

## **1. INTRODUZIONE**

Negli ultimi decenni, nel campo della Chimica Farmaceutica, sta emergendo sempre più il bisogno di sintetizzare nuove molecole organiche, al fine di facilitare i processi di identificazione e di ottimizzazione di nuovi composti biologicamente attivi. La chimica combinatoriale, nell'ambito della chimica farmaceutica, si è sviluppata infatti per venire incontro alle crescenti richieste di molecole organiche per la scoperta di nuovi farmaci (drug discovery). In questo contesto, la velocità di reazione si propone come requisito essenziale.

I metodi tradizionali di sintesi organica si sono rivelati, col tempo, troppo lenti per soddisfare tali richieste. Allo scopo di ridurre drasticamente i tempi di reazione, gli straordinari progressi della sintesi organica rendono, di giorno in giorno, disponibili sistemi reattivi completamente nuovi ed in qualche caso addirittura rivoluzionari in relazione alle conoscenze della chimica classica. Ciò rende sempre più accessibile la progettazione e la realizzazione di architetture molecolari complesse quali, ad esempio, quelle che caratterizzano le molecole d'interesse biologico.

Fra i vari settori sintetici che, negli anni più recenti, hanno subito un forte impulso dall'innovazione ed una conseguente crescita d'interesse e di attenzione da parte dei chimici, si colloca sicuramente il riscaldamento di solidi e liquidi mediante irraggiamento di potenza a *microonde o riscaldamento dielettrico o elettromagnetico a microonde*.

Sebbene i forni a microonde domestici siano stati largamente utilizzati sin dagli anni '70, la prima notizia che questa fonte di energia fos-

se adatta per accelerare le reazioni organiche è apparsa solo nel 1986 [1], a causa dei pericoli associati all'infiammabilità dei solventi organici e della mancanza di sistemi atti a controllare tali rischi.

Superata ormai da tempo la fase pionieristica, nella quale taluni laboratori tentavano di utilizzare forni a microonde da cucina per le mineralizzazioni (con i conseguenti problemi di riproducibilità e sicurezza), la strumentazione che impiega le microonde ha raggiunto un elevatissimo livello tecnologico ed ha ampliato moltissimo i campi applicativi, dalla mineralizzazione dei campioni per le analisi elementari, alle misure di umidità, per arrivare poi al campo delle estrazioni di matrici complesse con solventi per le analisi organiche e, infine, alle reazioni di sintesi organica e metallorganica.

All'interno della stessa sintesi organica, i livelli applicativi si sono moltiplicati, tant'è che oggi può essere condotta mediante sistemi a riflusso, con sistemi pressurizzati o addirittura senza solvente, riducendo conseguentemente l'inquinamento ambientale e consentendo la definizione di "green chemistry".

Lo schema di Tabella 1 riassume raggruppati per classi di sistemi organici sintetici, biologici, inorganici e misti, i principali campi applicativi dell'irraggiamento di potenza a microonde.

**Tabella 1** – Principali campi di applicazione del riscaldamento a microonde.

<b>Sistema trattato</b>	<b>Processi promossi</b>	<b>Vantaggi<sup>a</sup></b>	<b>Grado di sviluppo attuale</b>
<b><i>Sistemi organici sintetici</i></b>			
Sintesi organiche in fase liquida e solida	Processi chimici	Velocità, incremento di resa	Laboratorio
Curing di resine termoindurenti (e relativi compositi)	Fluidificazione, processi chimici di curing e post-curing, promozione di adesione resina/fibra	Velocità dei processi chimici, rapidità, omogeneità e “profondità” del riscaldamento, superiore $T_g^b$ , migliori proprietà meccaniche dei compositi	Laboratorio/pilota
Vulcanizzazione di tubi e profilati in gomma	Processi chimici di vulcanizzazione	Velocità di vulcanizzazione	Industriale (impiego diffuso)
↳ Fibre e filati tessili	Essiccazione, fissaggio chimico dei coloranti	Velocità	Industriale
Legno, carta, cartone e pellami	Essiccazione, incollatura	Velocità	Industriale
<b><i>Sistemi biologici</i></b>			
Prodotti alimentari	Essiccazione, cottura sterilizzazione, “maturazione”	Velocità	Industriale (impiego estensivo)
Ipertermia medica	Effetti biochimici e biofisici diversi e complessi	Efficacia terapeutica	Impiego terapeutico corrente
Rifiuti biologici	Sterilizzazione, denaturazione chimica	Velocità	Sperimentale
<b><i>Sistemi inorganici</i></b>			
Materiali ceramici	Solidificazione, essiccazione, cottura (trasformazioni fisiche e chimiche), sinterizzazione, saldatura	Velocità, riscaldamento rapido e localizzato (per saldatura), superiore densità	Industriale/pilota

continua tabella 1

Sintesi inorganiche allo stato solido	Fusione, processi chimici	Velocità	Laboratorio
Sintesi di nanopolveri minerali da plasmi gassosi <sup>c</sup>	Processi chimici	Velocità, inferiori temperature	Laboratorio/pilota
Materiali ceramici speciali e composti metallo-ceramici	Sinterizzazione	Velocità, superiore densità	Laboratorio/pilota
Plasma-etching di wafer di semiconduttori	Vaporizzazione localizzata	Precisione di etching	Pilota/industriale
CVD <sup>d</sup> di film di diamante, diamone-like carbon e SiN da plasmi gassosi <sup>c</sup>	Processi chimici e fisici	Velocità, controllo della morfologia	Pilota/industriale
Rifiuti radioattivi	Fusione, vetrificazione, sinterizzazione	Efficacia generale di processo	Pilota
Vetri, ceramiche e materiali vetro-ceramici da processi sol-gel	Gelificazione, disidratazione, densificazione	Velocità	Laboratorio/pilota
<b><i>Sistemi misti organici/inorganici</i></b>			
Sintesi organiche fondamentali in fase gas (su letti catalitici riscaldati a microonde)	Processi chimici	Velocità, efficiente controllo di processo, resa di processo	Laboratorio/pilota
Rigenerazione di carboni attivi	Vaporizzazione di chemical adsorbiti	Velocità, grado di rigenerazione	Laboratorio/pilota

<sup>a</sup> ottenuti attraverso l'impiego di trattamenti a microonde, rispetto ai corrispondenti processi termici convenzionali; <sup>b</sup> temperatura di transizione vetrosa; <sup>c</sup> generati e alimentati da campi elettromagnetici a microonde di elevata intensità; <sup>d</sup> Chemical Vapor Deposition

I risultati, sorprendenti per rapidità, resa, selettività, ottenuti nell'impiego delle microonde negli svariati processi su indicati, hanno fatto parlare in qualche caso di "magia molecolare", permettendo di annoverare il riscaldamento a microonde tra i processi utili ad una chimica innovativa (green chemistry). Tra le applicazioni che l'irraggiamento mediante microonde consente, un ruolo di primo piano spetta alla sintesi senza solvente, una tecnica innovativa che prevede la sostituzione dei solventi con dei substrati solidi, come argille, allumine, bentonite, miche, fluoruri alcalini, etc., dotati talvolta anch'essi di caratteristiche acide o basiche, che favoriscono la reattività dei gruppi chimici e sono allontanabili dalla miscela di reazione attraverso semplici procedimenti di estrazione. Tali supporti solidi vengono mescolati con i reattivi allo stato solido e sottoposti ad irraggiamento mediante microonde.

Il maggiore vantaggio di tale tecnica è rappresentato dal basso consumo di solventi, che consente la comune definizione di "green chemistry".

Come evidenziato in Tabella 2, le microonde sono radiazioni elettromagnetiche non ionizzanti che coprono l'intervallo nominale di fre-

quenza da 300 MHz a 300 GHz, immediatamente superiore, cioè, a quello da 3 kHz a 300 MHz delle radioonde.

**Tabella 2** – Radioonde e microonde nell’ambito dello spettro delle radiazioni elettromagnetiche

<b>Banda</b>	<b>Frequenza</b>	<b>Energia del fotone</b>
Radioonde	3 kHz ÷ 300 MHz	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$ eV
Microonde	300 MHz ÷ 300 GHz	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-3}$ eV
Onde micrometriche	300 GHz ÷ $3 \times 10^4$ GHz	$1 \times 10^{-3} - 0,1$ eV
Lontano IR	$3 \times 10^4$ ÷ $3 \times 10^5$ GHz	0,1 - 1 eV
Vicino IR-vicino UV	$3 \times 10^5$ ÷ $3 \times 10^6$ GHz	1 – 10 eV
Lontano UV	$3 \times 10^6$ ÷ $3 \times 10^7$ GHz	10 – 100 eV
Raggi X “morbidi”	$3 \times 10^7$ ÷ $3 \times 10^9$ GHz	100 eV – 10 keV
Raggi X “duri” - $\gamma$ “duri”	$3 \times 10^9$ ÷ $3 \times 10^{11}$ GHz	10 keV – 1 MeV
Raggi $\gamma$ “duri” - $\gamma$ “cosmici”	$3 \times 10^{11}$ ÷ $3 \times 10^{13}$ GHz	1 – 100 MeV

Come schematizzato in Tabella 3, queste radiazioni sono convenzionalmente classificate nell’ambito dello spettro elettromagnetico per decenni di frequenza: Very –Low, Low, Medium, High e rispettivamente Very-High Frequencies per le radioonde; Ultra-High, Super-High ed Extremely-High Frequencies per le microonde.

**Tabella 3** – Radioonde e microonde: bande di frequenza e frequenze ISM

Bande	Intervalli di frequenza	Frequenza ISM
Radioonde		
VLF	3 ÷ 30 kHz	
LF	30 ÷ 300 kHz	
MF	300 ÷ 3.000 kHz	
HF	3 ÷ 30 MHz	13,560±0,007 MHz 27,120±0,163 MHz
VHF	30 ÷ 300 MHz	40,680±0,020 MHz
Microonde		
UHF	300 ÷ 3.000 MHz	896±10 MHz (UK) 915±13 MHz (Americhe) 2,450±50 MHz
SHF	3 ÷ 30 MHz	5,800±0,075 GHz 24,125±0,125 GHz
EHF	30 ÷ 300 MHz	

Le microonde sono caratterizzate da livelli di energia del fotone ( $h\nu = 1 \times 10^{-6} \div 1 \times 10^{-3}$  eV) inferiori di diversi ordini di grandezza alle energie di dissociazione dei legami chimici covalenti, ionici e a idrogeno ( $1 \div 15$  eV), e persino delle pur deboli interazioni intra e inter-molecolari come quelle dipolari e di Van der Waals ( $1 \times 10^{-2} \div 1$  eV). Ciò esclude qualsiasi possibilità di intervento diretto delle microonde (e meno ancora delle radiofrequenze, di energia ulteriormente inferiore) sui processi chimici in generale, esercitabile attraverso apertura o indebolimento di legami interatomici o anche solo di deboli attrazioni intermolecolari. Per



tali ragioni, gli effetti delle microonde sui processi chimici, in sistemi liquidi e solidi, non possono che essere connessi, attraverso meccanismi fisici ancora largamente dibattuti, agli energici e rapidi regimi di riscaldamento della materia allo stato condensato da parte di campi elettromagnetici a queste frequenze.

Le microonde utilizzate nelle strumentazioni di laboratorio appartengono alla zona UHF, da 300 a 3000 MHz, e sono in grado di attivare i livelli energetici rotazionali delle molecole. Esse sono assorbite dalle molecole aventi momenti di dipolo non nullo, che aumentano la loro energia e creano dei centri di propagazione del calore in tutte le direzioni del corpo irradiato, con il risultato che il riscaldamento è molto più rapido di quello tradizionale. Delle quattro frequenze permesse per uso domestico o di laboratorio, è in genere utilizzata quella a 2450 MHz, pari ad una lunghezza d'onda di 12,25 cm, che viene assorbita da molecole molto polari, come  $H_2O$ ,  $H_2SO_4$ ,  $HCl$  etc. Pertanto le microonde presentano una possibilità d'impiego per effettuare processi di disidratazione o controllare reazioni chimiche che coinvolgono questi tipi di molecole.

## **2. PRINCIPI FISICI DEL RISCALDAMENTO CON MICROONDE**

Il riscaldamento con microonde si basa sull'assorbimento della loro energia elettromagnetica da parte del campione e, pertanto, non dipende che in modo trascurabile dai fenomeni termici di conduzione, convezione e irraggiamento. La trasformazione dell'energia elettromagnetica in energia termica è indotta da due meccanismi principali: la conduzione ionica e la rotazione dipolare. La conduzione ionica genera calore a causa della resistenza opposta dal mezzo alla migrazione degli ioni nel campo elettromagnetico. In stato di equilibrio, gli ioni positivi sono normalmente circondati da una nuvola di ioni negativi in forma simmetrica. Quando sono sottoposti all'azione di un campo elettrico, per la forza di attrazione sui cationi e anioni da parte dei poli di segno opposto, si possono presentare due effetti di conduzione ionica. Il primo è la distorsione della nuvola ionica, che è dovuta alla parziale separazione delle cariche causata dal campo applicato. Il secondo è l'effetto elettroforetico, o di orientamento, il quale è dovuto all'allineamento preferenziale dei dipoli permanenti da parte del campo applicato. In entrambi i casi, la resistenza opposta dal mezzo alla migrazione degli ioni crea un dispendio di energia sotto forma

di calore. L'energia assorbita dal mezzo dipende dal fattore di dispersione o tangente dielettrica ( $\text{tang } \delta$ ) che si definisce come:

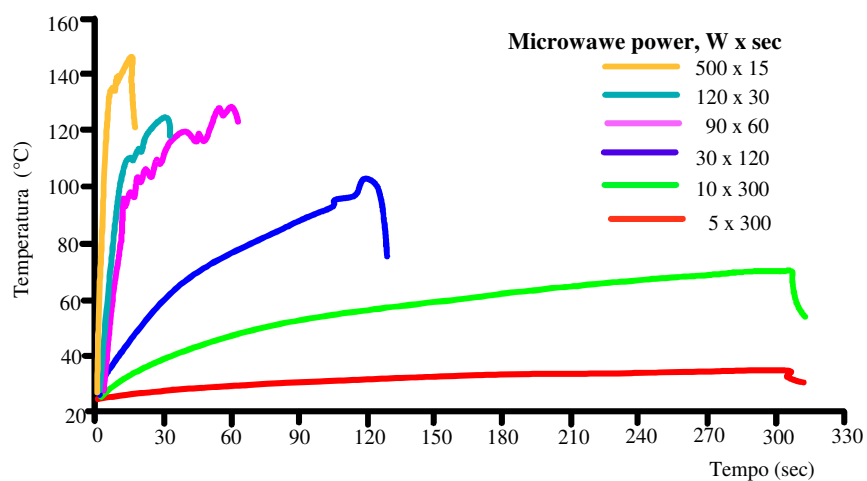
$$\text{tang } \delta = \epsilon''/\epsilon'$$

dove  $\epsilon'$  è la costante dielettrica (o permissività dielettrica) dell'ambiente,  $\epsilon''$  è la perdita dielettrica.

Il fattore di dispersione è una proprietà fisica della sostanza e aumenta con la concentrazione e la temperatura per valori di frequenza costanti. Ciò spiega perché la capacità di assorbimento dell'energia, da parte di una sostanza sottoposta ad un flusso di microonde, provochi l'aumento della sua temperatura.

I solventi polari che hanno un valore elevato di  $\text{tang } \delta$  sono inoltre adatti per le reazioni promosse a microonde. Sfortunatamente, i valori di  $\text{tang } \delta$  della maggior parte dei più comuni solventi organici sono stati determinati a temperatura ambiente. Tra i solventi organici più frequentemente usati, si può notare che il riscaldamento più rapido può essere raggiunto in etanolo ( $\epsilon' = 25$ ) o DMF ( $\epsilon' = 37$ ) piuttosto che in ACN ( $\epsilon' = 38$ ) o acqua ( $\epsilon' = 78$ ), ciò riflette il fatto che una maggiore costante dielettrica, data dal valore  $\epsilon'$ , non sempre trova riscontro in un più rapido incremento di temperatura. Inoltre, la percentuale d'incremento della

temperatura non solo è una funzione di  $\tan \delta$ , ma anche della forza ionica, della capacità di calore specifico, dell'emissività, della geometria, del volume della miscela del campione di reazione e della forza del campo applicato. In pratica, come regola generale, quasi tutti i tipi di trasformazioni organiche che richiedono calore possono essere condotte usando riscaldamento a microonde. Nella Figura 1, sono esemplificati alcuni profili di temperature di reazioni di sostituzione allilica condotte a microonde. Le reazioni sono condotte in acetonitrile ( $T_{eb} = 81-82^{\circ}\text{C}$ ) usando diversi valori di potenza a microonde (W) [2].



