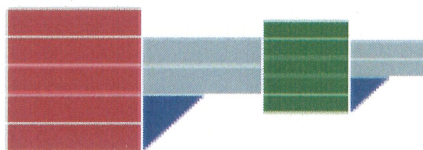


# UNIVERSITA' DELLA CALABRIA



*Dipartimento di Chimica*

---

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

*Corso di Dottorato in:*

**“Metodologie per lo sviluppo di molecole d’interesse farmacologico”**

(MDMP, XXII ciclo; CHIM-06)

## **Solvent-free, microwave assisted 1,3-cycloaddition of nitrones with vinylnucleobases for the synthesis of N,O- nucleosides**

**Maurizio D’Agostino**

*Maurizio D'Agostino*

*Supervisore*

Prof. Giovanni Sindona

*Coordinatore*

Prof. Bartolo Gabriele

---

A.A. 2009



## Indice

<b>Presentazione</b> .....	4
<b>1. Reazioni di cicloaddizione 1,3-dipolare di nitroni con olefine</b> .....	7
1.1 Aspetti teorici.....	7
1.1.1 Meccanismo e reattività.....	7
1.1.2 Regiochimica.....	13
1.1.3 Stereochimica.....	16
1.2 Applicazioni sintetiche.....	24
1.2.1 Nuovi dipolarofili.....	24
1.2.2 Azaeterocicli.....	28
1.2.3 Amminoacidi.....	32
1.2.4 Sintesi enantioselettive.....	36
<b>2. Nucleosidi modificati</b> .....	39
2.1 Nucleosidi modificati come agenti antivirali.....	39
2.2 Nucleosidi eterociclici.....	42
<b>3. Reazioni in condizioni non convenzionali: Liquidi Ionici</b> .....	45
3.1 Aspetti generali.....	45
3.2 Liquidi Ionici come solventi per reazioni.....	47
3.3 Liquidi Ionici come “solventi <i>green</i> ”.....	48
<b>4. Reazioni in condizioni non convenzionali: Microonde</b> .....	50
4.1 Introduzione.....	50
4.2 Principi fisici del riscaldamento a microonde.....	55
4.3 Apparecchiature per il riscaldamento a microonde.....	58
4.4 Generatori di potenza a microonde.....	58

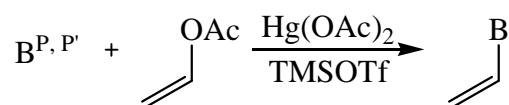
4.5	Linee di trasmissione.....	59
4.6	Applicatori di potenza a microonde.....	59
4.7	Dispositivi di sicurezza.....	61
	<b>Discussione dati sperimentali</b>	<b>63</b>
<b>5.</b>	<b>Cicloaddizioni di nitroni con vinilnucleobasi in liquido ionico e catalizzatore.....</b>	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>Liquidi ionici associati alle microonde nella cicloaddizione 1,3-dipolare tra nitroni e vinilnucleobasi.....</b>	<b>68</b>
<b>7.</b>	<b>Ciclizzazione 1,3-dipolare tra nitroni e vinilnucleobasi in condizioni “solvent free” e senza supporto inerte.....</b>	<b>80</b>
<b>8.</b>	<b>Saggi biologici.....</b>	<b>80</b>
8.1	Prove biologiche sui cicloaddotti ottenuti.....	81
8.2	Saggi biologici con il virus d’Epstein-Barr (EBV).....	82
8.3	Saggi biologici sui cicloaddotti ottenuti.....	82
<b>9.</b>	<b>Conclusioni.....</b>	<b>86</b>
<b>10.</b>	<b>Parte sperimentale.....</b>	<b>87</b>
10.1	Protocolli sintetici dei prodotti ottenuti.....	87
10.2	Caratterizzazione dei prodotti di reazione.....	109





## Abstract

There is an increasing interest in the synthesis of modified nucleosides in connection with their potential applications in antiviral and anticancer therapies. In particular, modified nucleosides have been proved to efficiently inhibit *in vitro* and *in vivo* virus infections caused by HIV, HBV and HTLV-1.<sup>1</sup> In a recent approach to modified nucleosides, the furanose ring was replaced with *N,O*-containing five membered heterocycles, in particular isoxazolidine and isoxazoline derivatives.<sup>2</sup> For this reason new routes for the synthesis of isoxazolidine based compounds are highly desirable, with 1,3-dipolar cycloadditions of nitrones being the most straightforward route to these derivatives.<sup>3</sup> Among the different strategies for the preparation of nucleosides using this protocol, the insertion of the nucleobase via nucleophilic substitution of a suitable leaving group on the isoxazolidinyl cycloadduct<sup>2</sup> or, alternatively, the cycloaddition reaction on an appropriate vinyl nucleobase acting as dipolarophile are the most used.<sup>4</sup> This latter strategy suffers, however, of two major drawbacks: i) the difficulty in obtaining *N*-vinyl derivatives of all nucleic acid bases and ii) the drastic experimental conditions necessary to obtain cycloaddition products in satisfactory yields. In recent years these limitations have been successfully overcome, and the whole set of *N*-vinyl nucleobases may now be prepared in a convenient, efficient and simple way, using trimethylsilyl trifluoromethane sulfonate as catalyst.<sup>5</sup>

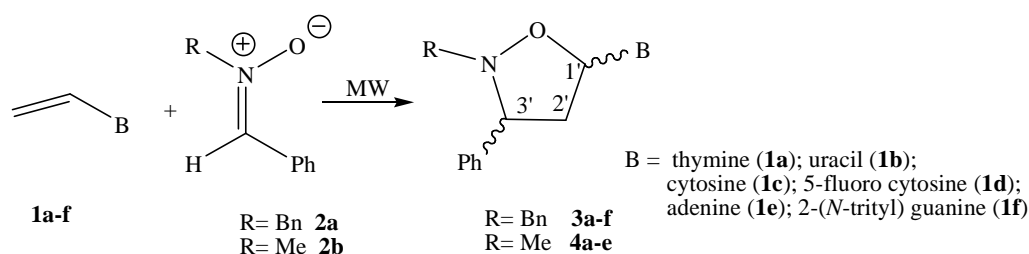


B = Thy, Cyt, Ura; P = P' = TMS.  
B = Ade; P = Bz.  
B = Gua; P = Ac; P' = Carbamoyl.

