pois a literatura o aponta como meio adequado para a realização da reação entre chalconas e cloridrato aminoguanidina ^[16]. Além disso, o etanol satisfaz alguns requisitos ambientais importantes, tais como ser um produto obtido de fontes renováveis, ser menos nocivo à saúde humana e não causar efeito prejudicial aos ambientes aquáticos ^[12,13]. Para a otimização das condições de obtenção dos produtos de interesse, foram realizados experimentos utilizando como modelo a reação da 3-aryl-1-(tien-2-il)-prop-2-en-1-ona (**1a**) com aminoguanidina. Inicialmente, os experimentos foram realizados sob irradiação ultrassônica com a variação da proporção de **1a**/aminoguanidina/base (**Tabela 1**).



Esquema 1

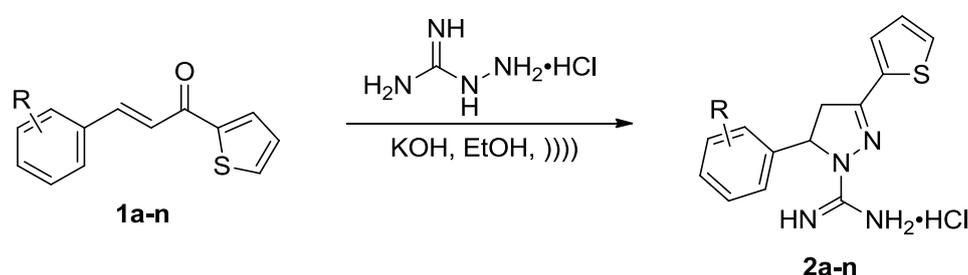
Tabela 1. Otimização da proporção dos reagentes para a obtenção do produto **2a**.

Experimento	Proporção 1a/aminoguanidina/KOH	Tempo (min)	Rendimento (%) ^a
1	1:1:1	30	57
2	1:2:2	30	85
3	1:3:3	30	66
4	1:4:4	30	75

^aRendimento isolado.

Como pode ser observado na **Tabela 1**, o melhor rendimento do produto isolado foi obtido quando a reação de ciclocondensação do substrato **1a** foi realizada com 2 equivalentes de cloridrato de aminoguanidina na presença de 2 equivalentes de hidróxido de potássio, sob irradiação ultrassônica por 30 minutos.

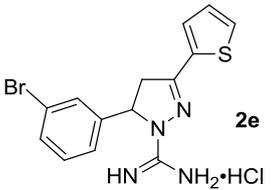
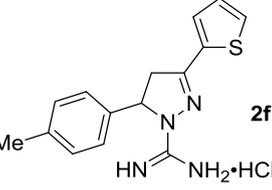
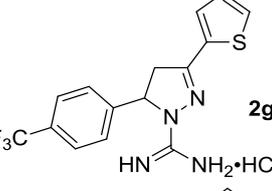
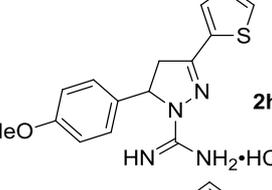
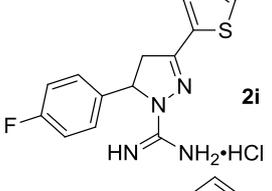
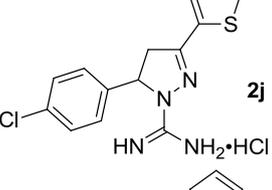
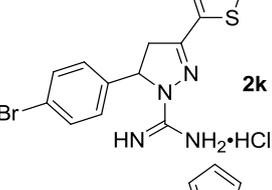
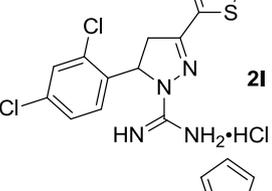
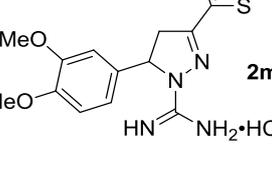
Posteriormente, a fim de testar o alcance e as limitações desta metodologia, foram realizadas reações de ciclocondensação dos substratos **1** contendo vários padrões de substituição na fenila (**Esquema 2**). O tempo ideal para cada experimento foi determinado pelo consumo das chalconas **1a-n** por cromatografia em camada delgada. A **Tabela 2** apresenta a estrutura dos compostos sintetizados bem como dados experimentais selecionados.

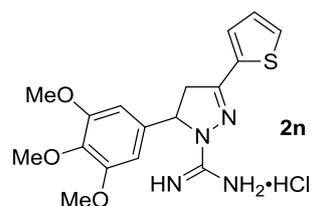


Esquema 2

Tabela 2. Dados experimentais dos cloridratos de 5-aryl-3-(tien-2-il)-4,5-diidro-1H-amidinopirazóis **2a-n**.