**Figura 1**

Da questo grafico, si può notare che ad elevati valori di potenza fa riscontro un più rapido incremento della temperatura.

Il riscaldamento a microonde richiede un maggior controllo di quello tradizionale ed una adeguata conoscenza delle basi fisiche del processo, poiché sia nel caso dei solidi che in quello dei liquidi, si può verificare un brusco salto termico quando si raggiunge un valore di temperatura che è specifico per ogni sostanza. A questo punto (punto di brusca rottura termica), la temperatura può aumentare di 200-300 °C in meno di 1 minuto. Questo fenomeno è più difficile da osservare nei liquidi piuttosto che nei solidi, dato che le costanti fisiche dei primi sono nettamente inferiori [3].

In Tabella 4, vengono riportati i tipi di materiale che sono considerati trasparenti alle microonde e non si riscaldano pur essendo degli isolanti elettrici. Tali materiali vengono abitualmente utilizzati per la costruzione della cavità del forno.

Si può osservare, come il quarzo fuso sia il materiale che determina il più basso consumo di energia, seguito dal teflon, dal polietilene, dal polistirene e dalla ceramica [4].

**Tabella 4** – Fattori di dispersione di materiali (misura a 3000 MHz).

<b>Materiale</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tang <math>\delta</math> (x10)</b>
------------------	--------------------	---------------------------------------

	(°C)	
Acqua	25	1570.0
Quarzo fuso	25	0.6
Ceramica F.66	25	5.5
Porcellana N. 4462	25	11.0
Vetro fosfato	25	46.0
Vetro borosilicato	25	10.6
Plexiglas	27	57.0
Nylon 66	25	128.0
Cloruro di polivinile	20	55.0
Polietilene	25	3.1
Polistirene	25	3.3
Teflon PFA	25	1.5

I vantaggi del riscaldamento a microonde possono essere riassunti

in:

- assenza d'inerzia termica;
- energia termica pulita, riproducibile, facilmente automatizzabile;
- rapidità di riscaldamento;
- azione specifica sui legami polari e sull'entropia del mezzo da riscaldare.

### **3. APPARECCHIATURA PER IL RISCALDAMENTO**

#### **A MICROONDE**

Come per le radio frequenze, la fisica delle microonde si discosta in modo macroscopico da quella più largamente conosciuta, delle radiazioni elettromagnetiche alle frequenze dell'infrarosso e superiori. Le microonde esibiscono, infatti, capacità di risonanza in spazi confinati da pareti riflettenti (metalliche) somiglianti a quelle delle onde sonore. Le basi teoriche e i criteri di funzionamento e ingegnerizzazione dei dispositivi di generazione, trasmissione e applicazione di potenza delle microonde sono quindi del tutto peculiari e non facilmente razionalizzabili.

#### **3.1. Generatori di potenza a microonde:**

E' stata sviluppata una grande varietà di dispositivi di questo tipo (*o tubi a microonde*), con potenze di emissione che vanno dal centinaio di W alle decine di kW, i cui principi costruttivi e di funzionamento sono molto articolati.

Per le microonde di bassa potenza per uso di laboratorio (UHF) vengono largamente impiegati i *tubi magnetron*, tubi elettronici generatori di oscillazioni ad alta frequenza. Il tipo più utilizzato è quello a cavi-

tà multiple, che consiste di due elettrodi cilindrici coassiali. Il sistema è posto in un campo magnetico uniforme con direzione parallela all'asse degli elettrodi, generato da un magnete permanente o da un elettromagnete. Applicando una differenza di potenziale positiva (tensione di alimentazione) tra gli elettrodi, gli elettroni emessi dal catodo sotto l'azione combinata del campo elettrico E e del campo magnetico B tendono a riunirsi in fasci disposti radialmente e a ruotare ad altissima velocità intorno al centro del tubo. Scorrendo di fronte alle fessure delle cavità, essi cedono loro energia e per risonanza oscillano ad alta frequenza, generando le onde elettromagnetiche. Le potenze applicate nei forni attualmente in commercio variano da 300 W a 1600 W e sono controllate dal microprocessore incorporato nello strumento. La potenza massima non viene usata per assicurare una maggiore durata del sistema.

La potenza può essere erogata in modo continuo o pulsato. In genere la potenza viene emessa a impulsi, cioè la piena potenza delle microonde viene erogata ed interrotta secondo il livello di potenza selezionata (per esempio, selezionando il 50% della potenza, la piena potenza sarà generata per il 50% della durata del ciclo). Applicando, invece, l'erogazione iniziale continua a 250 W per alcuni minuti, si favorirebbe



un'ossidazione cauta del campione senza effetti esotermici dirompenti. Nei sistemi più avanzati, dotati di controllo continuo della temperatura nei contenitori di reazione, l'operatore deve solo fissare la potenza massima applicabile, mentre un apposito software modula in continuo la potenza in funzione della temperatura al fine di controllare le reazioni fortemente esotermiche o che escono dal controllo.

### **3.2. Linee di trasmissione**

Le microonde emesse raggiungono la zona dove si trova il campione mediante:

- *guide d'onda*: condotti metallici rigidi cavi, a sezione normalmente rettangolare, per alte potenze;
- *linee bifilari*: conduttori continui paralleli appaiati e reciprocamente distanziati in un dielettrico, per basse potenze;
- *cavi coassiali*: molto versatili, per potenze basse ed alte sino al kW.

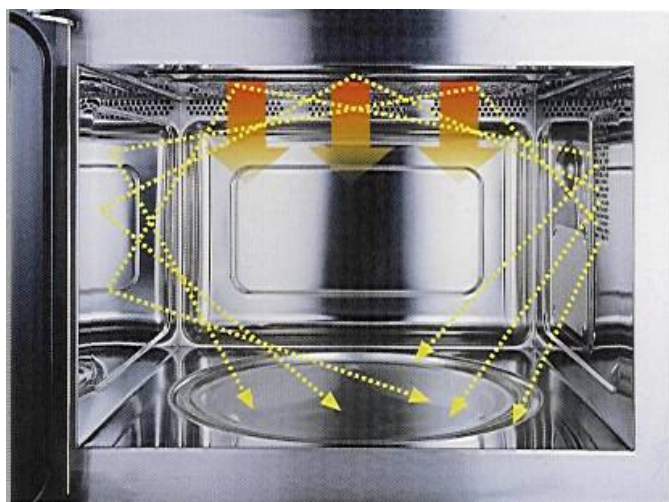
### **3.3. Applicatori di potenza a microonde**

L'irradiazione del campione mediante le microonde può avvenire con modalità molto differenti, anche se gli strumenti commerciali sono basati sul principio delle *cavità risonanti*.

Le cavità risonanti sono contenitori a pareti metalliche in cui le microonde provenienti dalle linee di trasmissione danno luogo ad un regime di onde stazionarie.

Esistono diversi tipi di cavità risonanti:

- a) *Cavità risonanti multi-modali*: di geometria in genere a parallelepipedo, sono i sistemi di applicazione più diffusi a livello domestico e di laboratorio. Attraverso una molteplicità di modi di risonanza simultanei, sono caratterizzate da una distribuzione relativamente omogenea ma molto irregolare dell'intensità del campo, con bassi valori locali dell'intensità stessa. Questo sistema è impiegato negli strumenti a microonde, nei quali le microonde emesse dal magnetron vengono riflesse in tutte le direzioni nell'interno del forno dalle pareti costruite in metallo (Figura 2).



**Figura 2**

La cavità è rivestita di molti strati di materiale plastico anticorrosione, trasparente alle radiazioni (fluoropolimeri, PEEK, polipropilene, ecc.), per proteggerla dagli schizzi di sostanze corrosive in caso di rottura dei contenitori delle miscele di reazione. L'energia si diffonde nell'intero volume del forno attraversando le pareti trasparenti alle microonde del recipiente con il campione.

- b) *Cavità risonanti a modo singolo*: di geometria rigorosamente regolare, usualmente cilindriche, consentono la scelta di modi “puri” di risonanza, con distribuzioni fortemente localizzate ma regolari dell'intensità del campo elettromagnetico.

Questi sistemi, noti come a “microonde focalizzate”, permettono di concentrare esattamente il fascio delle microonde sulla parte inferiore del contenitore dove si trova la miscela del campione con i reagenti.

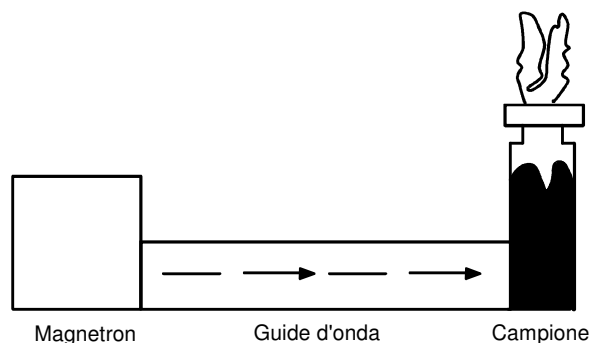
Il vantaggio principale dell'uso delle onde focalizzate, quindi, risiederebbe nel fatto che, centrando le microonde sulla porzione del contenitore in cui si trovano la miscela reattiva ed il campione, si possono usare potenze inferiori rispetto al sistema multi-modale e si può dosare l'energia in modo riproducibile senza dispersioni nell'ambiente.

Si può dunque lavorare a pressione atmosferica con contenitori aperti muniti di refrigerante a ricadere.

L'utilizzo di uno strumento a microonde focalizzato sembra essere di particolare importanza, invece, in quelle reazioni che prevedono la formazione d'intermedi labili.

Il vantaggio principale dei sistemi multi-modali è, al contrario, la possibilità, quasi illimitata, di ampliare la grandezza del reattore, che nel caso di un sistema focalizzato è vincolata, infatti non si possono trattare più di 100 g di campione.

In Figura 3, vengono schematizzate le principali parti costituenti una tipica apparecchiatura per il riscaldamento a microonde.



**Figura 3**

### **3.4. Dispositivi di sicurezza**

Nei sistemi a microonde numerosi sono i dispositivi di sicurezza, ad esempio il portellone del forno. Esso ha il duplice scopo di contenere le microonde, proteggendo così l'operatore dalle radiazioni e di contenere eventuali esplosioni o schizzi di reagenti da contenitori in sovrappressione.

Un altro aspetto molto importante in un forno a microonde è la protezione dell'elettronica, e in particolare del magnetron, da eventuali ritorni di energia. La cavità del forno è rivestita di politetrafluoroetilene, per proteggere il sistema dalla corrosione da parte di agenti acidi o dei solventi.

La camera è fornita di un camino di esalazione dei vapori che a seconda dei modelli, è collegato a sistemi di ventilazione programmabili o a dispositivi di aspirazione e di abbattimento dei fumi, in particolare per gli acidi.

Inoltre, il sistema è generalmente dotato di un apposito software che interviene a diminuire la potenza del generatore e ad abbassare la pressione nel contenitore, evitando perdite di campione dovute al rilascio di pressione del contenitore. In genere, nel software è prevista: la programmazione dei metodi e la loro memorizzazione (es. potenze applicate, tempi di applicazione e di ventilazione, pressioni e temperature interna ed esterna massime, tempi di rotazione delle giostre portacampioni, ecc.), il controllo dei parametri operativi di temperatura e pressione e dei tempi, il controllo degli interruttori di sicurezza, le segnalazioni di eventi accidentali, ecc..

Il controllo del sistema attraverso software permette di fissare la temperatura massima raggiungibile, mentre un dispositivo di controllo a feedback della temperatura è responsabile di una rapida riduzione della potenza, allo scopo di evitare fughe termiche, nel caso in cui le reazioni esotermiche divenissero pronunciate o aumentasse rapidamente il fattore di dissipazione.

#### **4. OBIETTIVO DELLA RICERCA**

L'argomento di questa tesi rappresenta lo sviluppo di indagini già da tempo iniziate presso il Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica della Facoltà di Farmacia – Università degli Studi di Napoli. In particolare viene descritta l'applicazione delle microonde nella sintesi di composti eterociclici biologicamente attivi e di unità peptidiche modificate da incorporare in strutture peptidomimetiche di interesse biologico al fine di consentire l'ottenimento di rese più elevate in tempi notevolmente più brevi e di realizzare in tempi ridotti alcune librerie di composti da sottoporre alle fasi di sperimentazione farmacologica.

#### **4.1. Peptidomimetici**

I peptidi, com'è noto, vengono rapidamente e specificamente degradati dagli enzimi nei sistemi biologici. Ad esempio, la Leu-encefalina in omogenato di cervello di ratto è degradata in pochi minuti.

L'introduzione di scaffolds non idrolizzabili, al contrario, non solo aumenta la stabilità enzimatica, ma può anche aumentare la selettività verso i sottotipi recettoriali, variando il profilo farmacologico e migliorando le proprietà farmacocinetiche come la biodisponibilità orale, il trasporto a livello della barriera ematoencefalica e la durata d'azione.

Attualmente le procedure di sintesi per lo sviluppo dei peptidomimetici comprendono l'incorporazione di aminoacidi non naturali o conforma-



zionalmente vincolati, lo sviluppo di omologhi oligopeptidici, la sostituzione del legame peptidico con i suoi isosteri e la ciclizzazione dei peptidi.

Tutte queste strategie sintetiche sono state prese da me in considerazione e questo ha consentito di applicare l'irraggiamento mediante microonde nello sviluppo di nuove unità peptidiche modificate al fine di sviluppare nuovi peptidomimetici.

In particolare l'irraggiamento mediante microonde è stato applicato nella sintesi di:

- *bioisosteri del legame peptidico:*
  - nucleo 1,2,4 ossadiazolico [5];
  - legame metileno amminico [6];
  - derivati 1,2,3 triazolici [7].
- *esteri metilici della glicina N-alcil sostituiti [8];*
- *nuovi scaffolds in grado di indurre la conformazione  $\beta$ -turn nei polipeptidi[9].*

Nello sviluppo di tali derivati l'irraggiamento mediante microonde è stato abbinato a tecnologie innovative come la chimica combinatoriale.

## 4.2. Derivati eterociclici

Anche in questo caso l'applicazione delle microonde è stata rivolta alla sintesi di composti biologicamente attivi che già da tempo erano di interesse per il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto la mia attività di ricerca.

In particolare in questa tesi viene riportata la possibilità di impiegare le microonde per lo sviluppo di:

- derivati a nucleo benzotriazinonico, 3-idrossi-benzotriazinonico e saccarinico dotati di una potenziale attività antidiarroica [10];
- reazioni di condensazione utilizzando agenti disidratanti direttamente ancorati ad un supporto solido [11].