Scheme 1. Vinylation's reaction of a generic nucleobase.

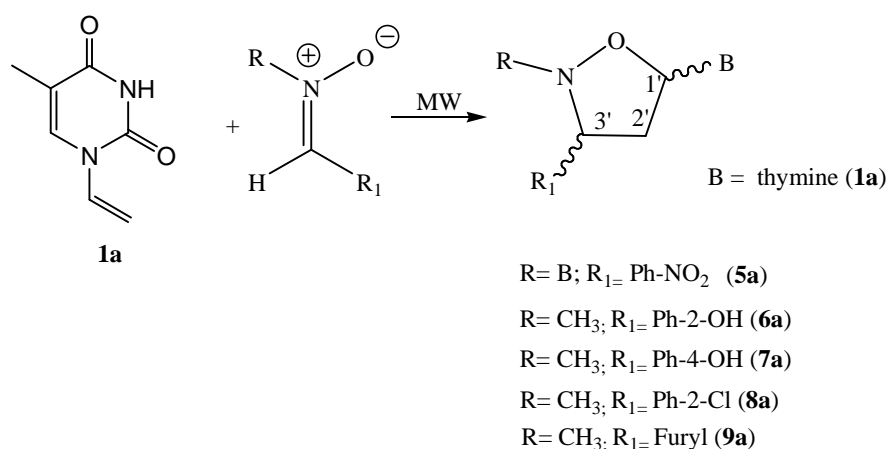
On the other hand, we have shown that 1,3-dipolar cycloadditions between nitrones and vinyl derivatives, including *N*-vinyl thymine, may be carried out at room temperature, in good yields and short reaction times, in ionic liquids, using Er(OTf)<sub>3</sub> as catalyst.<sup>6</sup>

We disclose here a further modification of this synthetic strategy consisting of a direct 1,3-dipolar cycloaddition between nitrones and vinyl nucleobases, assisted by microwave irradiation,<sup>7</sup> in the absence of solvent, in scheme 2 is presented the general reaction between some nucleobases and *N*-methyl-*C*-phenyl or *N*-benzyl-*C*-phenylnitronone:



Scheme 2. General reaction with *N*-benzyl/methyl-*C*-phenylnitronone.

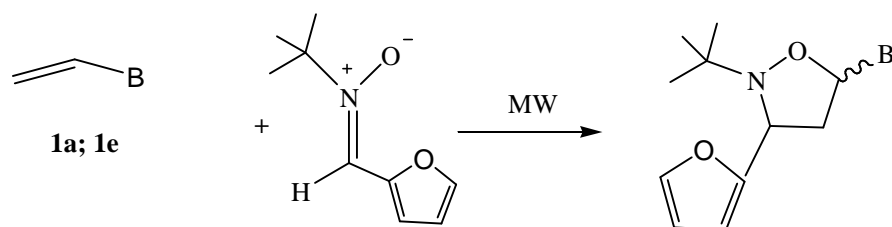
Then we have submitted the model reaction to others types of nitrones, with the aim to obtain substrates with a certain degree of biological effects:



Scheme 3. General reaction with others nitrones.



Finally, for improve the stereoselectivity of ours reactions, we have used a nitron with a bulky group:

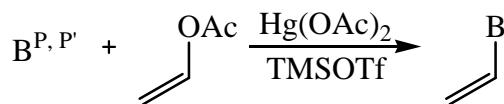


Scheme 4. Reaction between *N*-tert-butyl-*C*-furfurylnitron and *N*-vinylthymine or *N*-vinyladenine.

Notably, no protection is required for the vinyl nucleobases during cycloaddition and our products are currently under investigation to demonstrate their biological activity.

## Presentazione

Negli ultimi anni si è sviluppato un crescente interesse nei confronti dei nucleosidi modificati in relazione alla loro potenziale applicazione in terapie antivirali e antitumorali. In particolare, i nucleosidi modificati si sono dimostrati efficaci inibitori, sia in *vitro* sia in *vivo* tests, d'infezioni causate da virus come HIV, HBV e HTLV-1<sup>1</sup>. Recentemente, sempre in relazione ai nucleosidi modificati, l'anello furanosico dei nucleosidi naturali è stato sostituito con un analogo N,O-eterociclo a cinque, che riproduce una struttura isossazolidinica o d'isossazolina.<sup>2</sup> Anche per questo motivo sarebbe molto interessante riuscire ad avere nuove vie sintetiche che possano portare all'ottenimento di tali prodotti, considerando comunque la 1,3-cicloaddizione dipolare di nitroni con opportuni alcheni la via maggiormente seguita per la sintesi di tali strutture.<sup>3</sup> Tra le differenti strategie per la preparazione di nucleosidi modificati le più usate<sup>4</sup> sono o l'inserimento della nucleobase attraverso una sostituzione nucleofila di un adatto gruppo uscente presente sull'addotto isossazolidinico<sup>2</sup> o, alternativamente, la reazione di ciclizzazione su un'appropriata nucleobase precedentemente vinilata e che agirà da dipolarofilo. Questa seconda strategia, tuttavia, soffre di due importanti inconvenienti: i) la difficoltà di ottenere *N*-vinil derivati per tutte le nucleobasi e ii) le drastiche condizioni sperimentali necessarie per ottenere prodotti di ciclizzazione in rese accettabili. Recentemente la prima problematica è stata brillantemente superata e ad oggi un ampio set di *N*-vinil nucleobasi può essere preparato con una metodica semplice ed efficiente, usando il trimetilsililtrifluorometansolfonato come catalizzatore.<sup>5</sup>

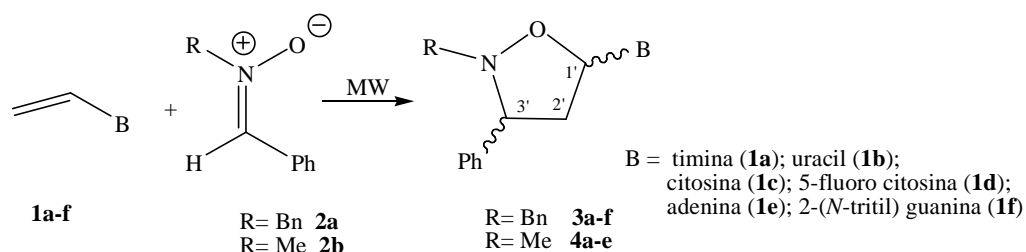


B = Thy, Cyt, Ura; P = P' = TMS.  
B = Ade; P = Bz.  
B = Gua; P = Ac; P' = Carbamoyl.