Experimento	Produto	Ponto de fusão (°C)	Tempo (min)	Rendimento (%) ^a
1		265-268	20	95
2		287-288	25	80
3		285-288	30	70
4		288-291	15	65

5	 <chem>BrC1=CC=C(C=C1)C2=CN(C=C2S)C3=NC(=N3)C(=N)N</chem> 2e	298-300	30	70
6	 <chem>Cc1ccc(cc1)C2=CN(C=C2S)C3=NC(=N3)C(=N)N</chem> 2f	278-280	35	80
7	 <chem>C(F)(F)Fc1ccc(cc1)C2=CN(C=C2S)C3=NC(=N3)C(=N)N</chem> 2g	295-298	15	62
8	 <chem>COC1=CC=C(C=C1)C2=CN(C=C2S)C3=NC(=N3)C(=N)N</chem> 2h	208-210	25	86
9	 <chem>Fc1ccc(cc1)C2=CN(C=C2S)C3=NC(=N3)C(=N)N</chem> 2i	243-245	30	73
10	 <chem>Clc1ccc(cc1)C2=CN(C=C2S)C3=NC(=N3)C(=N)N</chem> 2j	257-260	30	71
11	 <chem>BrC1=CC=C(C=C1)C2=CN(C=C2S)C3=NC(=N3)C(=N)N</chem> 2k	265-266	30	75
12	 <chem>Clc1cc(Cl)ccc1C2=CN(C=C2S)C3=NC(=N3)C(=N)N</chem> 2l	290-293	30	66
13	 <chem>COC1=CC(OC)=CC=C1C2=CN(C=C2S)C3=NC(=N3)C(=N)N</chem> 2m	287-291	25	83

14

303-304

30

72

^aRendimento isolado.

Neste sentido, através da análise dos tempos necessários para ocorrer o consumo dos materiais de partida **1a-n**, determinados por cromatografia em camada delgada e mostrados na **Tabela 2**, foi verificada a influência dos substituintes das chalconas **1a-n** na reatividade frente à reação de ciclocondensação. De modo geral, foi observado que a presença de grupos retiradores de elétrons na fenila da chalcona permitiu o seu consumo em tempos menores (Experimentos 4 e 7, **Tabela 2**). Nestes casos, tentativas de melhorar os rendimentos através do aumento do tempo da reação não surtiram efeito positivo uma vez que, com o prolongamento do tempo, aconteceu o escurecimento da mistura e os produtos **2d** e **2g** foram obtidos em rendimentos menores.

Nas demais 3-aryl-1-(thien-2-yl)-prop-2-en-1-onas estão presentes grupos com efeito doadores de elétrons, nesses materiais de partida os tempos foram prolongados a fim de melhorar os rendimentos dos 5-aryl-3-(thien-2-yl)-4,5-diidro-1H-amidinopirazóis. Nesses casos, os tempos de reação chegaram a 35 minutos e os rendimentos ficaram acima de 70%.

A síntese promovida por ultrassom se demonstrou bastante eficaz, à medida que as reações são realizadas em curtos tempos, e a utilização de um solvente ambientalmente correto, favorecendo ainda mais as relações com a química verde, colaborando com o meio ambiente na economia de energia, na emissão de solventes voláteis na atmosfera e na geração de resíduos tóxicos.

A série de pirazóis obtida foi avaliada quanto ao seu potencial antibacteriano através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A **Tabela 3** apresenta os dados da CIM, frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas. De modo geral, os pirazóis apresentaram CIM mais baixas para bactérias gram-positivas, destacando as moléculas **2b**, **2d**, **2f**, **2g**, **2h**, **2j** e **2m** que apresentaram uma menor concentração para inibir o crescimento dos microrganismos.

O compostos **2c**, **2d**, **2f**, **2g**, **2h**, **2i**, **2j**, **2k** e **2n** foram seletivos para bactérias gram-positivas, sendo que as amostras **2c**, **2g**, **2h** e **2n** obtiveram uma grande diferença de concentração para a inibição do crescimento das cepas. O perfil químico de

seletividade contra bactérias gram-positivas é um fenômeno geral observado entre muitos antibióticos padrões.

Após a determinação da CIM, foi verificada a sensibilidade *in vitro* das bactérias. A **Tabela 4** apresenta os resultados do teste de sensibilidade realizado a partir das CIM encontradas na **Tabela 3**. Verifica-se que o composto pode ter uma ação bactericida ou bacteriostática, podendo assim a bactéria ser sensível às moléculas analisadas. Quando há sensibilidade, o composto tem uma ação bactericida, ou seja, a concentração encontrada na CIM eliminou os microrganismos. Há também a possibilidade de uma ação intermediária, onde a bactéria nos pocinhos sofre apenas uma paralisação do seu metabolismo, podendo retomar o seu processo de reprodução ao encontrar uma nova fonte ótima de nutrientes. Essa ação intermediária da amostra sobre a bactéria pode ser denominada como uma atividade bacteriostática.