**5. PARTE SPERIMENTALE**  
**DEI DERIVATI PEPTIDOMIMETICI**

## **5.1. BIOISOSTERI DEL LEGAME PEPTIDICO**

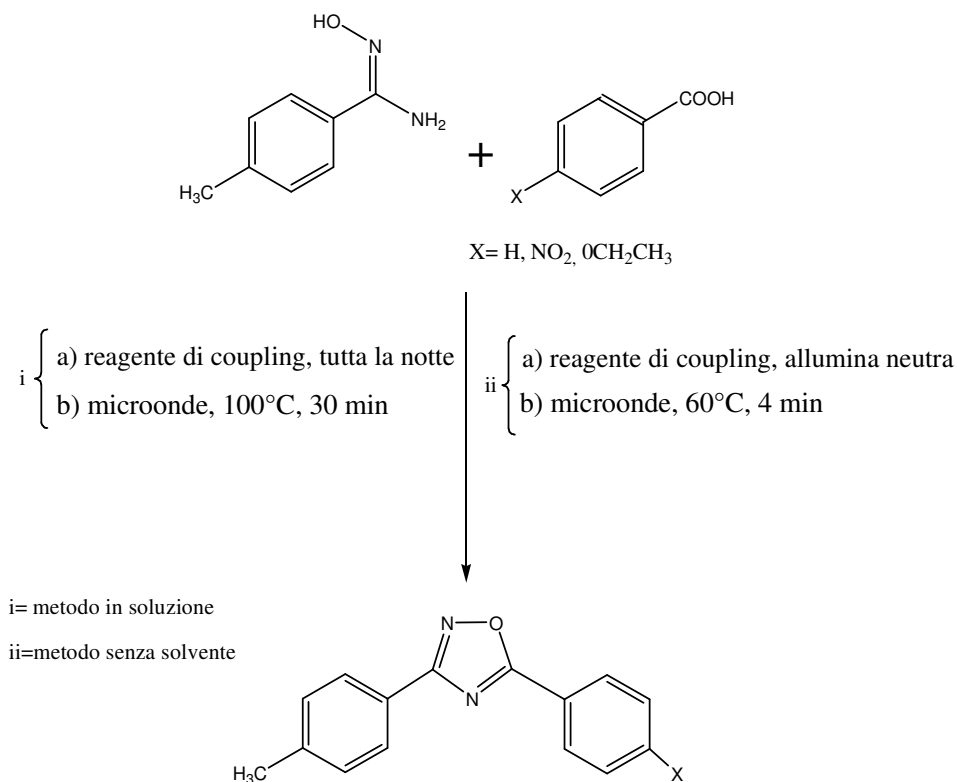
### **5.1.1. Sintesi dei derivati 1,2,4-ossadiazolici [5].**

Nuclei eterociclici come gli 1,2,4-ossadiazoli e gli 1,3,4-ossadiazoli possono essere introdotti in sequenze peptidiche come isosteri del legame peptidico [12]. Vista l'importanza del nucleo 1,2,4-ossadiazolico, il nostro obiettivo durante il lavoro di tesi sperimentale è stato il miglioramento della sua sintesi attraverso l'impiego del riscaldamento mediante microonde. La sintesi di tali derivati è stata condotta secondo lo schema 1 usando un forno a microonde (ETHOS 1600 Milestone) specificamente progettato per la sintesi organica. Le reazioni sono state effettuate a pressione atmosferica in vetreria Pyrex standard con un condensatore a riflusso inserito in un foro presente nella parte superiore del reattore a microonde. La temperatura della miscela di reazione viene monitorata direttamente attraverso una sonda fluorottica virtualmente trasparente alle microonde inserita all'interno della soluzione.

Le condizioni sperimentali usate per il nostro lavoro sono analoghe a quelle usate con il riscaldamento tradizionale.

La sintesi mediante irradiazione a microonde ha dato i prodotti desiderati con rese più alte rispetto a quelle ottenute mediante riscaldamen-

to tradizionale. I tempi necessari per le sintesi sono stati considerevolmente ridotti.



**Schema 1.** Procedura generale di sintesi mediante microonde dei derivati 1,2,4-ossadiazolici.

La mia attenzione è stata rivolta in prima istanza all'analisi dell'O-acilazione di una amidossima con alcuni acidi carbossilici in presenza di solvente, mediata da alcuni tra i più comuni reagenti di coupling, e della successiva reazione di ciclizzazione.

Una temperatura iniziale di 50 °C per la reazione di acilazione è stata utilizzata quando EDC è stato scelto come reagente di coupling, in modo da consentire la sua solubilizzazione in diglyme (2-metossietilere) o in DMF.

L'applicazione delle microonde consente una riduzione notevole dei tempi, facendo ridurre il tempo di reazione da 3 ore a 30 minuti. Anche se l'applicazione delle microonde veniva prolungata per oltre 30 minuti i reagenti non risultavano convertiti completamente nei corrispondenti derivati 1,2,4-ossadiazolici.

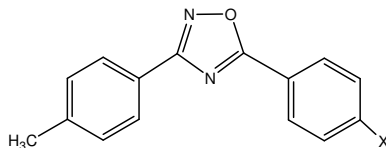
Le stesse reazioni sono state successivamente eseguite anche in assenza di solvente, utilizzando l'allumina neutra come supporto solido in grado di far avvenire la reazione; i tempi di reazione sono risultati notevolmente ridotti (4 minuti), mentre le rese sono state più basse rispetto al metodo a microonde in presenza di solvente, ad eccezione del composto **2** (Tabella 5); inoltre risultano simili o addirittura più elevate rispetto al metodo di riscaldamento convenzionale.

Qualora la reazione veniva eseguita senza aggiungere il supporto solido non si ottenevano i prodotti finali, pur prolungando il riscaldamento per oltre 30 minuti. La purificazione dei prodotti è stata effettuata me-

dianze cromatografia su colonna di gel di silice e successiva cristallizzazione. I parametri tempo, potenza e temperatura usati per l'irradiazione a microonde e le condizioni per il riscaldamento convenzionale sono riportati nella Tabella 5. Tutti i composti sono stati caratterizzati mediante  $^1\text{H-NMR}$ .

Dall'analisi dei risultati presenti in Tabella 5 si può valutare anche il contributo fornito dal reagente di coupling: nei composti **4-9**, utilizzando metodi di attivazione via TBTU/HOBt e DCC/HOBt, le rese ottenute sono state più elevate (68-94%). Al contrario DCC, EDC e CDI forniscono rese più basse. I risultati ottenuti consentono, inoltre, anche di valutare l'effetto elettronico dei sostituenti, utilizzando derivati dell'acido benzoico variamente sostituito: i composti **8** e **9**, con sostituenti elettron-donatori (OEt) hanno fornito rese più basse (75-68%) rispetto ai derivati non sostituiti (**4,5**, 93-88%) o a derivati caratterizzati da sostituenti elettron-attrattori ( $\text{NO}_2$ , 94-91%). Tali effetti elettronici vengono confermati anche durante la procedura di sintesi senza solvente.

**Tabella 5** - Rese e condizioni di sintesi dei derivati 1,2,4-ossadiazolici sia mediante riscaldamento convenzionale che con irradiazioni a microonde.



Comp.	X	Reagente di coupling	Solvente <sup>c</sup>	Riscaldamento convenzionale <sup>b</sup>			Irradiazione a microonde <sup>d</sup>			Irradiazione a microonde senza solvente <sup>d</sup>			
				Temp. (°C)	Resa <sup>a</sup> (%)	Tempo (h)	Temp. (°C)	Resa <sup>a</sup> (%)	Tempo (min.)	Supporto solido	Tempo (min.)	Temp. (°C)	Resa <sup>a</sup> (%)
1	H	DCC	Diglyme	110	28	3	110	50	30	Allumina neutra	4	60	37
2	H	EDC	Diglyme	110	12	3	110	27	30	Allumina neutra	4	60	27
3	H	CDI	Diglyme	100	15	2	100	46	30	Allumina neutra	4	60	32
4	H	TBTU/HOBT	Diglyme	100	75	2	100	93	30	Allumina neutra	4	60	21
5	H	DCC/HOBT	Diglyme	100	68	2	100	88	30	Allumina neutra	4	60	55
6	NO <sub>2</sub>	TBTU/HOBT	Diglyme	100	91	2	100	94	30	Allumina neutra	4	60	31
7	NO <sub>2</sub>	DCC/HOBT	Diglyme	100	78	2	100	91	30	Allumina neutra	4	60	58
8	OEt	TBTU/HOBT	Diglyme	100	63	2	100	75	30	Allumina neutra	4	60	22
9	OEt	DCC/HOBT	Diglyme	100	52	2	100	68	30	Allumina neutra	4	60	46

<sup>a</sup> Tutte le reazioni sono state eseguite 3 volte ed i tempi e le rese forniti corrispondono ai valori medi; <sup>b</sup> Bagno ad olio; <sup>c</sup> Tutte le reazioni sono state eseguite anche in DMF e le rese ottenute sono sovrapponibili; <sup>d</sup> La potenza utilizzata con il solvente è di 300 W, mentre è di 600 W negli esperimenti senza solvente.



#### **5.1.1.1. PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DEI DERIVATI 1,2,4-OSSADIAZOLICI IN SOLUZIONE:**

1 mmole di p-toluen-amidossima ed 1 equivalente di acido carbossilico vengono disciolti in 10 ml di solvente (diglyme o DMF) in presenza del reagente di coupling (1 equiv.). Un'opportuna quantità di base (N-etil-diisopropilammina) è stata aggiunta quando si è scelta l'attivazione via TBTU/HOBt. La miscela di reazione viene tenuta a temperatura ambiente, sotto atmosfera di azoto, per tutta la notte. A questo punto la reazione viene trasferita nel reattore di un forno a microonde (ETHOS 1600 Milestone) e viene riscaldata a 100 °C tramite l'applicazione di irraggiamento a microonde per 30 minuti. Dopo l'irradiazione il solvente viene evaporato e la miscela viene purificata attraverso una colonna cromatografica su gel di silice per dare il composto finale come un solido di colore bianco.

#### **5.1.1.2 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DEI DERIVATI 1,2,4-OSSADIAZOLICI SENZA SOLVENTE:**

La p-toluen-amidossima (1 mmol), l'acido benzoico sostituito (1 equiv.) ed i reagenti di coupling (1 equiv.) vengono mescolati finemente in un mortaio con l'allumina neutra in un rapporto ponderale di 1:4. La miscela viene mescolata per 5 minuti; a questo punto, per avere un mescolamento completo delle polveri, viene aggiunto del diclorometano in quantità sufficiente per solubilizzare i reagenti e viene successivamente allontanato per evaporazione. La miscela di reazione viene sottoposta ad irraggiamento mediante microonde per 4 minuti. Il solido viene estratto con diclorometano e la miscela di reazione viene sottoposta a purificazione mediante colonna cromatografica su gel di silice per dare i derivati finali come prodotti puri.

### 5.1.2. Sintesi dei dipeptidi contenenti il legame metilenamminico [6].

La procedura di sintesi è stata condotta utilizzando un forno a microonde (ETHOS 1600 Milestone) specificamente progettato per la sintesi organica. Tutte le reazioni sono state eseguite in vetreria Pyrex standard e sottoposte a cicli di irraggiamento a microonde costituiti da appropriati step per il raggiungimento ed il mantenimento delle temperature impostate. La temperatura della miscela di reazione è stata monitorata attraverso l'utilizzo di una sonda fluorottica, virtualmente trasparente alle microonde, inserita direttamente nella soluzione.

La procedura di sintesi, così come descritta in Tabella 6, prevede quanto segue: i Boc-aminoacidi sono stati fatti reagire con l'*N,O*-dimetilidrossilamina cloridrata in una soluzione di DMF contenente DCC e DIEA.

Gli *N,O*-dimetilidrossammati sono stati isolati come prodotti puri attraverso lavaggi con acido citrico e bicarbonato di sodio e successiva purificazione mediante colonna cromatografica su gel di silice. Le aldeidi corrispondenti sono state sintetizzate attraverso la riduzione degli *N,O*-dimetilidrossammati protetti con  $\text{LiAlH}_4$  a 0 °C in THF anidro. Le aldeidi sono state conservate brevemente a -20 °C o utilizzate immediatamente,

a causa della loro scarsa stabilità. I legami peptidici ridotti sono stati invece ottenuti mediante alchilazione riduttiva del gruppo N<sup>α</sup>-amminico deproteetto con l'appropriata aldeide protetta, in presenza di NaBH<sub>3</sub>CN in metanolo contenente l'1% di acido acetico.

I dipeptidi modificati sono stati tutti caratterizzati mediante spettrometria di massa ed i risultati ottenuti sono stati consistenti con i valori attesi. Non si è evidenziata inoltre racemizzazione durante il riscaldamento a microonde. I tempi di reazione sono stati notevolmente ridotti tramite l'irraggiamento mediante microonde, mentre le rese sono risultate sempre più alte rispetto alle procedure di riscaldamento convenzionale. In modo particolare i tempi vengono ridotti da 16 ore a 15 minuti nella sintesi degli N,O-dimetilidrossammati e da 1 ora a 9 minuti per l'ottenimento dei composti finali.

L'incremento delle rese, come evidenziato in Tabella 6, risulta attribuibile ad un aumento di temperatura (ad esempio 40,3% contro 47% passando da temperatura ambiente a 45 °C mediante riscaldamento convenzionale per il composto Boc-D-Phe-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Val-OCH<sub>3</sub>) ma in ogni caso l'irraggiamento mediante microonde ha fornito rese nettamente più alte anche in condizioni di temperatura identiche (ad esempio 47%

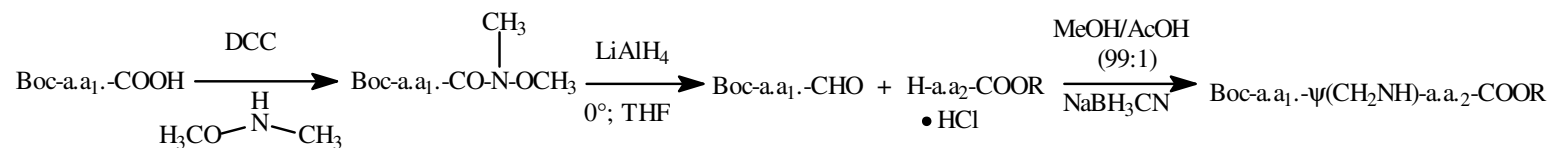
(riscaldamento convenzionale) contro 70% (riscaldamento mediante microonde) per lo stesso composto a 45 °C).

Per la sintesi dei dipeptidi contenenti il legame metilenamminico non è stato possibile sviluppare una strategia di sintesi senza solvente: abbiamo notato, infatti, che i reagenti venivano decomposti durante il riscaldamento a microonde dopo appena 4 minuti; come supporti solidi sono stati testati l'allumina basica e la montmorillonite K-10.

Dai nostri studi è inoltre emersa l'influenza dell'ingombro sterico della catena laterale degli amminoacidi nella sintesi degli idrossammati e nella reazione di alchilazione riduttiva. Abbiamo, infatti, notato che una catena laterale con sostituenti elettron-donatori nell'amminoacido C-terminale, come nel caso della valina o di aib, contribuisce ad ottenere rese più elevate rispetto al coupling con la glicina, nonostante l'ingombro sterico di tali catene laterali.

Al contrario quando aib è stato introdotto come amminoacido N-terminale nella sintesi degli N,O-dimetilidrossammati, la resa ottenuta è risultata più bassa rispetto al triptofano o alla D-fenilalanina. Pertanto, è possibile affermare che in tali condizioni l'ingombro sterico gioca un ruolo determinante.

**Tabella 6** – Rese e tempi di reazione per la sintesi mediante microonde di dipeptidi contenenti il legame metilenamminico.



a.a<sub>1</sub> = Trp, D-Phe, Aib      a.a<sub>2</sub> = Gly, Val, Aib

Composto	T.a.(23±2°C)		Riscaldamento convenzionale <sup>b</sup>			Irradiazione a microonde <sup>c</sup>		
	Resa <sup>a</sup> (%)	Tempo (h)	Resa <sup>a</sup> (%)	Tempo (h)	Temp. (°C)	Resa <sup>a</sup> (%)	Tempo (min.)	Temp. (°C)
<b>Boc-Trp-N(OCH<sub>3</sub>)CH<sub>3</sub></b>	28.3	16	32	16	45	42	15	45
<b>Boc-Trp-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Gly-OCH<sub>3</sub></b>	24	1	36	1	45	60	9	45
<b>Boc-Trp-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Val-OCH<sub>3</sub></b>	32	1	38	1	45	45	9	45
<b>Boc-D-Phe-N(OCH<sub>3</sub>)CH<sub>3</sub></b>	39	16	41	16	45	46	15	45
<b>Boc-D-Phe-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Gly-OCH<sub>3</sub></b>	27.6	1	31	1	45	36	9	45
<b>Boc-D-Phe-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Val-OCH<sub>3</sub></b>	40.3	1	47	1	45	70	9	45
<b>Boc-Aib-N(OCH<sub>3</sub>)CH<sub>3</sub></b>	18	16	20	16	45	26	15	45
<b>Boc-Aib-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Gly-OCH<sub>3</sub></b>	18	1.5	26	1.5	45	34	9	45
<b>Boc-Aib-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Val-OCH<sub>3</sub></b>	22	1.5	29	1.5	45	42	9	45
<b>Boc-Aib-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Aib-OCH<sub>3</sub></b>	24	1.5	32	1.5	45	40	9	45

<sup>a</sup> Tutte le reazioni sono state eseguite tre volte e le rese fornite corrispondono ai valori medi; <sup>b</sup> bagno a olio;

<sup>c</sup> la potenza utilizzata è stata di 300 W.