Schema 1. Reazione di vinilazione di una generica nucleobase.

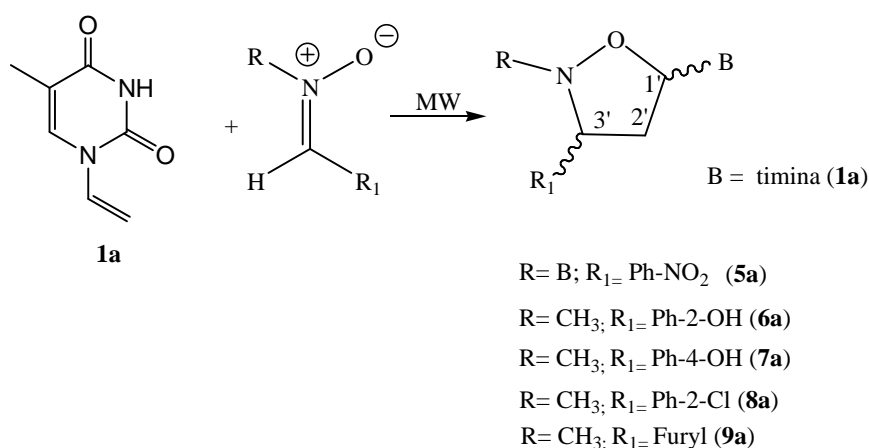
D'altra parte, noi nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato che la ciclizzazione 1,3-dipolare tra nitroni e vinil-derivati, inclusa la *N*-vinil timina, può essere condotta a temperatura ambiente, ottenendo buone rese e in tempi di reazione molto brevi, in Liquido Ionico e usando  $\text{Er}(\text{OTf})_3$  come catalizzatore.<sup>6</sup>

Tuttavia in questa tesi presentiamo un'ulteriore modifica di questa strategia sintetica che prevede la diretta ciclizzazione 1,3-dipolare tra nitroni e vinilnucleobasi con il solo utilizzo di microonde<sup>7</sup> e in assenza di solvente, nello schema 2 è presentata la reazione generale tra alcune nucleobasi e l'*N*-metil-*C*-fenil o *N*-benzil-*C*-fenilnitrono:



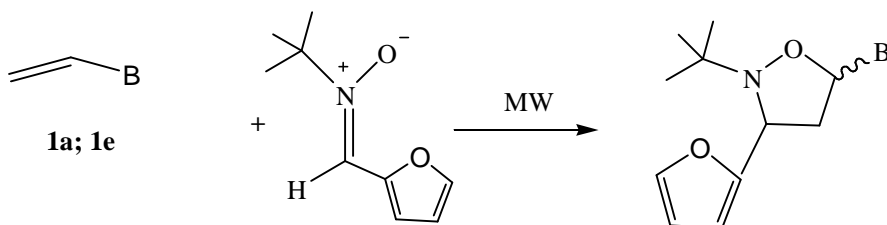
Schema 2. Reazione generale con vari substrati.

Poi abbiamo testato la reazione modello usando nitroni diversi, con lo scopo di ottenere dei prodotti potenzialmente attivi biologicamente:



Schema 3. Reazione generale con l'uso d'altri nitroni.

In ultimo, per migliorare la stereoselettività dei nostri prodotti, abbiamo usato un nitrone ingombrato stericamente:



Scheme 4. Reazione tra *N*-tert-butil-*C*-furfurilnitronio e *N*-viniltimina o *N*-viniladenina.

Molto importante è anche notare che non è richiesta alcuna protezione delle nucleobasi durante la ciclizzazione e che l'attività biologica di questi prodotti è attualmente allo studio.

# 1. Reazioni di cicloaddizione 1,3-dipolare di nitroni con olefine

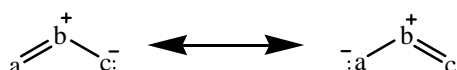
## 1.1 Aspetti teorici

### 1.1.1 Meccanismo e reattività

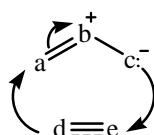
Le cicloaddizioni 1,3-dipolari costituiscono un valido approccio per la sintesi d'eterocicli pentatomici.

Queste reazioni consistono nell'aggiunta di un derivato 1,3-dipolare su un dipolarofilo.

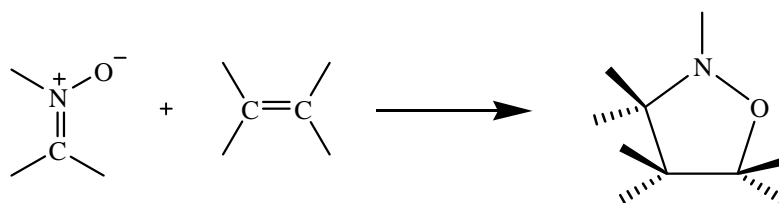
L'1,3-dipolo, limitandosi alle formule di risonanza che assegnano un otetto elettronico a tutti e tre gli atomi, può essere rappresentato come segue:



E' quindi un sistema zwitterionico in cui quattro elettroni  $\pi$  sono condivisi da tre centri; la carica positiva è localizzata sull'atomo centrale, quella negativa distribuita sui due atomi terminali. Il dipolarofilo, componente a due elettroni  $\pi$ , può in linea di principio essere un qualunque doppio o triplo legame. Utilizzando le classiche notazioni di Lewis, la reazione può essere rappresentata come segue:

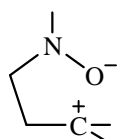


La reazione di cicloaddizione tra nitroni (1,3-dipoli) ed alcheni (dipolarofili) consente la formazione di N-O eterocicli a struttura isossazolidinica:

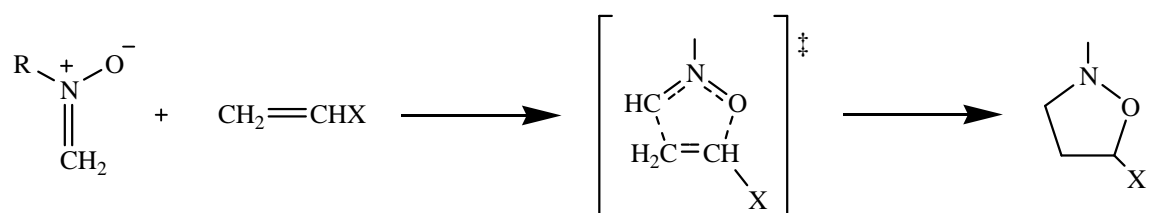


La cicloaddizione tra nitroni ed olefine può, in principio, essere concertata o procedere attraverso più stadi. Sono stati proposti per il processo tre possibili meccanismi: (a) meccanismo concertato a quattro centri, (b) meccanismo radicalico e (c) meccanismo zwitterionico.