Analisando os compostos que tiveram ação bactericida destacam-se os compostos **2a**, **2b**, **2l** e **2n**. Eles apresentaram elevada seletividade, desenvolvendo uma ação bactericida direcionada a apenas uma bactéria. O composto **2a** teve ação seletiva a bactéria *Staphylococcus aureus* em uma concentração de 46,87 µg/mL, nessa mesma concentração o composto **2b** apresentou atividade contra a cepa *Pseudomonas aeruginosa*. Notou-se que o composto **2l** e **2n** também obtiveram uma seletividade para as bactérias gram-negativas, sendo que o **2l** teve uma ação contra a *Escherichia coli* e o **2n** contra a *Pseudomonas aerogenosa*. Observa-se também que o único composto que não obteve seletividade foi o **2c**, porém teve uma ação bactericida para todas as bactérias testadas. Em geral, as bactérias gram-negativas demonstram ser mais sensíveis aos compostos analisados. ^[17] Em nível de comparação, foram testados quatro antibióticos padrões que possuem excelentes concentrações inibitórias e observou-se que apenas alguns 4,5-diidropirazóis obtiveram uma melhor CIM em relação aos antibióticos. Dentre eles destacaram-se o **2c**, **2d**, **2h**, **2l** e **2m**. Os melhores valores encontrados foram todos relacionados a bactéria *Enterococcus faecalis*, destacando o composto **2h** com uma CIM de 0,046 mg/mL.

Tabela 3: Concentração inibitória mínima para os compostos **2a-d,f-n** e antibióticos padrão contra microrganismos padrão.

Composto	CIM (µg/mL)				
	<i>Bactérias gram-positivas</i>		<i>Bactérias gram-negativas</i>		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 37664	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	<i>Salmonella sp.</i> ATCC 13076	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomoneus aeruginosa</i> ATCC 27853
2a	46,87	46,87	187,50	750,00	750,00
2b	187,50	11,72	750,00	750,00	3000,00
2c	46,87	0,73	3000,00	3000,00	187,50
2d	11,72	0,73	187,50	187,50	3000,00
2f	11,72	187,50	46,87	187,50	187,50
2g	46,87	11,72	46,87	46,87	46,87
2h	11,72	0,046	3000,00	750,00	750,00
2i	11,72	2,93	3000,00	187,50	187,50
2j	46,87	750,00	187,50	187,50	187,50
2k	11,72	11,72	46,87	46,87	46,87
2l	46,87	0,73	3000,00	46,87	46,87
2m	11,72	0,18	46,87	187,50	750,00
2n	750,00	750,00	3000,00	3000,00	3000,00
Gentamicina	2,93	-	2,93	2,93	2,93
Amicacina	11,72	-	11,72	11,72	11,72
Ciprofloxacina	0,73	2,93	0,73	0,73	0,73
Norfloxacina	2,93	2,93	-	2,93	2,93

Tabela 4: Teste de sensibilidade *in vitro* das CIM encontradas para os compostos **2a-d,f-n** e antibióticos padrão contra microrganismos padrão.

Composto	Bactérias				
	<i>Bactérias gram-positivas</i>		<i>Bactérias gram-negativas</i>		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 37664	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	<i>Salmonella sp.</i> ATCC 13076	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomoneus aeruginosa</i> ATCC 27853
2a	S	I	I	I	I
2b	I	I	I	I	S
2c	S	I	S	S	S
2d	I	I	S	S	S
2f	I	S	I	S	S
2g	I	I	I	I	S
2h	I	I	S	S	S
2i	I	I	S	I	I
2j	I	I	S	S	S
2k	I	I	S	I	S
2l	S	I	S	S	S
2m	I	I	I	S	I
2n	I	I	I	S	I
Gentamicina	S	-	S	S	S
Amicacina	S	-	S	S	S
Ciprofloxacina	S	I	S	S	S
Norfloxacina	S	S	-	S	S

I = Intermediário – Bacteriostático

S = Sensível – Bactericida

4 CONCLUSÃO

Observou-se que o ultrassom foi eficiente na síntese dos compostos 4,5-diidro-1*H*-pirazóis melhorando assim os tempos de reação e rendimentos obtidos pelas metodologias clássicas e gerando resultados satisfatórios. A utilização do etanol como meio reacional evita o uso de solventes perigosos e reduz os riscos inerentes à poluição do meio ambiente evitando ao máximo a liberação de substâncias tóxicas. Foi possível concluir também que os resultados dos testes antibacterianos são preliminares, porém, de extrema importância para a realização de futuros testes que poderão averiguar mais profundamente o real potencial dos compostos.