### **5.1.2.1. PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DEI DI- PEPTIDI CONTENENTI IL LEGAME METILENAMMINICO**

*N,O-dimetilidrossammati*

*N-Boc-amminoaldeidi*

*Legame  $\psi(CH_2NH)$*

*Sintesi degli N,O-dimetilidrossammati*

Ad una soluzione in DMF di 1 equivalente di amminoacido N-protetto (Boc-aa<sub>1</sub>-OH), vengono aggiunti 1,1 equiv. di DCC ed 1,5 equiv. di DIEA e di N,O-dimetilidrossilammina cloridrato. La reazione viene agitata a temperatura ambiente oppure riscaldata mediante riscaldamento convenzionale o irraggiamento a microonde, secondo quanto descritto in Tabella 6. Il solvente viene evaporato e la miscela grezza ripresa in acetato di etile e successivamente lavata tre volte con soluzioni di acido citrico al 10%, bicarbonato di sodio al 5% ed una soluzione satura di NaCl. La purificazione mediante colonna cromatografica su gel di silice ha fornito gli N,O-dimetilidrossammati come solidi di colore bianco.

### *Sintesi delle N-Boc-amminoaldeidi*

Una soluzione di  $\text{LiAlH}_4$  (5 equiv.) in THF anidro viene agitata a  $0\text{ }^\circ\text{C}$  e l’N,O-dimetilidrossammato viene aggiunto goccia a goccia. La reazione viene tenuta sotto agitazione elettromagnetica per 1 ora e successivamente una soluzione acquosa di  $\text{KHSO}_4$  (6 equiv.) è stata aggiunta, seguita da 50 ml di etere di etilico. La fase organica è stata separata ed estratta con HCl 1 M,  $\text{NaHCO}_3$  al 5% ed una soluzione acquosa satura di NaCl. Si ottengono le amminoaldeidi protette come olii da utilizzare senza sottoporre ad ulteriori metodiche di purificazione.

### *Sintesi dei dipeptidi contenenti il legame metilenamminico*

L’aldeide (1 equiv.) viene disciolta in una miscela di  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}$  in rapporto 99:1 e l’amminoacido protetto sulla funzione carbossilica viene aggiunto goccia a goccia ( $\text{H-aa}_2\text{-OCH}_3$ , 1 equiv.). La reazione viene tenuta sotto agitazione elettromagnetica per 10 minuti e a questo punto viene aggiunta goccia a goccia una soluzione di  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (4 equiv.). La reazione viene agitata a temperatura ambiente oppure riscaldata mediante riscaldamento convenzionale o irraggiamento a microonde secondo quanto descritto in Tabella 6. La reazione è stata



poi raffreddata in un bagno di ghiaccio ed addizionata con 30 ml di una soluzione di  $\text{NaHCO}_3$  al 5% e 40 ml di etere di etilico. La fase organica raccolta viene lavata con acido citrico al 10% per tre volte; la fase acquosa acida è stata alcalinizzata completamente con KOH 3 M e riestratta con acetato di etile.

Sono stati ottenuti così i composti finali, come olii di colore giallo, senza necessità di doverli sottoporre ad ulteriori metodiche di purificazione.

### **5.1.3. Sintesi dei derivati 1,2,3-triazolici [7].**

La sintesi del nucleo 1,2,3-triazolico può essere condotta attraverso la reazione dell'acido propiolico ad un residuo N-terminale aminoacidico e la successiva cicloaddizione 1,3 dipolare con una Fmoc-amino-azide. La rimozione del gruppo protettore Fmoc consente il proseguimento della sintesi peptidica. La sintesi dei derivati 1,2,3-triazolici è stata ampiamente discussa in letteratura, sia in fase solida, che in soluzione o in assenza di solvente [13].

La sintesi termica dei derivati 1,2,3-triazolici, tuttavia, è descritta come non regioselettiva [14], mentre l'utilizzo di catalizzatori consente l'ottenimento di un solo regio-isomero [15].

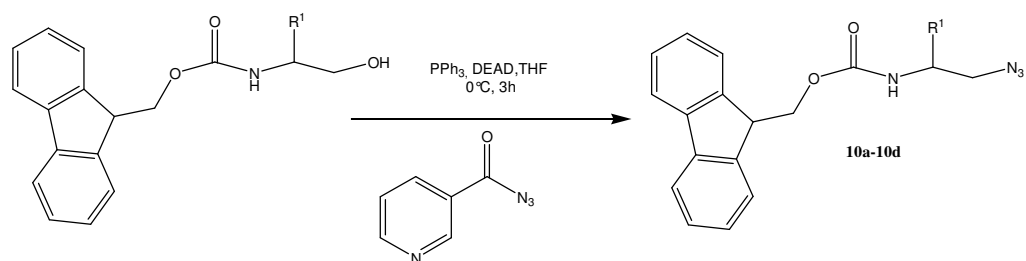
In particolare, lo ioduro rameoso, sia in soluzione che in fase solida, consente la sintesi dei triazoli 1,4 sostituiti senza la formazione dell'isomero 1,5 sostituito. La reazione avviene in condizioni non drastiche ed in rese elevate [16].


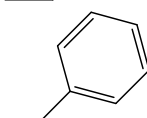
Tuttavia, in letteratura non sono riportati casi di sintesi termica che consentano l'ottenimento del solo regioisomero 1,4. Tale riscaldamento potrebbe permettere una riduzione dei tempi di reazione ed un incremento delle rese.

Sulla base delle considerazioni riportate in precedenza, il nostro obiettivo durante il lavoro di tesi sperimentale è stato il miglioramento della sintesi di triazoli 1,4 sostituiti attraverso l'impiego del riscaldamento mediante microonde.

La sintesi di tali derivati è stata condotta facendo reagire quattro diverse Fmoc-amino-azidi **10a-10d**, da noi precedentemente sintetizzate, caratterizzate da un diverso ingombro sterico in catena laterale, con tre diversi alchini in presenza di ioduro rameoso e di allumina basica. Le reazioni sono state condotte usando un forno a microonde (ETHOS 1600 Milestone) specificamente progettato per la sintesi organica.

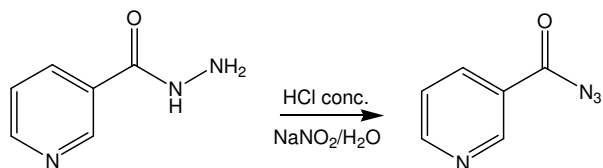
La sintesi delle amino azidi protette è stata condotta attraverso la reazione di Mitsunobu, utilizzando, come donatore di gruppi azidici, la nicotinoil azide. Tale reazione è stata eseguita mediante una procedura già descritta in letteratura, che parte dal corrispondente amino alcool, in presenza di trifenilfosfina e di-etil-azo-dicarbossilato in tetraidrofurano. I reattivi impiegati e le condizioni di reazione sono descritti nello Schema 2.



Compound	R <sup>1</sup>
10a	H
10b	-CH <sub>3</sub>
10c	
10d	

**Schema 2**

La sintesi della nicotinoil azide, invece, è stata realizzata seguendo quanto riportato nello Schema 3.



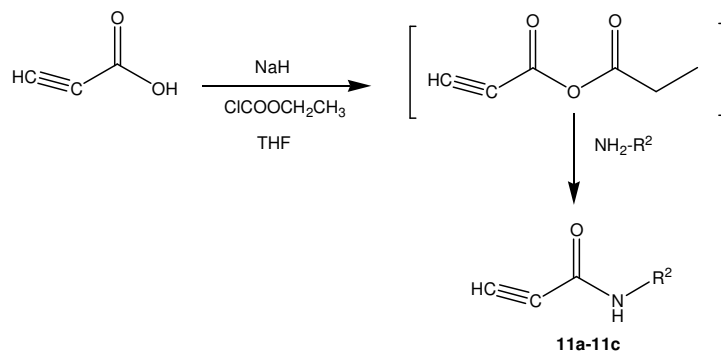
**Schema 3**

La sintesi si esegue facendo reagire l'idrazide dell'acido nicotini-  
co con acido cloridrico concentrato e nitrito di sodio, ad una temperatura

compresa tra 0 e 10 °C. Il derivato sintetizzato è caratterizzato da un forte potere vasodilatatore e determina effetti irritanti.

Le Fmoc-amino-azidi, così sintetizzate, sono state fatte reagire con tre gruppi alchidici precedentemente sintetizzati.

La sintesi dei derivati amido alchidici **11a-11c** è stata condotta secondo quanto riportato nello Schema 4.



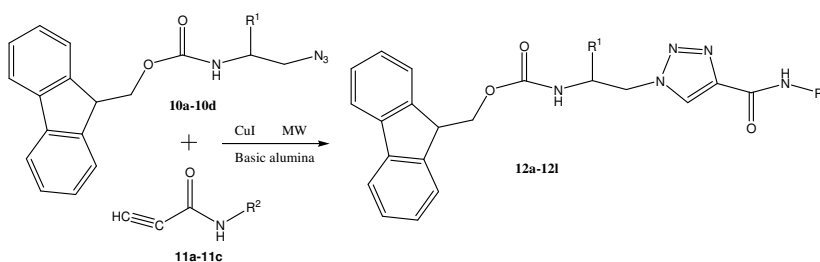
Compound	$\text{R}^2$
<b>11a</b>	
<b>11b</b>	
<b>11c</b>	

**Schema 4**

La sintesi degli alchini segue il metodo dell'anidride mista descritto in letteratura da Coppola et al. [17]. Esso prevede l'attivazione dell'acido propiolico con idruo di sodio. La miscela di reazione così ottenuta, viene agitata per tutta la notte; al mattino seguente si raffredda alla temperatura di  $-10^\circ\text{C}$  e si aggiunge etil cloroformiato. Dopo ulteriori 45 minuti, si ad-

diziona l'aminoacido desiderato e si ottiene il derivato alchिनico corrispondente. Tutti i composti sintetizzati sono delle polveri bianche, ad eccezione del derivato **11c**, che si presenta come un olio di colore giallo.

La sintesi regioselettiva dei derivati 1,2,3-triazolici **12a-12l** mediante microonde è, infine, descritta nello Schema 5:



**Schema 5**

La reazione prevede la cicloadizione tra le Fmoc-amino azidi **10a-10d** con i derivati acetilnammidici **11a-11c** catalizzata dallo ioduro rameoso. Il solvente è stato sostituito con un supporto solido costituito da allumina basica. Le polveri sono state mescolate con l'allumina in un rapporto ponderale di 1:4 per 5 minuti, dopodichè sono state sottoposte all'irraggiamento mediante microonde.

Le reazioni al microonde sono state effettuate in provette sigillate e si è impostato un programma di riscaldamento mediante microonde costi-

tuito da steps di innalzamento della temperatura seguiti da steps a temperatura costante. I parametri di tempo, temperatura e potenza, sono stati monitorati mediante il software “easyWAVE” e sono stati impostati come descritti in Tabella 7.

La temperatura delle reazioni è stata monitorata direttamente attraverso una sonda fluorottica, virtualmente trasparente alle microonde, inserita all'interno della miscela di reazione. La purificazione dei prodotti è stata effettuata mediante cromatografia su colonna di gel di silice e successiva cristallizzazione. Tutti i composti sono stati caratterizzati mediante  $^1\text{H-NMR}$  ed ESI-MS.

Il principale vantaggio della nostra nuova procedura di sintesi, rispetto ai metodi già riportati in letteratura, consiste nell'ottenere dei composti finali **12a-12l** in rese elevate con un brevissimo tempo di irraggiamento a microonde. Tali rese sono paragonabili alla reazione catalizzata dallo ioduro rameoso in soluzione, senza la formazione del regioisomero 1,5 sostituito, ma sono ottenute in tempi estremamente ridotti. La presenza del catalizzatore rameoso rende la reazione regioselettiva e non dipendente dagli effetti di ingombro sterico che, invece, giocano un ruolo di primo ordine nella sintesi termica non catalizzata dei derivati 1,2,3-

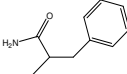
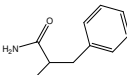


triazolici, in cui l'ingombro dei sostituenti nella catena laterale delle Fmoc-amino azidi può indirizzare la sintesi verso la formazione dei regioisomeri 1,4 ed 1,5 sostituiti, oppure può inibire completamente la cicloaddizione nella formazione dell'isomero 1,5 sostituito.

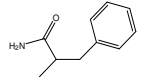
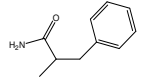
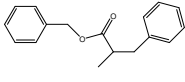
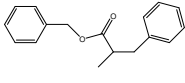
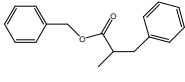
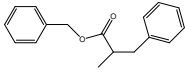
Qualora la reazione veniva eseguita senza aggiungere il supporto solido non si ottenevano i prodotti finali, pur prolungando il riscaldamento per oltre 20 minuti. Inoltre, un incremento di temperatura o della potenza delle microonde impiegate non determinavano un ulteriore aumento delle rese ottenute, in quanto si aveva la decomposizione dei reagenti di partenza.

Dall'analisi dei risultati presenti in Tabella 7, in cui si possono paragonare le rese ottenute mediante microonde senza solvente con le rese ottenute in soluzione a temperatura ambiente, si evince che le rese migliori sono state ottenute con i composti **12i-12l**. Questo risultato, probabilmente va attribuito all'alchino utilizzato (**11c**) che presenta uno stato di aggregazione liquido.

**Tabella 7**

Composto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Temperatura ambiente		Microonde senza solvente			
			Resa (%)	Tempo (h)	Supporto solido	Tempo (min.)	Temp. (°C)	Resa (%)
<b>12a</b>	-H	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	58	16	Allumina	5	60	48
					Basica	10	100	
<b>12b</b>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	68	16	Allumina	5	100	64
					Basica	10	100	
						5	100	
<b>12c</b>	-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	62	16	Allumina	5	60	71
					Basica	10	100	
						5	100	
<b>12d</b>	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	34	12	Allumina	5	50	30
					Basica	10	85	
						5	85	
<b>12e</b>	-H		50	16	Allumina	5	60	46
					Basica	10	100	
						5	100	
<b>12f</b>	-CH <sub>3</sub>		57	16	Allumina	5	60	68
					Basica	10	100	
						5	100	

Continua Tabella 7

Composto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Temperatura ambiente		Microonde senza solvente			
			Resa (%)	Tempo (h)	Supporto solido	Tempo (min.)	Temp. (°C)	Resa (%)
<b>12g</b>	-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		30	16	Allumina	5	60	26
					Basica	10	100	
<b>12h</b>	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>		42	12	Allumina	5	50	38
					Basica	10	85	
						5	85	
<b>12i</b>	-H		66	12	Allumina	5	50	58
					Basica	10	85	
						5	85	
<b>12j</b>	-CH <sub>3</sub>		50	12	Allumina	5	50	55
					Basica	10	85	
						5	85	
<b>12k</b>	-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		56	12	Allumina	5	50	60
					Basica	10	85	
						5	85	
<b>12l</b>	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>		61	12	Allumina	5	50	60
					Basica	10	85	
						5	85	

#### **5.1.3.1. PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DEI DERIVATI AMINO AZIDICI:**

1 mmole di Fmoc-amino alcool ed 1.5 mmoli di trifenilfosfina sono stati disciolti in 70 ml di solvente (THF). La miscela di reazione è stata raffreddata alla temperatura di 0°C e tenuta, sotto agitazione elettromagnetica, in atmosfera di azoto per 10 minuti. Un'opportuna quantità di DEAD (di-etil-azocarbossilato, 1,5 mmoli) è stata aggiunta goccia a goccia ed, infine, dopo altri 10 minuti è stata aggiunta la nicotinoil azide (1.3 mmoli). La reazione viene tenuta sotto agitazione elettromagnetica per ulteriori 3 ore. Il solvente viene evaporato mediante distillazione a pressione ridotta e la miscela viene purificata attraverso una colonna cromatografica su gel di silice per dare il composto finale come un solido di colore bianco.