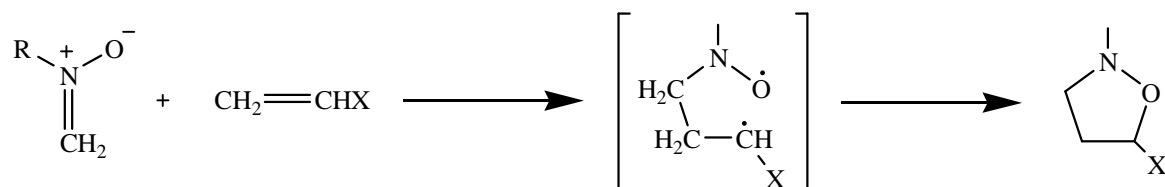
Le reazioni di cicloaddizione tra nitroni ed alcheni in genere dipendono molto poco dalla natura del solvente.<sup>8,9</sup> Questa osservazione esclude la possibilità che la reazione proceda attraverso un intermedio zwitterionico del tipo di seguito indicato:



Secondo il meccanismo monostadio, proposto da Huisgen,<sup>10</sup> i reagenti si avvicinano su due piani paralleli e i due nuovi legami  $\sigma$  si formano in modo concertato, ma non necessariamente sincrono:



Il meccanismo radicalico, proposto da Firestone<sup>11</sup> prevede che la cicloaddizione avvenga attraverso due stadi: (i) formazione dell'intermedio biradicalico e (ii) ciclizzazione.



Le cicloaddizioni nitrone-alchene sono stereospecifiche, nel senso che la stereochimica presente sul dipolarofilo si conserva nell'isossazolidina. Per giustificare questa

stereospecificità tramite un meccanismo radicalico si deve supporre che per i biradicali in conformazione **A** (Figura 1.1) la ciclizzazione sia più rapida della rotazione intorno al legame a, e per i biradicali estesi **B** (Figura 1.1) la scissione del legame b sia più rapida della rotazione intorno ad a.<sup>10a</sup>

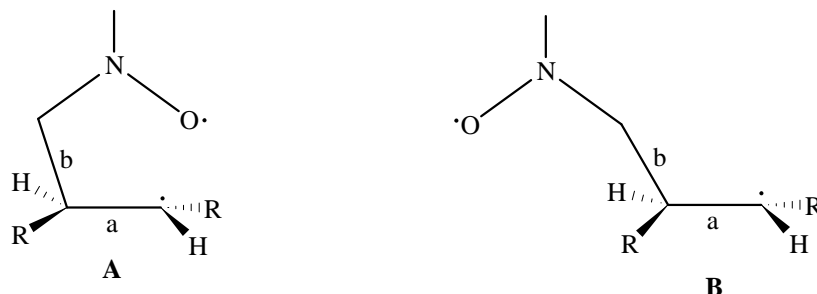


Figura 1.1. Giustificazione alla stereospecificità nelle cicloaddizioninitrone-alcene.

La stereospecificità della reazione si giustifica, invece, con l'ipotesi di un meccanismo monostadio passante attraverso uno stato di transizione simmetrico o quasi simmetrico.

Ulteriori evidenze a favore del meccanismo concertato derivano da studi sulla relazione tra reattività e struttura del dipolarofilo<sup>10b,c</sup> e da misure dell'effetto isotopico <sup>14</sup>C nella cicloaddizione 1,3-dipolare tra lo stirene (Ph<sup>14</sup>CH=CH<sub>2</sub> o PhCH=<sup>14</sup>CH<sub>2</sub>) e l'*N*, $\alpha$ -difenilnitrone marcato sul carbonio  $\alpha$ .<sup>10d</sup>

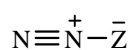
Il meccanismo radicalico è infine completamente escluso dai calcoli sugli orbitali molecolari di frontiera (FMO) che giustificano in modo soddisfacente reattività, regio e stereochimica della cicloaddizione, confermando in modo definitivo l'ipotesi meccanicistica di Huisgen.

Allorché due molecole reagiscono in un processo di cicloaddizione, l'espressione per la variazione d'energia del sistema è la somma di tre termini: (i) un termine di destabilizzazione dovuto alla repulsione tra i gusci elettronici, (ii) uno di interazione columbiana e (iii) uno di sovrapposizione orbitalica.<sup>12</sup>

Se ci si limita ad una discussione qualitativa i primi due termini possono essere trascurati. L'ultimo termine esprime in modo quantitativo il concetto che il guadagno energetico associato alla formazione di un legame è maggiore quanto più gli orbitali interagenti sono vicini in energia ed alto il loro integrale di sovrapposizione. Si può quindi con buona approssimazione considerare che a quest'ultimo termine contribuisca

in modo determinante solo l'interazione tra gli orbitali di frontiera (HOMO e LUMO) dei due reagenti. Il metodo degli orbitali molecolari di frontiera è stato per la prima volta applicato alle cicloaddizioni 1,3-dipolari da Houk.<sup>13,14</sup> Recentemente questi, grazie a una nuova e superiore accuratezza nei calcoli quantomeccanici impiegando il metodo multicomponente CBS-QB3 ha proposto un nuovo modello energetico di distorsione/interazione per la reattività delle cicloaddizioni 1,3-dipolari.<sup>15</sup> In uno studio successivo il ricercatore ha redatto una relazione completa di tale modello basato sull'attivazione e sulle entalpie di reazione calcolate per i dipoli **1.1-1.9** (mostrati sotto) con etilene e acetilene.<sup>16</sup>