5 AGRADECIMENTOS

UFGD, CNPq, CAPES e FUNDECT.

REFERÊNCIAS

- [1] MELO, J. O. F.; Donnici, C. L.; Augusti, R.; Ferreira, V. F.; Souza, M. C. B. V.; Ferreira, M. L. G.; Cunha, F. A. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, v. 29, p. 569, 2006.
- [2] SOUZA, M. V. N.; Ferreira, S. B.; Mendonça, J. S.; Costa, M.; Rebello, R. Métodos de obtenção e aplicações sintéticas de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v. 28, p. 77, 2005.
- [3] SILVA, F. A. N.; Galluzzi, M. P.; Albuquerque, B.; Pizzuti, L.; Gressler, V.; Rivelli, D. P. Ultrasound irradiation promoted large-scale preparation in aqueous media and antioxidant activity of azoles. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 6, p. 323, 2009.
- [4] PIZZUTI, L.; Quina, F. H.; Souza, S. P.; Rosales, P. F.; Siqueira, G. M.; Rivelli, D. P. Antioxidant capacity of 2-(3,5-diaryl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazoles. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 7, p. 657, 2010.
- [5] FLORES, A. F. C.; Pizzuti, L.; Piovesan, L. A.; Flores, D. C.; Malavolta, J. L.; Pereira, C. M. P. Efficient synthesis of new 1-alkyl(aryl)-5-(3,3,3-trihalo-2-oxopropylidene)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-ones. **Tetrahedron Letters**, v. 51, p. 4908, 2010.
- [6] GALLO, R. D. C.; Ferreira, I. M.; Casagrande, G. A.; Pizzuti, L.; Oliveira-Silva, D.; Raminelli, C. Efficient and eco-friendly synthesis of iodinated aromatic building blocks promoted by iodine and hydrogen peroxide in water: a mechanistic investigation by mass spectrometry. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 5372, 2012.

- [7] PIZZUTI, L.; Piovesan, L. A.; Flores, A. F. C.; Quina, F. H.; Pereira, C. M. P. Environmentally friendly sonocatalysis promoted preparation of 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, p. 728, 2009.
- [8] VENZKE, D.; Flores, A. F. C.; Quina, F. H.; Pizzuti, L.; Pereira, C. M. P. Ultrasound promoted greener synthesis of 2-(3,5-diaryl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazoles. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 370, 2011.
- [9] MARTINS, M. A. P.; Rossatto, M.; Prola, L. D. T.; Pizzuti, L.; Moreira, D. N.; Campos, P. T.; Bonacorso, H. G. Ultrasound promoted the synthesis of *N*-propargy licbenaminones. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 227, 2012.
- [10] DE VASCONCELOS, A.; Oliveira, P. S.; Ritter, M.; Freitag, R. A.; Romano, R. L.; Quina, F. H.; Pizzuti, P.; Pereira, C. M. P.; Stefanello, F. M.; Barschak, A. G. Antioxidant capacity and environmentally friendly synthesis of dihydropyrimidin-(2*H*)-ones promoted by naturally occurring organic acids. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, p. 26, p. 155, 2012.
- [11] SOUZA, M. V. N. **Estudo da síntese orgânica: baseada em substâncias bioativas**. Editora Átomo, 2010.
- [12] PIZZUTI, L.; Franco, M. S. F.; Flores, A. F. C.; Quina, F. H.; Pereira, C. M. P. **Recent Advances in the Ultrasound-Assisted Synthesis of Azoles: Green Chemistry – Environmentally Benign Approaches**. InTech, Rijeka, 2012. pg 81-102.
- [13] Machado, A. A. S. C. Dos primeiros aos segundos doze princípios da química verde. **Química Nova**, v. 35, p. 1250, 2012.
- [14] CRAVOTTO, G.; Cintas, P. Power ultrasound in organic synthesis: moving cavitation chemistry from academia to innovative and large-scale applications. **Chemical Society Reviews**, v. 35, p. 180, 2006.
- [15] VANANGAMUDI, G.; Subramanian, M.; Thirunarayanan, G. Synthesis, spectral linearity, antimicrobial, antioxidant and insect antifeedant activities of some 2,5-dimethyl-3-thienyl chalcones. **Arabian Journal of Chemistry**. In Press, Corrected Proof. 2013.
- [16] Pizzuti, L.; Martins, P. L. G.; Ribeiro, B.; Quina, F. H.; Pinto, E.; Flores, A. F. C.; Pereira, C. M. P. Efficient sonochemical synthesis of novel 3,5-diaryl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole-carboximidamides. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, p. 34, 2010.
- [17] SCHLEMPER, S. R. M.; Cordeiro, F.; Block, L. Ç.; Cechinel Filho, V. Atividade de frações semipurificadas e compostos puros de *Wendelia paludosa*. **Alcance**, v. 5, p. 14-18, 1998.