### **Sintesi della nicotinoil azide**

Ad una soluzione di HCl concentrato (13,2 ml, 159,48 mmoli), tenuta sotto agitazione elettromagnetica, alla temperatura di 0°C è stata aggiunta l'idrazide dell'acido nicotinicco (6g) poco alla volta. Dopo 10 minuti, una soluzione di NaNO<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O (6,15 g in 10,8 ml di H<sub>2</sub>O) è stata aggiunta. Dopo 30 minuti sono stati aggiunti 180 mL di etere etilico. La fase eterea è stata separata ed estratta mediante una soluzione di NaHCO<sub>3</sub>. La fase acquosa è stata, poi, completamente alcalinizzata con NaOH 2N e riestratta con NaHCO<sub>3</sub>. Le fasi organiche riunite sono state anidrificate con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e filtrate. Il solvente è stato evaporato mediante distillazione a pressione ridotta fornendo 3,2g del composto desiderato.

### 5.1.3.2. PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DEI DERIVATI ALCHIN AMMIDICI:

Una soluzione di acido propiolico (1,5 mL, 25 mmoli) sciolto in 20 mL di THF, tenuta sotto agitazione elettromagnetica alla temperatura di 0°C, è stata addizionata a 200 mg di NaH (25 mmoli). La reazione è stata portata a temperatura ambiente ed agitata per 16 h. In seguito, la reazione è stata raffreddata nuovamente alla temperatura di -10 °C ed è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di etil cloroformiato (2,2 ml, 25 mmoli) in THF. Infine, dopo 45 minuti, è stata aggiunta una soluzione dell'ammina primaria desiderata (25 mmoli). La reazione è stata agitata per tre ore. Il solvente è stato evaporato mediante distillazione a pressione ridotta ed il residuo ottenuto è stato ripreso in cloroformio. La fase organica è stata estratta con una soluzione satura di NaCl e, successivamente, anidrificata, filtrata e portata a secco. La miscela di reazione è stata purificata mediante colonna cromatografia su gel di silice fornendo i composti alchin-ammidici desiderati. Tutti i prodotti ottenuti presentavano uno stato di aggregazione solido, ad eccezione del derivato **11c** che si presentava come un olio di colore giallo.

### **5.1.3.3. PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DEI DERIVATI 1,2,3-TRIAZOLICI SENZA SOLVENTE:**

La Fmoc-amino azide (1 mmol), il derivato alchin ammidico (1 mmol) e lo ioduro rameoso (1 mmol) sono stati mescolati finemente in un mortaio con l'allumina basica in un rapporto ponderale di 1:4. La miscela è stata mescolata per 5 minuti; a questo punto, per avere un mescolamento completo delle polveri, è stato aggiunto del diclorometano in quantità sufficiente per solubilizzare i reagenti ed è stato successivamente allontanato per evaporazione. La miscela di reazione è stata sottoposta ad irraggiamento mediante microonde per 20 minuti. Il solido è stato estratto con diclorometano e la miscela di reazione è stata sottoposta a purificazione mediante colonna cromatografica su gel di silice per dare i derivati finali come prodotti puri.

## **5.2. SVILUPPO DI UNA LIBRERIA DI ESTERI METILICI DELLA GLICINA N-ALCHIL SOSTITUITI [8]**

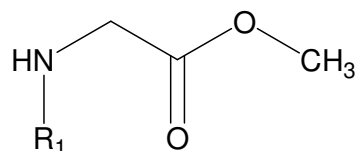
Conoscendo l'importanza della sostituzione degli amminoacidi con i corrispondenti derivati della glicina N-alchil sostituiti, il mio obiettivo è stato il miglioramento della sintesi di questi residui modificati, tenendo in considerazione nuove metodologie sintetiche.

Partendo da queste considerazioni, è stata sviluppata una libreria di esteri metilici della glicina N-alchil sostituiti, ottenuta proprio mediante riscaldamento a microonde e con strategie di sintesi combinatoriali parallele e non-parallele.

In questa tesi viene riportata la sintesi di tali derivati, vengono paragonate le due strategie con le quali essa è stata condotta e sono riportate le sequenze peptidiche in cui i derivati sono stati introdotti con i relativi risultati di sperimentazione farmacologica.

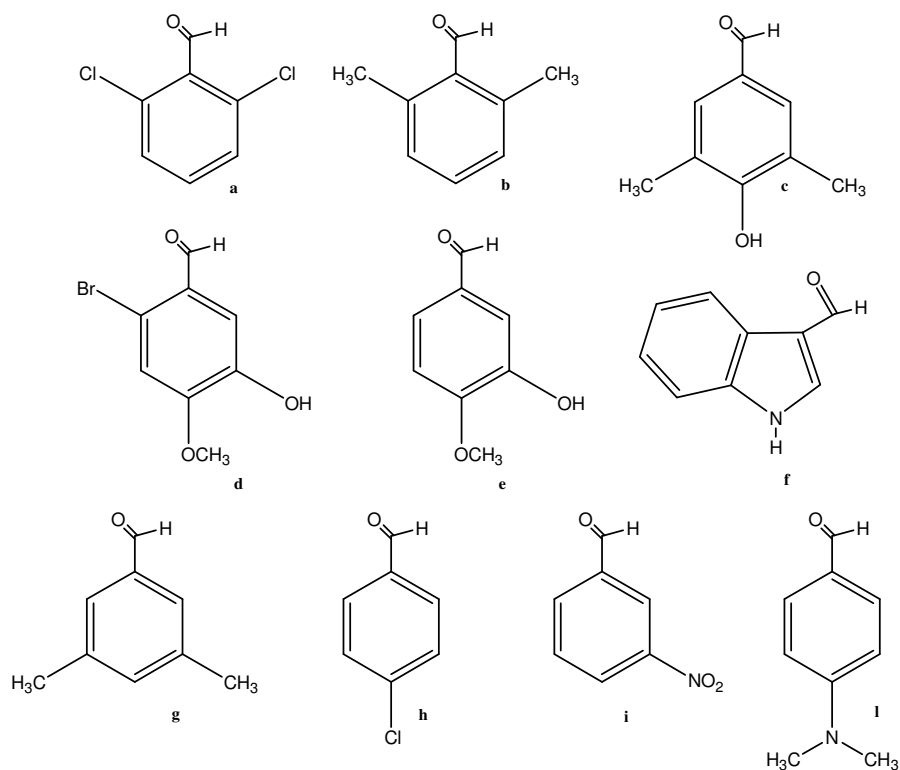
I prodotti da me ottenuti sono caratterizzati dalla struttura generale presente in Figura 4; il lavoro discusso si cala in un ampio progetto già da tempo in atto presso i laboratori da me frequentati per il mio lavoro di tesi e ha previsto l'introduzione di tali residui modificati nella sequenza del peptide PAR-4 AP in modo da individuare validamente la conformazione di legame tra i residui amminoacidici e la controparte recettoriale.





**Figura 4**

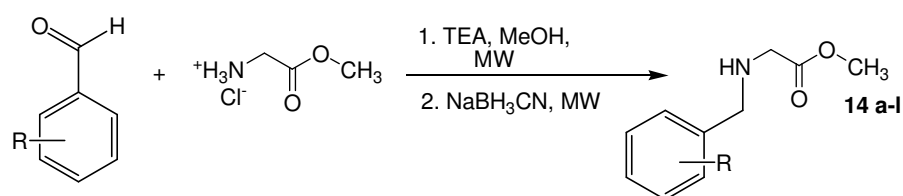
La sintesi parallela dei derivati amminoacidici modificati è stata condotta mediante alchilazione riduttiva della glicina metil estere cloridrato in presenza di 10 diverse aldeidi aromatiche, commercialmente disponibili (Figura 5), e  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ; le aldeidi selezionate forniscono derivati amminoacidici che possono mimare amminoacidi aromatici naturali e non naturali.



**Figura 5**

Ogni reazione è stata condotta in una provetta sigillata specifica per la sintesi a microonde in un carosello “multiPREP” a 36 posizioni (Milestone®); le altre provette sono state riempite con lo stesso solvente di reazione (alcol metilico). La procedura sintetica, riassunta nello Schema 6, è stata condotta usando un forno a microonde (ETHOS 1600, Milestone®) specificamente progettato per la sintesi organica, eseguendo un programma di microonde composto da opportuni step di innalzamento

della temperatura seguiti da step di riscaldamento a temperatura costante.



**Schema 6**

La temperatura della miscela di reazione tenuta sotto agitazione elettromagnetica, è stata monitorata mediante una sonda IR, mentre la rotazione del carosello, il tempo di irraggiamento e la potenza sono stati monitorati con il programma "easyWAVE." L'alchilazione riduttiva ha fornito i composti finali **14a-14l** ed è stata condotta in 2 step di irradiazione con 300W di potenza, alla temperatura di 45°C in alcol metilico per un tempo totale di 15 minuti.

Queste condizioni sono considerate quelle ottimali perché temperature, tempi o potenze più alte, non hanno fornito un ulteriore incremento delle

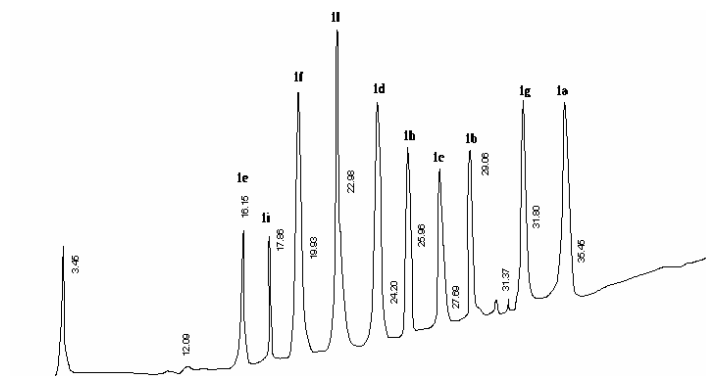
rese o addirittura hanno dato luogo alla decomposizione dei reagenti. Dopo la sintesi, i composti finali sono stati caratterizzati mediante ESI-MS,  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$  ed i dati ottenuti confermano le strutture sintetizzate.

Come punto di partenza per la procedura non-parallela, sono state miscelate quantità misurate dei singoli composti puri **14a-14l** ottenuti precedentemente, e sono state valutate con una colonna C18 Vydac (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 250 mm, particelle sferiche) numerose condizioni di eluizione di RP-HPLC analitico al fine di ottenere una separazione completa. La migliore condizione di eluizione per la determinazione analitica è risultata la seguente, eseguita con due sistemi di solventi:

**A:** 100% acetonitrile in 0.1% TFA,

**B:** 100%  $\text{H}_2\text{O}$  in 0.1% TFA

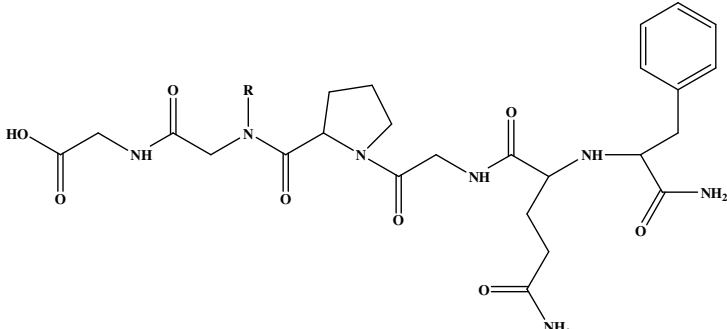
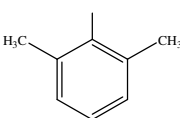
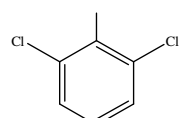
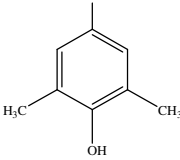
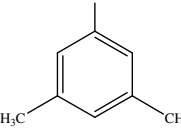
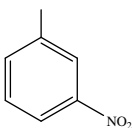
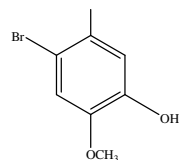
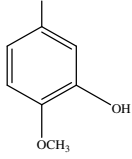
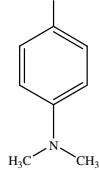
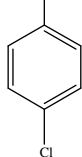
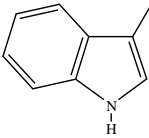
gradiente lineare da 0% A a 50%B in 50 minuti, lampada UV a 220 nm, flusso 1 mL/min. Il cromatogramma ottenuto ha mostrato una separazione sufficiente fra i composti tanto da potere ipotizzare un'eventuale purificazione della miscela di prodotti mediante RP-HPLC preparativo (Figura 6).



**Figura 6**

Sulla base dei risultati ottenuti è stata sviluppata, pertanto, una procedura sintetica non-parallela realizzata ponendo i reattivi in un unico contenitore: la glicina metil estere cloridrato è stata fatta reagire contemporaneamente con le 10 diverse aldeidi aromatiche con la successiva aggiunta di  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  alla miscela; la procedura sintetica è stata compiuta usando sempre il forno a microonde Milestone®. E' stato eseguito un programma di microonde simile alla procedura parallela e l'alchilazione riduttiva è stata compiuta in 2 step di irradiazione con 300W di potenza, alla temperatura di 45 °C in alcol metilico, per un tempo totale di 25 minuti. I derivati sintetizzati sono stati introdotti nella sequenza peptidica PAR-4 AP fornendo i derivati **15-24** presenti in Tabella 8.

**Tabella 8** - Prodotti 15-24

			
Composto	R	Composto	R
15		20	
16		21	
17		22	
18		23	
19		24	

### 5.2.1. SPERIMENTAZIONE FARMACOLOGICA DEI PRODOTTI 15-24

La sperimentazione farmacologica è stata condotta presso il Dipartimento di Farmacologia Sperimentale della Facoltà di Farmacia di Napoli dal gruppo del Prof. Giuseppe Cirino, in collaborazione con il Dipartimento di Fisiologia dell'Università di Siena.

I saggi biologici preliminari hanno permesso di valutare la capacità dei composti sintetizzati di interferire con la produzione di IFN- $\gamma$  (interferone- $\gamma$ ).

L'IFN- $\gamma$  possiede una potente azione immunomodulatrice e la sua attività biologica viene di norma espressa come misura dell'effetto antivirale osservato in colture cellulari e generalmente viene espressa come unità internazionali (*International Units*, IU) relative a standard di riferimento. Per i composti sintetizzati si è andati a valutare la capacità di ripristinare la produzione di IFN- $\gamma$ . Dalla Figura 7 si nota che quando le cellule vengono incubate solo con PHA si ha un aumento della produzione di IFN- $\gamma$ , l'incubazione con l'agonista PAR-4-AP determina una diminuzione di tale produzione, infine l'incubazione delle cellule con gli antagonisti sintetici induce un ripristino, se non un incremento della concentrazione di IFN- $\gamma$ . Tra i composti testati quello che ha dato i risultati più promettenti è stato il composto **18**. Tale composto somministrato ad una dose di 55

$\mu\text{M}$ , non solo ripristinava la produzione di IFN- $\gamma$ , ma ne determinava addirittura un aumento.