#### Diazonium Betaines



**1.1** Z = O, Nitrous Oxide

**1.2** Z = NH, Hydrazoic Acid

**1.3** Z = CH<sub>2</sub>, Diazomethane

#### Nitrilium Betaines

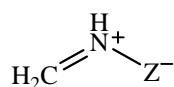


**1.4** Z = O, Fulminic Acid

**1.5** Z = NH, Formonitrile Imine

**1.6** Z = CH<sub>2</sub>, Formonitrile Ylide

#### Azomethine Betaines



**1.7** Z = O, Methylene Nitron

**1.8** Z = NH, Formoazomethine Imine

**1.9** Z = CH<sub>2</sub>, Formoazomethine Ylide

Sustmann<sup>17</sup> ha distinto i processi di cicloaddizione in tre tipi (Figura 1.2). Nel primo (tipo I, HO-controllata) l'interazione maggiore è quella tra l'HOMO del dipolo e il LUMO del dipolarofilo. Nel tipo III (LU-controllata) l'interazione maggiore si ha tra il LUMO del dipolo e l'HOMO del dipolarofilo. Nel caso delle cicloaddizioni 1,3-dipolari del tipo II le energie degli orbitali di frontiera di dipolo e dipolarofilo



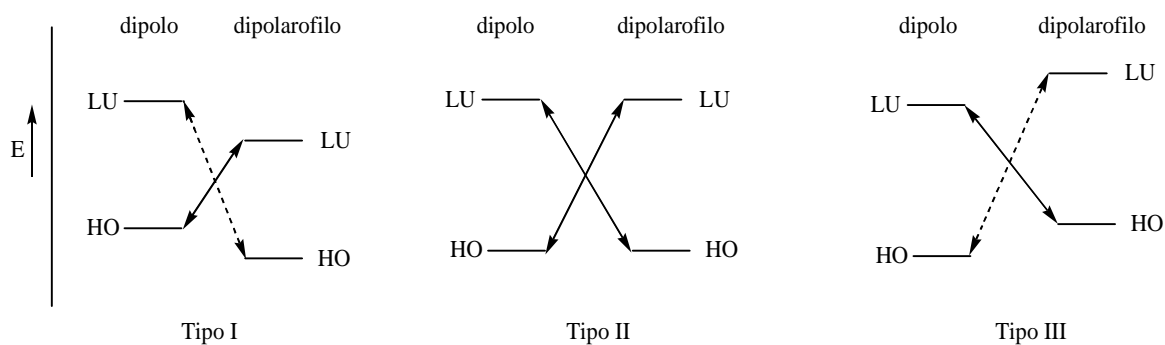


Figura 1.2. Suddivisione dei processi di cicloaddizione secondo Sustmann.

sono tali che entrambe le interazioni [HOMO (dipolo)-LUMO (dipolarofilo) e LUMO (dipolo)-HOMO (dipolarofilo)] sono possibili.

Le cicloaddizioni 1,3-dipolari di nitroni ed olefine sono processi del tipo II, in questo caso quindi quale sia l'interazione dominante dipende dalla natura del dipolo e del dipolarofilo.

In Figura 1.3 sono indicate le energie degli FMO di N-metil-C-fenil nitrone e varie olefine. La cicloaddizione tra il nitrone e il propene è LU-controllata [ $\Delta E(\text{LUMO}(\text{dipolo})-\text{HOMO}(\text{dipolarofilo})) = 9.48 \text{ eV}$ ]; l'interazione alternativa, HOMO (dipolo)-LUMO (dipolarofilo), è meno significativa in quanto la differenza di energia tra questi due FMO è di 10.38 eV. LU-controllata è anche la reazione tra il nitrone e il metil vinil etere ( $\Delta E_{\text{min}} = 8.65 \text{ eV}$ ). L'interazione dominante nel caso dell'acrilato di metile ( $\Delta E_{\text{min}} = 8.6 \text{ eV}$ ) e del nitroetilene ( $\Delta E_{\text{min}} = 7.9 \text{ eV}$ ) è quella HOMO (dipolo)-LUMO (dipolarofilo). In accordo con i dati sperimentali si può prevedere il seguente ordine di reattività: nitroetilene > acrilato di metile > metil vinil etere > propene.

Le energie degli HOMO sono correlate ai potenziali di ionizzazione della molecola; all'aumento del potenziale corrisponde una diminuzione dell'energia dell'HOMO e viceversa. Le energie dei LUMO possono essere calcolate o stimate dai potenziali di riduzione. In generale si osserva che gruppi elettrone-attrattori diminuiscono le energie di HOMO e LUMO, l'ultimo più del primo; gruppi elettrone-donatori aumentano le energie degli FMO, dell'HOMO più che del LUMO; in alcheni coniugati l'energia dell'HOMO aumenta, quella del LUMO diminuisce.

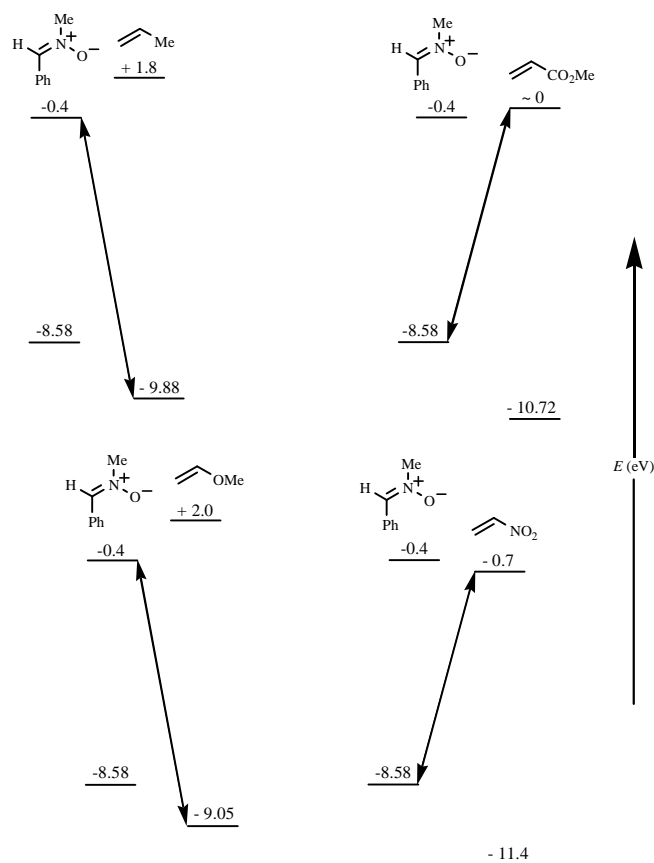
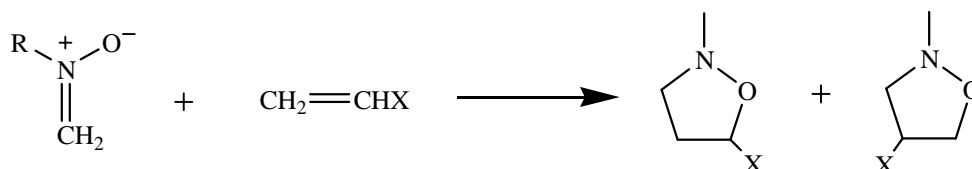