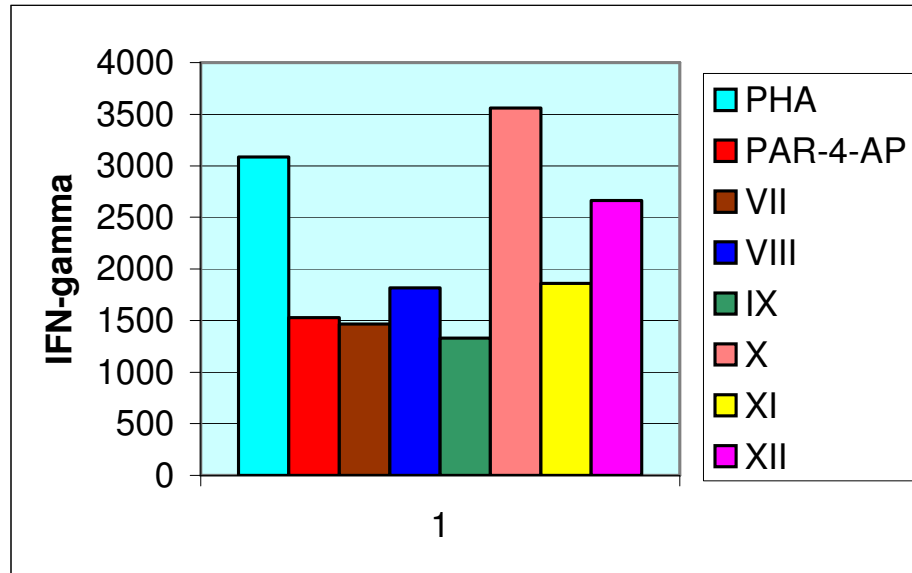


Figura 7



### **5.2.2. PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI PARALLELA DELLA LIBRERIA DI ESTERI METILICI DELLA GLICINA N-ALCHIL SOSTITUITI:**

Utilizzando un carosello “multiPREP” (Milestone®) con 36 provette di reazione, la glicina metil estere cloridrato (2.39 mmol) e l'aldeide appropriata (2.39 mmol) sono state aggiunte ad ogni provetta di reazione e disciolte in alcol metilico. È stata aggiunta poi una quantità equimolare di trietilammina e le provette sono state sigillate. Le reazioni sono state riscaldate in un forno a microonde Milestone® alla temperatura di 45 °C usando 300W di potenza per 5 minuti. Dopo 1 minuto di ventilazione, le provette sono state aperte, ed è stato aggiunto un eccesso di NaBH<sub>3</sub>CN (4.78 mmol) ad ogni miscela di reazione; a questo punto è stato eseguito un nuovo step di riscaldamento a microonde alla temperatura di 45 °C usando 300W di potenza per 10 minuti. Per ogni reazione il solvente è stato allontanato mediante distillazione a pressione ridotta e la miscela grezza è stata ripresa con etile acetato.

Ogni fase organica è stata trasferita in un imbuto separatore e sottoposta ad un'estrazione con una soluzione acquosa al 10% di acido citrico. La fase acquosa è stata alcalinizzata completamente con NaOH 1N per i composti **14a-14b** ed **14f-14l** e contro-estratta con diclorometano. Per le aldeidi caratterizzate da un sostituente fenolico (**14c-14e**) le e-

strazioni sono state evitate. La fase organica è stata anidrificata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco. Le miscele di reazione sono state purificate mediante cromatografia su colonna di gel di silice, per ottenere i composti puri **14a-14l**.

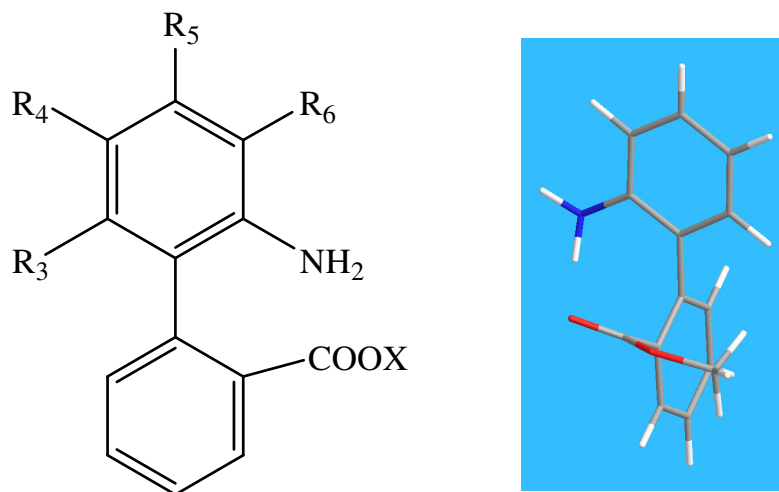
### **5.2.3. PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI NON PARALLELA DELLA LIBRERIA DI ESTERI METILICI DELLA GLICINA N-ALCHIL SOSTITUITI:**

La glicina metil estere cloridrato (23.9 mmol) e le 10 aldeidi (2.39 mmol ognuno) sono state disciolte con alcol metilico in un pallone a due colli. È stata aggiunta una quantità equimolare di trietilammina (23.9 mmol) e la reazione è stata poi trasferita nel reattore di un forno a microonde Milestone®. La reazione è stata riscaldata sotto agitazione elettromagnetica per 5 minuti alla temperatura di 45°C usando 300W di potenza. Dopo 1 minuto di ventilazione, è stato aggiunto un eccesso di NaBH<sub>3</sub>CN (47.8 mmol) e la miscela è stata riscaldata ulteriormente per 20 minuti, nelle stesse condizioni. Dopo il riscaldamento, il solvente è stato allontanato mediante distillazione a pressione ridotta e la miscela è stata estratta successivamente con una soluzione satura di NaCl, in modo da rimuovere l'eccesso di NaBH<sub>3</sub>CN. La miscela grezza è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrata ed il solvente è stato allontanato mediante un rotavapor Buchi R-114 a pressione ridotta. La purificazione mediante RP-HPLC preparativo ci ha consentito di ottenere i composti puri **14a-14l**.

### 5.3. SINTESI MEDIANTE MICROONDE DI UN NUOVO SCAFFOLD IN GRADO DI INDURRE LA CONFORMAZIONE $\beta$ -TURN NEI POLIPEPTIDI [9].

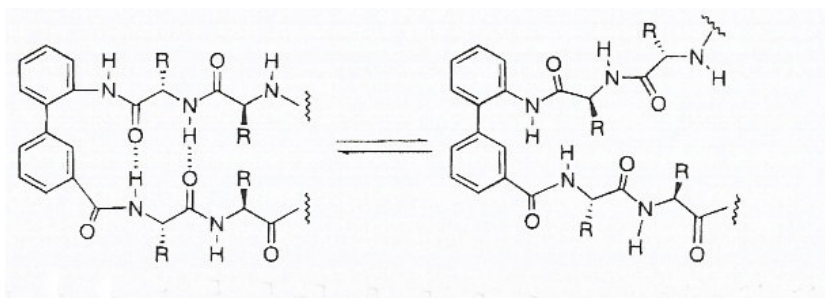
Le microonde sono state impiegate inoltre nello sviluppo di un nuovo scaffold in grado di indurre la conformazione  $\beta$ -turn nei polipeptidi.

Le molecole sintetizzate sono caratterizzate da una struttura amioacidica bifenilica con il gruppo carbossilico e quello amminico che si fronteggiano e sono caratterizzati dalla struttura generale riportata in Figura 8.



**Figura 8.** Struttura generale dei derivati in grado di indurre la conformazione  $\beta$ -turn.

Tale struttura secondaria si realizza mediante l'inversione del senso della catena polipeptidica ed attraverso un legame ad idrogeno intramolecolare che si forma tra le due catene antiparallele; questo vincola il ripiegamento, attraverso la formazione di un anello a 13 o 15 termini, inducendo per tanto la conformazione descritta (Figura 9).



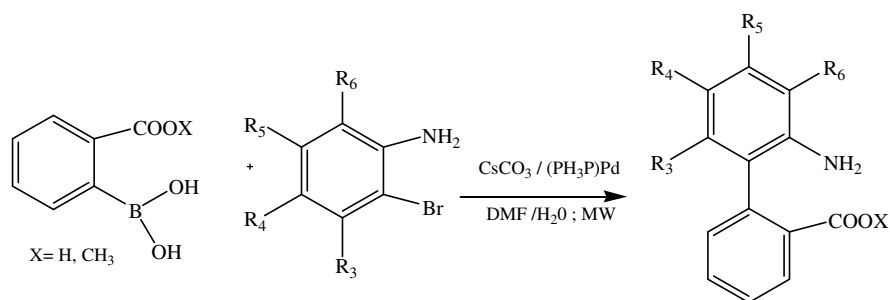
**Figura 9**

La sintesi di derivati bifenilici aromatici dotati dalle caratteristiche illustrate in precedenza è descritta in letteratura come una procedura laboriosa e costituita da numerosi steps. La strategia di sintesi sviluppata da me prevede una strategia one-pot mediante l'utilizzo delle microonde nella reazione di Suzuki coupling.

Siccome in letteratura gli esempi di reazione su derivati dell'anilina sono piuttosto limitati, abbiamo valutato numerose condizioni di reazione.

I migliori risultati sono stati ottenuti in soluzione acquosa utilizzando il carbonato di cesio come base.

La reazione di Suzuki è stata condotta facendo reagire un derivato borbonico con l'opportuno alogenuro aromatico sciolti in una miscela di DMF ed acqua in rapporto 5:1, secondo quanto descritto nello Schema 7.



Composto	X	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
25a	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H
25b	CH <sub>3</sub>	H	CF <sub>3</sub>	H	H
25c	CH <sub>3</sub>	H	H	NO <sub>2</sub>	H
25d	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H
25e	CH <sub>3</sub>	H	H	H	CH <sub>3</sub>
25f	CH <sub>3</sub>	H	H	CF <sub>3</sub>	H
25g	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H
25h	H	H	H	NO <sub>2</sub>	H
25k	H	H	CF <sub>3</sub>	H	H

**Schema 7.** Reazione di Suzuki coupling: reagenti e condizioni.

Alla reazione sono stati aggiunti il carbonato di cesio ed il catalizzatore palladiato e tale miscela è stata posta in un contenitore chiuso ed irraggiata mediante microonde per 30 minuti.

Il principale vantaggio della nostra strategia di sintesi è che con un riscaldamento breve si ottengono i derivati desiderati in buone rese, superiori quasi sempre a quelle ottenute mediante il riscaldamento convenzionale prolungato per 20-36 ore. I risultati conseguiti sono riportati in Tabella 9.

**Tabella 9** - Sintesi dei derivati  $\beta$ -turn mimetici mediante microonde.

Irraggiamento mediante microonde			
Composto	Temp. (°C)	Tempo (min.)	Resa (%)
25a	150	30	34
25b	150	30	17
25c	150	30	34
25d	150	30	29
25e	150	30	24
25f	150	30	19
25g	150	30	22
25h	150	30	25
25k	150	30	13

I derivati sintetizzati sono stati inseriti nella sequenza peptidica PAR-4 e sono attualmente in fase di analisi mediante dicroismo circolare per stabilire se essi realmente, come suggerito da calcoli di modellistica molecolare, stabilizzano la conformazione  $\beta$ -turn.



**6. PARTE SPERIMENTALE**  
**DEI COMPOSTI ETEROCICLICI**

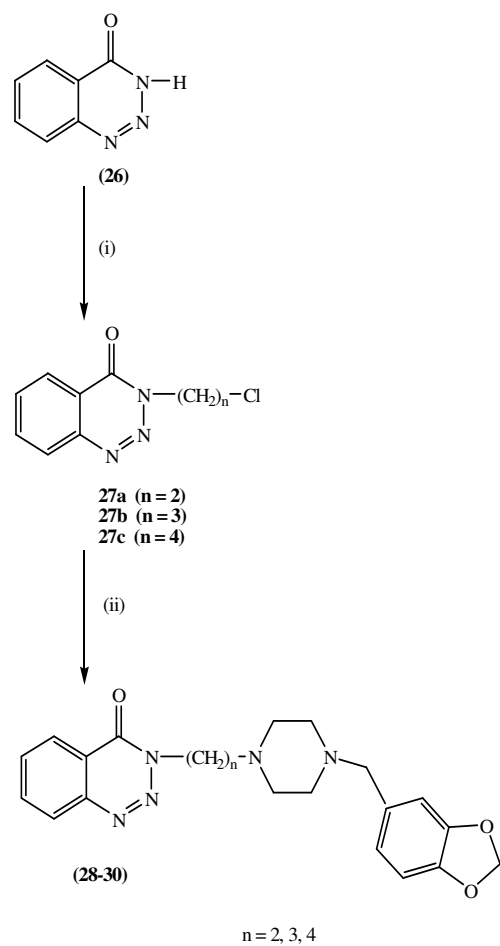
## **6.1. SINTESI DI DERIVATI ETEROCICLICI A NUCLEO BENZOTRIAZINONICO E SACCARINICO DOTATI DI ATTIVITA' ANTIDIARROICA [10].**

La procedura di sintesi utilizzata per i derivati 1,2,3-benzotriazinonici (**28-30**) è stata riassunta nello Schema 8.

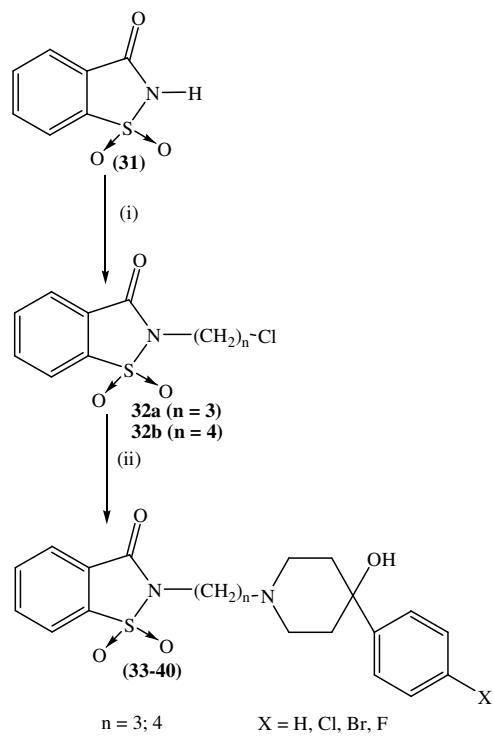
L'alchilazione del nucleo eterociclico di partenza 1,2,3-benzotriazinonico con l'opportuno 1-bromo-2-cloroetano, 1-bromo-3-cloropropano o 1-bromo-4-clorobutano in presenza di  $K_2CO_3$  in DMF, ha fornito i corrispondenti derivati cloroalchil benzotriazinonici (**27a-27c**). Gli intermedi così ottenuti sono stati condensati con l'appropriato 1-piperonil-piperazina in DMF in presenza di  $K_2CO_3$  e NaI, per dare i prodotti finali **28-30**.

La preparazione dei derivati saccarinici (**33-40**) è riportata nello Schema 9.

Il nucleo saccarinico di partenza (**31**) è stato opportunamente alchilato con l'1-bromo-3-cloropropano o 1-bromo-4-clorobutano; gli intermedi cloroalchilici (**32a-32b**) così ottenuti sono stati condensati con l'opportuna 4-idrossi-4-(4-X-fenil)-piperidina per ottenere i prodotti finali **33-40**. Tutti i prodotti finali sono stati, infine, trasformati nei corrispondenti sali cloridrati, utilizzando HCl dry gassoso in etere dietilico anidro.



**Schema 8.** Reagenti e condizioni di reazione: (i)  $\text{Br}(\text{CH}_2)_n\text{Cl}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF,  $\mu\nu$ ; (ii) 1-piperonyl-piperazina,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , NaI, DMF,  $\mu\nu$ .



**Schema 9.** Reagenti e condizioni di reazione: (i)  $\text{Br}(\text{CH}_2)_n\text{Cl}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF,  $\mu\nu$ ; (ii) 4-idrossi-4-(4-X-fenil)-piperidina,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , NaI, DMF,  $\mu\nu$ .

i parametri di tempo, potenza, temperatura utilizzati per il riscaldamento a microonde, le condizioni sperimentali utilizzate per il riscaldamento convenzionale e le relative rese percentuali sono riportati in Tabella 10.