Figura 1.3. Energie degli FMO di *N*-metil-*C*-fenil nitrone e varie olefine.

Di conseguenza, a parità di nitrone, gruppi elettron-attrattori sull'olefina accelerano la cicloadizione abbassando, rispetto all'idrocarburo corrispondente, l'energia del LUMO e favorendo quindi la reazione HO-controllata. Gruppi elettron-donatori, invece, aumentano l'energia dell'HOMO, favorendo la reazione LU-controllata. Anche la reattività dei nitroni può essere spiegata sulla base dell'effetto dei sostituenti sulle energie dei livelli HOMO e LUMO. Si è ad esempio osservato che i *C*-benzoilnitroni sono dipoli particolarmente reattivi; l'introduzione di un gruppo benzoile sull'atomo di carbonio  $\alpha$  del nitrone aumenta, rispetto al corrispondente nitrone alchil sostituito, l'energia dell'HOMO e stabilizza il livello del LUMO. Risultano accelerate quindi sia le reazioni HO che quelle LU-controllate.<sup>18</sup>

### 1.1.2 Regiochimica

In linea di principio la reazione tra un nitrone ed un'olefina monosostituita può portare alla formazione di due isossazolidine regioisomeriche:



In realtà però molto spesso queste reazioni sono caratterizzate da elevata regioselettività; infatti, allorché sul dipolarofilo è presente un gruppo elettron-donatore, la reazione è regiospecifica e porta alla formazione dell'isossazolidina 5-sostituita. Se il dipolarofilo è sostituito con gruppi fortemente elettron-attrattori si ottiene preferenzialmente o esclusivamente l'addotto 4-sostituito. Si è dimostrato che più il dipolarofilo è elettron-deficiente più aumenta la selettività verso l'isossazolidina 4-sostituita.<sup>19</sup>

La regiochimica della cicloadizione può essere spiegata sulla base della teoria FMO. A tal fine è necessario considerare i coefficienti associati agli orbitali atomici (AO) degli FMO del dipolo e del dipolarofilo. L'interazione che prevale nello stato di transizione è quella che si instaura tra gli orbitali atomici cui sono associati, negli FMO coinvolti nel processo, coefficienti paragonabili. In Figura 1.4 sono indicati, per dipolo e dipolarofilo, i contributi degli orbitali atomici ai rispettivi orbitali di frontiera.

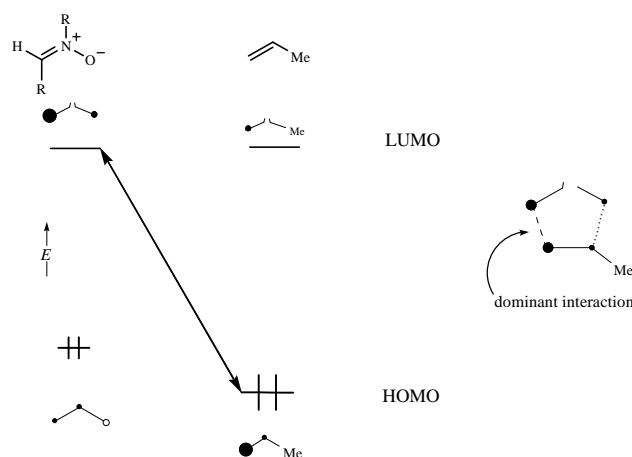


Figura 1.4. Contributi degli orbitali atomici ai rispettivi orbitali di frontiera per dipolo e dipolarofilo.

L'interazione dominante in questo caso è quella tra il LUMO del dipolo e l'HOMO del dipolarofilo. Poiché il processo di cicloadizione porta alla formazione di un legame C-C e di un legame C-O ci si può limitare a considerare il contributo agli FMO degli orbitali atomici di questi centri.

Per il livello LUMO del nitrone il coefficiente AO è maggiore sul carbonio che non sull'ossigeno, per l'HOMO del propene il coefficiente maggiore è associato al carbonio non sostituito. Nello stato di transizione è quindi favorita l'interazione tra il carbonio del nitrone e il carbonio terminale dell'olefina; si ottiene di conseguenza l'isossazolidina 5-sostituita.

Per dipolarofili fortemente elettron-deficienti la cicloadizione è HO-controllata. L'orientazione favorita nello stato di transizione porta all'isossazolidina 4-sostituita (Figura 1.5):

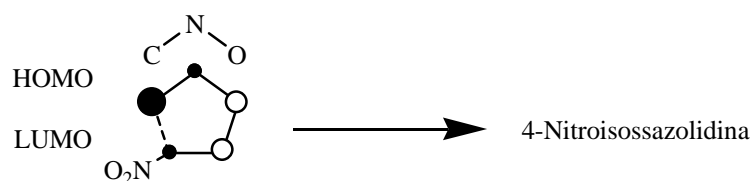


Figura 1.5. Orientazione favorita nello stato di transizione in cicloadizioni con dipolarofili fortemente elettron-deficienti.

Se sul dipolarofilo sono presenti gruppi elettron-attrattori del tipo -COOR, -CN, -COR, -COH, si formano per lo più miscele di isossazolidine regio isomeriche.