**Tabella 10** – Confronto tra riscaldamento convenzionale e irradiazione a microonde per gli intermedi (**27** e **32**) ed i prodotti finali (**28-30** e **33-40**).

Composti	Riscaldamento convenzionale <sup>a</sup>			Irradiazione a microonde <sup>b</sup>			
	Resa (%)	Tempo (min.)	Temp. (°C)	Resa (%)	Tempo (min.)	Potenza (Watt)	Temp. (°C)
<b>27a-27b-27c</b>	72-85	180	80		5	200	90
				89-96	5	80	90
					20	400	80
<b>32a-32b</b>	51-71	120	riflusso		10	400	120
				80-92	5	200	110
					5	80	80
<b>28-30</b>	44-65	24h	riflusso		5	80	80
				80-92	60	400	120
					5	200	110
<b>33-40</b>	34-62	24h	riflusso		5	80	80
				70-80	50	400	120
					5	200	110

<sup>a</sup>Bagno ad olio;

<sup>b</sup>le condizioni sperimentali usate nell'irradiazione a microonde sono simili a quelle utilizzate nel riscaldamento convenzionale con la stessa concentrazione di reagenti iniziali e volume di solvente.

L'applicazione del riscaldamento mediante microonde, come si è potuto evincere dalla Tabella 10 ha notevolmente migliorato i tempi di reazione che sono risultati significativamente ridotti, da 2-3 ore a 20-30 minuti nelle sintesi degli intermedi (**27** e **32**) e da 24 ore a 60-70 minuti nell'ottenimento dei prodotti finali (**28-30** e **33-40**). Inoltre in tutte le reazioni è stato evidenziato un netto incremento delle rese. Particolarmente evidenti sono i risultati ottenuti per i composti **28-30** le cui rese sono state dell'80-92% contro il 44-65% ottenute con il riscaldamento convenzionale (Tabella 10).

I derivati così ottenuti sono stati sottoposti alla sperimentazione farmacologica.

I saggi farmacologici utilizzati per testare i composti sintetizzati sono stati condotti su ileo isolato di cavia *in vitro* e sul transito intestinale di topo *in vivo*.

In Tabella 11 vengono riportati, per tutti i prodotti testati e per la loperamide preso come farmaco di riferimento, i valori di inibizione della contrazione dell'ileo di cavia indotta elettricamente.

**Tabella 11** – Inibizione delle contrazioni indotte elettricamente nell'ileo di cavia dai prodotti ( **28-30** e **33-40**) e dalla loperamide (tutti impiegati alla concentrazione che oscilla tra  $10^{-9}$  e  $10^{-4}$  M).  $EC_{50}$  ( $\mu$ M): metà della concentrazione massima effettiva;  $E_{max}$  (%): effetto inibitorio massimo. I valori di  $EC_{50}$  ed  $E_{max}$  ottenuti in presenza di naloxone ( $10^{-6}$  M) sono riportati in parentesi. I dati sono la media  $\pm$  S.E.M. di 6-8 animali.

Composti ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$ M)	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	$E_{max}$ (%)
<b>28</b>	5.550 $\pm$ 0.645 (5.207 $\pm$ 0.736)	32 $\pm$ 4 35 $\pm$ 4
<b>29</b>	0.0284 $\pm$ 0.0075 (0.0246 $\pm$ 0.0071)	56 $\pm$ 6 (54 $\pm$ 7)
<b>30</b>	>100	<10
<b>33</b>	>100	<10
<b>34</b>	>100	<10
<b>35</b>	>100	<10
<b>36</b>	*	*
<b>37</b>	>100	<10
<b>38</b>	>100	<10
<b>39</b>	>100	<10
<b>40</b>	>100	<10
Loperamide	0.572 $\pm$ 0.042 (>100)	91 $\pm$ 6 (<10)

\*E' stata osservata una leggera e non significativa tendenza all'incremento delle contrazioni indotte elettricamente.

I risultati ottenuti, riportati come  $EC_{50}$  ( $\mu$ M) hanno evidenziato come alcuni dei composti testati (**28** e **29**) hanno esibito un interessante effetto inibitorio sulla motilità intestinale in vitro. Infatti i derivati **28** e **29** mostravano rispettivamente valori di  $EC_{50}$  di 5.50 e 0.0284  $\mu$ M.



In particolare è possibile notare, come il valore di EC<sub>50</sub> (µM) del composto **29** risulti estremamente più basso di quello della loperamide (EC<sub>50</sub> = 0.572 µM), utilizzato come farmaco di riferimento. I valori di E<sub>max</sub> (%) sono risultati per tutti più bassi rispetto a quelli della loperamide. Contrariamente alle aspettative, i composti più attivi in vitro (**28** e **29**), sono risultati quindi quelli caratterizzati da un nucleo benzotriazinico, legato per mezzo di una catena alchilica, alla 1-piperonil-piperazina mettendo così in evidenza come l'anello piperidinico non sia risultato in questa serie di derivati fondamentale ai fini dell'attività antidiarroica. Inoltre in questi derivati, l'allungamento della catena alchilica da 2,3 a 4 atomi di carbonio porta ad una perdita di efficacia. Per i derivati **28** e **29** lo stesso saggio farmacologico *in vitro* è stato effettuato anche in presenza del naloxone, considerato un antagonista relativamente puro del recettore degli oppioidi.

Tuttavia il naloxone non è risultato in grado di modificare l'effetto inibitorio dei composti **28** e **29** (Tabella 11). Questi risultati indicano come gli effetti inibitori di tali prodotti sulla contrazione dell'ileo, non siano dovuti all'attivazione dei recettori oppioidi. Dai risultati conseguiti si evince che tali derivati potrebbero fornire nuove strategie per la cura dei disturbi della motilità associati a diarrea, sindrome del colon irritable e morbo di Crohn.

**6.1.1. PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DEI DERIVATI 2-CLOROETIL-1,2,3-BENZOTRIAZINONICI, 3-CLOROPROPIL-1,2,3-BENZOTRIAZINONICI E 4-CLOROBUTIL-1,2,3-BENZOTRIAZINONICI**

Una miscela di 1-bromo-2-cloroetano , 1-bromo-3-cloropropano o 1-bromo-4-clorobutano (0.09 mol), 1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one (**26**) (0.03 mol) e  $K_2CO_3$  (0.05 mol) in DMF (70 ml) è stata introdotta nel pallone di reazione ed i parametri desiderati (potenza delle microonde, temperatura e tempo) sono stati impostati come riportato in Tabella 10. Successivamente, la miscela di reazione è stata raffreddata e portata a secco. Il residuo è stato sciolto in  $CH_2Cl_2$  e la soluzione è stata trattata più volte con  $H_2O$ . La fase organica è stata anidrificata con  $Na_2SO_4$  anidro e concentrata. La purificazione dei prodotti è stata effettuata mediante cromatografia su colonna di gel di silice (etere dietilico/metanolo, 9:1, v/v) per fornire gli intermedi **27a**, **27b** e **27c** come solidi (rese ottenute: **27a** 90%; **27b** 96%; **27c** 89%).

**6.1.2. PROCEDURA GENERALE PER LA PREPARAZIONE DEI  
DERIVATI 3-[2, 3 O 4-(1-PIPERONIL-PIPERAZINA)-ALCHIL]-  
1,2,3-BENZOTRIAZIN-4(3H)-ONE**

Una miscela dell'appropriato 2, 3 o 4-(cloroalchil)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one **27a**, **27b** e **27c** (0.03 mol), 1-piperonil-piperazina (0.03 mol), NaI (0.05 mol) e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.05 mol) in DMF (50 ml) è stata introdotta nel pallone di reazione ed i parametri desiderati (potenza delle microonde, temperatura e tempo) sono stati impostati come riportato in Tabella 10. Dopo raffreddamento, la miscela è stata portata a secco ed il residuo sciolto in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; la soluzione è stata quindi trattata più volte con H<sub>2</sub>O. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrata. La purificazione dei prodotti finali è stata effettuata mediante cromatografia su colonna di gel di silice (etere dietilico/etanolo, 9:1, v/v) per fornire i prodotti finali (**28-30**) come solidi cristallini bianchi (rese comprese tra l'80 e il 92%).

**6.1.3. PROCEDURA GENERALE PER LA PREPARAZIONE DEI  
DERIVATI 2-CLOROALCHIL-1,2-BENZISOTIAZOLIN-  
3(2H)ONE-1,1-DIOSSIDI**

Una soluzione dell'appropriato 1-bromo-3-cloropropano o 1-bromo-4-clorobutano (0.25 mol) in DMF (30 ml) è stata aggiunta goccia a goccia sotto agitazione ad una soluzione di saccarina (**31**) (0.1 mol) e  $K_2CO_3$  anidro (0.15 mol) in DMF (50 ml). La miscela ottenuta è stata introdotta nel pallone di reazione ed i parametri desiderati (potenza delle microonde, temperatura e tempo) sono stati impostati come riportato in Tabella 9. Dopo raffreddamento, la miscela è stata diluita con  $CHCl_3$  ed trattata più volte con  $H_2O$ . La fase organica è stata anidrificata con  $Na_2SO_4$  anidro e concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato sottoposto a cromatografia su colonna di gel di silice (etil acetato/n-esano, 9:1, v/v) per fornire i prodotti intermedi **32a** e **32b** come solidi (rese ottenute: **32a** 80%; **32b** 92%).

**6.1.4. PROCEDURA GENERALE PER LA PREPARAZIONE DEI  
DERIVATI 2-[3 O 4-(4-IDROSSI-4-FENIL-PIPERIDIN-1-IL)-  
ALCHIL]-1,2-BENZISOTIAZOLIN-3-(2H)ONE 1,1-DIOSSIDI**

Una miscela di un appropriato N-(cloroalchil)-benzensulfimide (**32a** o **32b**) (0.10 ml) e NaI (0.16 mol) in DMF (50 ml) è stata posta sotto agitazione e.m. a ricadere per 30 minuti. Successivamente sono stati aggiunti  $K_2CO_3$  (0.16 mol) e l'appropriata 4-idrossi-4-(4-X-fenil)-piperidina (0.10 mol). La miscela di reazione così ottenuta è stata introdotta nel pallone di reazione ed i parametri desiderati (potenza delle microonde, temperatura e tempo) sono stati impostati come riportato in Tabella 9. Dopo raffreddamento, la miscela è stata filtrata, diluita con  $CHCl_3$  ed trattata più volte con  $H_2O$ . La fase organica è stata anidrificata con  $Na_2SO_4$  anidro, concentrata sotto vuoto ed il residuo è stato purificato su colonna di gel di silice (etere dietilico/etanolo, 9.5:0.5, v/v) per fornire i prodotti finali (**33-40**) come solidi cristallini bianchi (rese comprese tra il 70 e l'80%).

### **6.1.5. SALI CLORIDRATI: PROCEDURA GENERALE**

I sali cloridrati sono stati preparati per addizione di una soluzione eterea di HCl ad una soluzione etanolica di basi libere. Tutti i derivati sono stati ricristallizzati da una miscela di etere dietilico ed etanolo. I prodotti finali sono stati ottenuti come solidi cristallini bianchi.

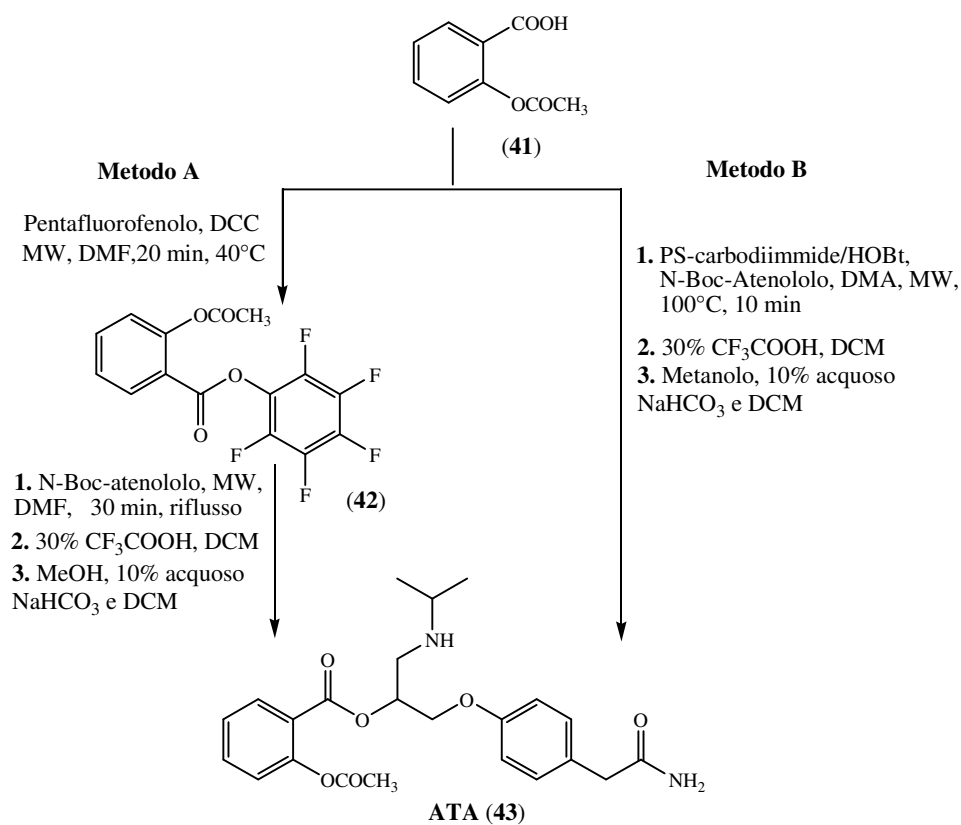
## **6.2. APPLICAZIONE DELLE MICROONDE IN REAZIONI DI CONDENSAZIONE UTILIZZANDO AGENTI DISIDRATANTI DIRETTAMENTE ANCORATI AD UN SUPPORTO SOLIDO [11].**

Le microonde sono state impiegate nella condensazione tra l’N-Boc-atenololo e l’acido acetilsalicilico. In particolare, la mia attenzione è stata focalizzata su due diversi approcci per la sintesi dell’atenololo-aspirinato (ATA), a partire da reagenti facilmente disponibili. Nel primo approccio il riscaldamento mediante microonde ha favorito l’attivazione della funzione carbossilica come estere attivo del pentafluorofenolo (-OPfp, Schema 10 - A), mentre nel secondo le microonde sono state applicate in una tecnica in soluzione assistita da polimeri, in cui la carbodiimide, legata ad una resina polistirenica (PS-carbodi-immide), viene utilizzata in presenza di HOBt e impiegando l’N,N- dimetilacetammide (DMA) come solvente (Schema 10 - B).

In entrambi i metodi di sintesi il processo comprende tre steps fondamentali:

- a) protezione del gruppo amminico secondario dell’atenololo con formazione di un derivato N-Boc;
- b) attivazione del gruppo carbossilico dell’acido acetilsalicilico e accoppiamento con atenololo N-Boc protetto;
- c) rimozione del gruppo protettore dal gruppo amminico secondario dell’atenololo.

L'alta polarità del solvente DMA ha assicurato una completa omogeneità ed un efficace riscaldamento della miscela di reazione. In soli 10 minuti di irradiazione l'acido acetilsalicilico di partenza e il derivato N-Boc-atenololo sono stati convertiti completamente nell'estere N-Boc-atenololo-aspirinato.



**Schema 10.** Sintesi del derivato 2-acetossi-benzoico 2-(4-carbamoilmetil-fenossi)-1-(isopropilamino-metil)-etil estere cloridrato (ATA, 43).