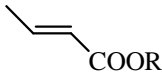
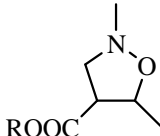
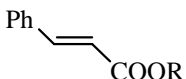
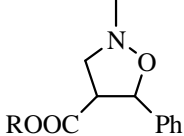
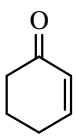
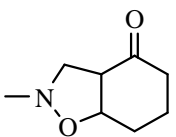
Nel caso della cicloadizione tra N-metil C-fenil nitrone e acrilati<sup>176</sup> l'interazione che controlla la reattività è quella tra HOMO (dipolo)-LUMO (dipolarofilo); ne dovrebbe risultare l'addotto 4-sostituito. Sperimentalmente si osserva la formazione di una miscela di prodotti in cui prevale l'isossazolidina 5-sostituita. Si suppone che sebbene l'interazione HOMO (dipolo)-LUMO (dipolarofilo) determini la reattività per dipolarofili moderatamente elettron-deficienti, quella LUMO (dipolo)-HOMO (dipolarofilo) controlli la regiochimica.<sup>18,21</sup> Nel livello LUMO del dipolo i coefficienti degli AO sul carbonio e sull'ossigeno sono differenziati in modo più netto che non

nell'HOMO, da ciò si ritiene derivi l'influenza del primo sulla regiochimica della reazione. Allorché, con l'introduzione di gruppi più fortemente elettron-attrattori, si abbassa ulteriormente l'energia del livello HOMO (dipolarofilo), anche la regioselettività della reazione è controllata dall'interazione HOMO (dipolo)-LUMO (dipolarofilo).

La reazione tra nitroni e vinilidene porta alla formazione di isossazolidine 5,5-disostituite; il cicloaddotto 4,4-disostituito si ottiene solo a partire da olefine con un gruppo fortemente elettron-attrattore (tipo  $-\text{NO}_2$ ) o due moderatamente elettron-attrattori.<sup>22</sup>

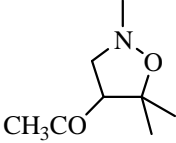
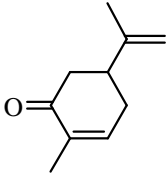
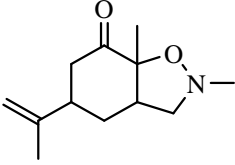
Interessante è anche la regioselettività della reazione di nitroni con olefine asimmetricamente 1,2-disostituite: se uno solo dei sostituenti è elettron-attrattore, questo, in genere, occupa la posizione 4 del cicloaddotto. Quando i due gruppi presenti sul dipolarofilo hanno effetto elettronico paragonabile si ottiene una miscela di regioisomeri.<sup>23</sup> Nella Tabella 1.1 è indicato per una serie di olefine disostituite l'orientazione preferenziale della cicloaddizione con nitroni.

**Tabella 1.1:** Orientazione preferenziale della cicloaddizione con nitroni per una serie di olefine disostituite.

Dipolarofilo	Isossazolidina
	
	
	

Nel caso di olefine trisostituite in genere il carbonio più elettron-deficiente del dipolarofilo si lega al carbonio del nitrone.<sup>24</sup> Alcuni esempi sono riportati in Tabella 1.2.

**Tabella 1.2:** Orientazione preferenziale della cicloaddizione con nitroni per una serie di olefine trisostituite.

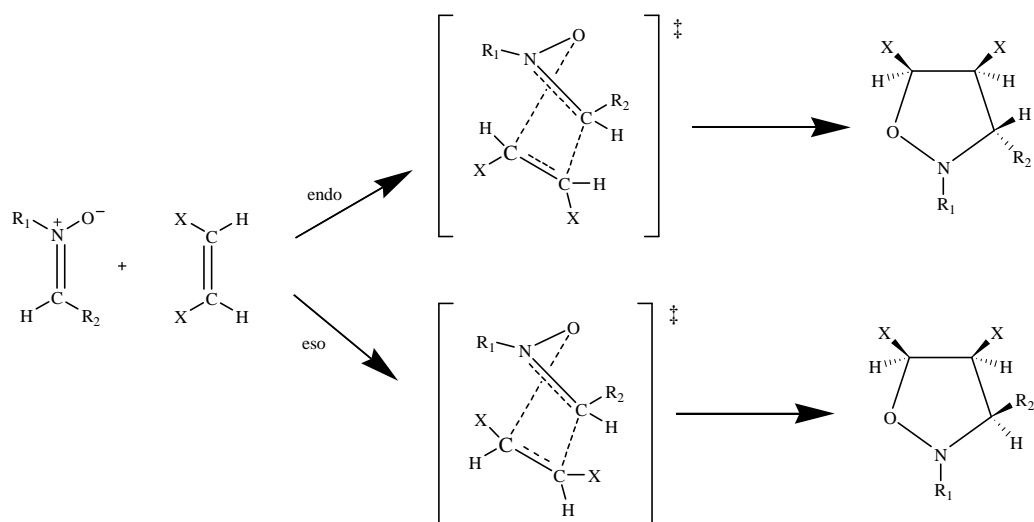
Dipolarofilo	Isossazolidina
$\text{MeCO}-\text{CH}=\text{CMe}_2$	
	

Poco comuni sono le reazioni di cicloaddizione tra nitroni ed alcheni tetrasostituiti; l'andamento regiochimico è comunque simile a quello discusso per alcheni asimmetricamente 1,2-disostituiti.<sup>25</sup>

### 1.1.3 Stereochimica

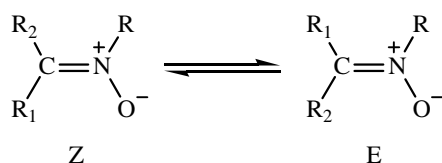
Molti studi sono stati condotti per razionalizzare i fattori che determinano la stereochimica della cicloaddizione tra nitroni ed olefine. E' noto che nel corso della reazione i due addendi si avvicinano disponendosi su due piani paralleli,<sup>10</sup> come conseguenza l'addizione del nitrone all'olefina avviene con stereospecificità cis.