In particolare, seguendo la prima procedura descritta, l'atenololo aspirinato è stato ottenuto nel modo seguente: l'Aspirina (**41**), disciolta in N,N-dimetilformammide (DMF) anidra in presenza di dicicloesilcarbodiimide (DCC), è stata trattata con pentafluorofenolo per fornire il corrispondente estere pentafluorofenilico (**42**). All'intermedio **42**, sciolto in DMF, si è aggiunto N-Boc-atenololo e la soluzione risultante è stata riscaldata mediante irradiazione con microonde per trenta minuti. Dopo il work-up, l'intermedio N-Boc-atenololo-aspirinato è stato purificato mediante cromatografia su colonna, usando come fase stazionaria gel di silice e come eluente una miscela di etere/etanolo 8:2 (v/v). La resa percentuale del prodotto finale è stata del 75%. Infine l'atenololo-acetilsalicilato (**43**) è stato ottenuto rimuovendo il gruppo Boc con una soluzione di acido trifluoroacetico (TFA) al 30% in diclorometano (DCM). Il corrispondente sale trifluoroacetato è stato disciolto in metanolo, trattato con una soluzione acquosa al 10% di NaHCO<sub>3</sub> ed estratto con diclorometano. Il solvente è stato evaporato ed il residuo cristallizzato da etere dietilico.

Nel secondo metodo la condensazione tra l'N-Boc-atenololo e l'acido acetilsalicilico (**41**) ha previsto l'applicazione del riscaldamento mediante microonde ad una tecnica in soluzione assistita da polimeri, in cui la carbodiimide, legata ad una resina polistirenica (PS-carbodiimide), viene utilizzata in presenza di HOBt e impiegando l'N,N-di-

metilacetammide (DMA) come solvente. La rimozione del gruppo protettore Boc, per fornire il composto finale **43**, è stata condotta secondo la procedura descritta per il primo metodo. Il derivato sintetizzato è attualmente in fase di sperimentazione farmacologica ed i risultati preliminari mostrano un'elevata efficacia sia come antinfiammatorio che come derivato beta-bloccante consentendo di migliorare le caratteristiche di entrambe le molecole di origine.

## **7. CONCLUSIONI**

In questa tesi di dottorato di ricerca in Scienza del Farmaco, sono riportati una serie di esempi rappresentativi dell'impatto del riscaldamento mediante microonde nello sviluppo di nuove molecole biologicamente attive e nella ottimizzazione delle reazioni più diffuse in chimica farmaceutica, realizzati dal gruppo presso il quale ho svolto la mia attività di ricerca. Tali esempi dimostrano come tale tecnologia sia attualmente in rapida diffusione e rappresenterà un ausilio fondamentale per il settore della ricerca ed un approccio valido alla sintesi di tipo industriale.

Infatti, rispetto ai processi convenzionali di sintesi organica, il riscaldamento mediante microonde presenta numerosi vantaggi, come regimi di riscaldamento elevati, l'assenza di contatto tra la sorgente termica ed i reagenti, rese elevate e tempi di reazione ridotti, interazione selettiva tra le microonde e le sostanze chimiche e così via. Questo spiega il ruolo primario che questa nuova tecnologia sta acquisendo nella chimica farmaceutica.

Oggi, lo sviluppo di nuovi farmaci si trova in una nuova condizione, che prevede la sintesi nel prossimo decennio di un numero di molecole superiore a quelle che sono state mai realizzate negli anni precedenti.

La sintesi di un tal numero di piccole molecole organiche è, pertanto, affidata alla chimica combinatoriale in associazione con il riscaldamento mediante microonde, in modo da consentire lo sviluppo di librerie di derivati che guidano, in tempi ristretti, alla individuazione di mo-

delli molecolari dotati di grande affinità ed attività intrinseca nel loro sito-bersaglio.

In conclusione, data l'entità e la riproducibilità dei vantaggi, la versatilità e la "pulizia" della tecnica a microonde a tutt'oggi messi in luce, ci si aspetta nel prossimo futuro una rapida espansione anche nell'ambito chimico-farmaceutico. La quantità di composti disponibili per screening biologici crescerà inevitabilmente e conseguentemente, i principali processi di ottimizzazione saranno accelerati.

Dall'analisi di quanto riportato in questa tesi in letteratura in genere possiamo affermare che, la sintesi organica condotta mediante riscaldamento a microonde, è in grado di assicurare una più rapida produzione di librerie di composti eterociclici e peptidici da cui si potrebbero individuare i vari target macromolecolari per il trattamento di patologie di diversa natura.

## Bibliografia

- [1] V. Santagada, E. Perissutti, F. Fiorino, B. Vivencio, G. Caliendo, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, (12), 2397-2400.
- [2] V. Santagada, F. Fiorino, E. Perissutti, B. Severino, V. De Filippis, B. Vivencio, G. Caliendo, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 5171- 5173.
- [3] (a) V. Santagada, E. Perissutti, G. Caliendo, *Current Medicinal Chemistry* **2002**, 9, 13, 1251-1283; (b) V. Santagada, F. Fiorino, E. Perissutti, B. Severino, S. Terracciano, C.E. Teixeira, G. Caliendo, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, (6), 1149-1152; (c) V. Santagada, F. Frecentese, E. Perissutti, D. Cirillo, S. Terracciano, G. Caliendo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 4491-4493; (d) A. Loupy, *Microwaves in Organic Synthesis. Wiley-VCH*, **2002**; (e) M. Larhed, A. Hallberg, *Drug Discovery Today*, **2001**, 6, 404-416; (f) Selway C.N., Terrett N.K.; *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, **1996**, 4, 645-654.; (g) Baxendale I.R., Ley S.V.; *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, **2000**, 10, 1983-1986,.
- [4] (a) M.S. Manhas et al., *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 56, 5587-5601. (b) M. Alterman et al., *J.Med.Chem.*, **1999**, 42, 3835-3844; (c) M. Larhed et al., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 8219-8220; (d) M. Alterman, A. Hallberg, *J.Org.Chem.*, **2000**, 65, 7984-7989.
- [5] V. Santagada, F. Frecentese, E. Perissutti, D. Cirillo, S. Terracciano, G. Caliendo, *Bioorg.Med.Chem.Lett*, **2004**, 14 (17), 4491-4493
- [6] V. Santagada, F. Frecentese, F. Fiorino, D. Cirillo, E. Perisutti, B. Severino, S. Terracciano, G. Caliendo, *QSAR & Comb. Sci.*, **2004**, 23 (10), 899-901
- [7] E. Perissutti, F. Frecentese, F. Fiorino, B. Severino, D. Cirillo, V. Santagada, G. Caliendo, *J. Med. Chem*, **2006**, 49, in press.
- [8] V. Santagada, F. Frecentese, E. Perissutti, F. Fiorino, B. Severino, D. Cirillo, S. Terracciano, G. Caliendo, *J. Comb. Chem.*, **2005**, 7 (4), 618-621
- [9] V. Santagada, F. Frecentese, E. Perissutti, F. Fiorino, B. Severino, G. Caliendo, *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, in press.

- [10] F. Fiorino, G. Caliendo, E. Perissutti, B. Severino, F. Frecentese, B. Preziosi, A. A. Izzo, R. Capasso, V. Santagada, *Archiv der Pharmazie*, **2005**, 338 (11), 548-555.
- [11] V. Santagada, F. Frecentese, E. Perissutti, F. Fiorino, B. Severino, G. Caliendo, *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, in press.
- [12] (a) C. B. Vu, E. G. Corpuz, T. J. Merry, S. G. Pradeepan, C. Bartlett, R. S. Bohacek, M. C. Botfield, B. A. Lynch, I. A. MacNeil, M. K. Ram, M. R. van Schravendijk, S. Violette, T. K. Sawyer, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4088. (b) L. J. Street, R. Baker, J. L. Castro, M. S. Chambers, A. R. Guiblin, S. C. Hobbs, V. G. Matassa, A. J. Reeve, M. S. Beer, D. N. Middlemiss, *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 1529. (c) J. W. Clithirow, P. Beswick, W. J. Irving, D. I. C. Scopes, J. C. Barnes, J. Clapham, J. D. Brown, D. J. Evans, A. G. Hayes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 833.
- [13] (a) C. W. Tornøe, C. Christenseer, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057; (b) C. W. Tornøe, S. J. Sanderson, J. C. Mottram, G. H. Coombs, M. Morten, *J. Comb. Chem.* **2004**, 6, 312; (c) Z. Zhang, E. Fan, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 665; (d) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. D. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2596. (e) A. R. Katritzky, S. K. Singh, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 9077; (f) G. Biagi, I. Giorgi, O. Livi A. Lucacchini, C. Martini, V. Scartoni, *J. Pharm. Sci.*, **1993**, 82, 893; (g) J. H. Boyer, C. H. Mack, N. Goebel, L. R. Morgan, *J. Org. Chem.*, **1958**, 23, 1051. (h) G. S. Akimova, V. N. Chistokletov, A. A. Petrov, *Zh. Org. Khim.*, **1967**, 3, 968. (i) R. C. Mearnman, C. E. Newall, A. P. Tonge, *J. Antibiot.* **1984**, 37, 885.
- [14] J. Bastide, O. Henri-Rousseau, *In the Chemistry of the carbon-carbon triple bond*, Ed. Interscience Publishers, London, **1978**, 447.
- [15] (a) Y. B. Zhao, Z.Y. Yan, Y. M. Liang, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47 (10), 1545. (b) L. Barr, S. F. Lincoln, C. J Easton, *Supramolecular Chemistry*, **2005**, 17 (7), 547.
- [16] (a) G. C. Zanotti, B. E. Campbell, K. R. K. Easwaran, E. R. Blont, *Int. J. Peptide Protein Res*, **1988**, 32, 527; (b) D. Barbeau, S. Guay, E. Escher, *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 151; (c) M. Manning, S. Stoev,

- K. Bonkowsky, A. Masicka, B. Lammek, *J. Med. Chem*, **1992**, 35, 382; (d) A. Aubry, M. Marraud, *Biopolymers*, **1989**, 28, 109; (e) L. El Masdauri, A. Aubry, C. Sakarellos, E. J. Gomez, M. T. Cung, M. Marraud, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1998**, 31, 420; (f) M. Marraud, V. Dupont, V. Grand, A. Zerkout, G. Lecoq, G. Boussard, J. Vidal, A. Collet, A. Aubry *Biopolymers*, **1993**, 33, 1135; (g) R. T. Jensen, D. H. Coy, *Trends Pharm. Sci*, **1991**, 12,13; (h) D. H. Coy, P. Heinz-Erian, N. Y. Jiang, Y. Sasaki, J. Taylor, J. P. Moreau W. T. Wolfrey, J. D. Gardner, R. T. Jensen, *J. Biol .Chem*, **1988**, 263, 5056; (i) D. Hudson, R. Sharpe, M. Szelke,*Int. J. Peptide Protein Res.*, **1980**, 15, 122.
- [17] G. M. Coppola, R. E. Damon, *Synthetic Communications*, **1993**, 23 (14), 2003.



## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>PAG 1</b>
<b>2. PRINCIPI FISICI DEL RISCALDAMENTO CON MICROONDE.....</b>	<b>PAG 10</b>
<b>3. APPARECCHIATURA PER RISCALDAMENTO A MICROONDE.....</b>	<b>PAG 15</b>
<b>3.1. GENERATORI DI POTENZA A MICROONDE:.....</b>	<b>PAG 15</b>
<b>3.2. LINEE DI TRASMISSIONE.....</b>	<b>PAG 17</b>
<b>3.3. APPLICATORI DI POTENZA A MICROONDE.....</b>	<b>PAG 18</b>
<b>3.4. DISPOSITIVI DI SICUREZZA.....</b>	<b>PAG 21</b>
<b>4. OBIETTIVO DELLA RICERCA.....</b>	<b>PAG 23</b>
<b>4.1. PEPTIDOMIMETICI.....</b>	<b>PAG 24</b>
<b>4.2. DERIVATI ETEROCICLICI.....</b>	<b>PAG 26</b>
<b>5. PARTE SPERIMENTALE DEI DERIVATI PEPTIDOMIMETICI.....</b>	<b>PAG 27</b>
<b>5.1. BIOISOSTERI DEL LEGAME PEPTIDICO.....</b>	<b>PAG 28</b>
<b>5.1.1. SINTESI DEI DERIVATI 1,2,4-OSSADIAZOLICI.....</b>	<b>PAG 28</b>
<b>5.1.1.1. PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DEI DERIVATI 1,2,4-OSSADIAZOLICI IN SOLUZIONE.....</b>	<b>PAG 33</b>
<b>5.1.2. SINTESI DEI DIPEPTIDI CONTENENTI IL LEGAME METILEN-AMMINICO.....</b>	<b>PAG 35</b>
<b>5.1.2.1. PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DEI DIPEPTIDI CONTENENTI IL LEGAME METILENAMMINICO.....</b>	<b>PAG 39</b>
<b>5.1.3. SINTESI DEI DERIVATI 1,2,3-TRIAZOLICI.....</b>	<b>PAG 42</b>
<b>5.1.3.1. PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DEI DERIVATI AMINO AZIDICI.....</b>	<b>PAG 52</b>

<b>5.1.3.2. PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DEI DERIVATI AL- CHIN AMMIDICI.....</b>	<b>PAG 54</b>
<b>5.1.3.3. PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DEI DERIVATI 1,2,3- TRIAZOLICI SENZA SOLVENTE.....</b>	<b>PAG 55</b>
<b>5.2. SVILUPPO DI UNA LIBRERIA DI ESTERI METILICI DELLA GLICINA N-ALCHIL SOSTITUITI.....</b>	<b>PAG 56</b>
<b>5.2.1. SPERIMENTAZIONE FARMACOLOGICA DEI PRODOTTI 15-24.....</b>	<b>PAG 63</b>
<b>5.2.2. PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI PARALLELA DELLA LI- BRERIA DI ESTERI METILICI DELLA GLICINA N-ALCHIL SOSTITUITI..</b>	<b>PAG 65</b>
<b>5.2.3. PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI NON PARALLELA DEL- LA LIBRERIA DI ESTERI METILICI DELLA GLICINA N-ALCHIL SOSTI- TUITI.....</b>	<b>PAG 67</b>
<b>5.3. SINTESI MEDIANTE MICROONDE DI UN NUOVO SCAFFOLD IN GRA- DO DI INDURRE LA CONFORMAZIONE <math>\beta</math>-TURN NEI POLIPEPTIDI.....</b>	<b>PAG 68</b>
<b>6. PARTE SPERIMENTALE DEI COMPOSTI ETEROCICLICI.....</b>	<b>PAG 73</b>
<b>6.1. SINTESI DI DERIVATI ETEROCICLICI A NUCLEO BENZOTRIAZINO- NICO E SACCARINICO DOTATI DI ATTIVITA' ANTIDIARROICA.....</b>	<b>PAG 74</b>
<b>6.1.1. PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DEI DERIVATI 2- CLOROETIL-1,2,3-BENZOTRIAZINONICI, 3-CLOROPROPIL-1,2,3-BENZO- TRIAZINONICI E 4-CLOROBUTIL-1,2,3-BENZOTRIAZINONICI.....</b>	<b>PAG 82</b>

<b>6.1.2. PROCEDURA GENERALE PER LA PREPARAZIONE DEI DERIVATI 3-[2, 3 O 4-(1-PIPERONIL-PIPERAZINA)-ALCHIL]-1,2,3-BENZOTRIAZIN-4(3H)-ONE.....</b>	<b>PAG 83</b>
<b>6.1.3. PROCEDURA GENERALE PER LA PREPARAZIONE DEI DERIVATI 2-CLOROALCHIL-1,2-BENZISOTIAZOLIN-3(2H)ONE-1,1-DIOSSIDI .....</b>	<b>PAG 84</b>
<b>6.1.4. PROCEDURA GENERALE PER LA PREPARAZIONE DEI DERIVATI 2-[3 O 4-(4-IDROSSI-4-FENIL-PIPERIDIN-1-IL)-ALCHIL]-1,2-BENZISOTIAZOLIN-3-(2H)ONE 1,1-DIOSSIDI.....</b>	<b>PAG 85</b>
<b>6.1.5. SALI CLORIDRATI: PROCEDURA GENERALE.....</b>	<b>PAG 86</b>
<b>6.2. APPLICAZIONE DELLE MICROONDE IN REAZIONI DI CONDENSAZIONE UTILIZZANDO AGENTI DISIDRATANTI DIRETTAMENTE ANCORATI AD UN SUPPORTO SOLIDO.....</b>	<b>PAG 87</b>
<b>7. CONCLUSIONI.....</b>	<b>PAG 91</b>