Come indicato di seguito, per tali reazioni sono possibili due diversi stati di transizione, indicati rispettivamente come endo ed eso:



Nello stato di transizione endo il sostituito sull'azoto del nitrone e quelli sull'olefina si trovano dalla stessa parte del piano individuato dagli atomi interagenti (C3, C4, C5, O); nello stato di transizione eso i sostituenti sul dipolarofilo e quello sull'azoto nitronico si trovano da parti opposte del piano. I prodotti endo ed eso chiaramente sono diastereomerici; ognuno di essi esiste, a sua volta, come miscela racemica di due enantiomeri.

Per i nitroni asimmetricamente sostituiti sul  $C_\alpha$  sono possibili due diverse configurazioni:

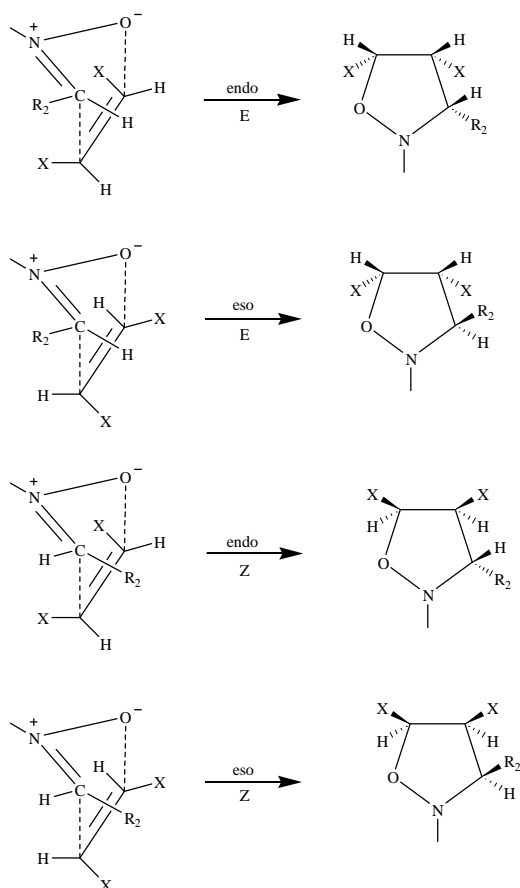


Se tale equilibrio si instaura nel corso della cicloadizione, si devono considerare quattro possibili stati di transizione; ovvero per ognuno dei due isomeri del nitrone è possibile, come indicato nella pagina seguente, un attacco eso ed uno endo sull'olefina.

Nella figura sono riportati i prodotti derivanti dall'attacco del nitrone su una "faccia" dell'olefina, ma, chiaramente, l'attacco sull'altra è, per reagenti achirali, ugualmente possibile; ne consegue quindi che gli stati di transizione endo-E ed eso-Z portano alla stessa miscela racemica di prodotti, lo stesso si può dire per ciò che riguarda gli stati di transizione eso-E ed endo-Z.

Il  $\Delta G$  di attivazione per l'interconversione  $Z \rightleftharpoons E$  è approssimativamente di  $30 \text{ kcal mol}^{-1}$ ; quindi, sebbene esista tra i due isomeri una significativa barriera energetica, essa non è però sufficientemente alta da impedire l'interconversione tra le due forme. Nelle condizioni sperimentali generalmente utilizzate per le cicloaddizioni possono quindi essere presenti, soprattutto se il dipolarofilo non è molto reattivo, entrambi gli isomeri del nitrone. Si è evidenziato inoltre che i due isomeri si addizionano alle olefine con diversa velocità; quello E, termodinamicamente più instabile, risulta essere il più reattivo.

Ai fini dell'interpretazione del decorso stereochimico della cicloaddizione è importante stabilire quale sia la configurazione del nitrone allorché reagisce con l'olefina; la possibilità di interconversione  $Z \rightleftharpoons E$  chiaramente complica questo tipo di analisi. La stereochimica delle cicloaddizioni dipende da vari fattori, particolarmente influenti sono: effetti sterici, interazioni orbitaliche secondarie, possibilità di formazione di legami ad idrogeno tra gli addendi e interazioni elettrostatiche del tipo dipolo-dipolo.





Per evidenziare l'effetto delle interazioni orbitaliche secondarie si può considerare la reazione tra C-benzoil N-fenil nitrone e maleato di metile (Figura 1.6).

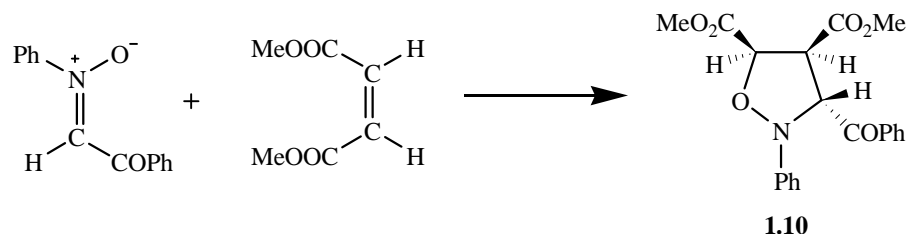


Figura 1.6. Reazione tra il C-benzoil-N-fenil nitrone e il maleato di metile.

La reazione porta alla formazione di una miscela racemica dell'isossazolidina **1.10** e del suo enantiomero. Questo dato può essere interpretato esaminando, dal punto di vista FMO, lo stato di transizione del processo (Figura 1.7).

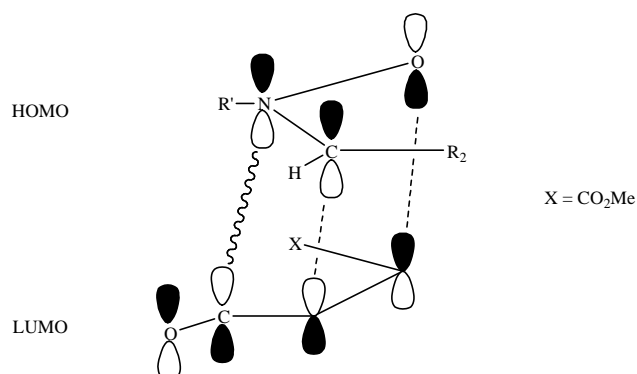


Figura 1.7. Stato di transizione della reazione tra il C-benzoil-N-fenil nitrone e il maleato di metile.

L'interazione dominante tra questo dipolarofilo elettrone-deficiente e il nitrone dovrebbe essere quella HO-controllata. Come indicato in figura la sovrapposizione tra l'HOMO (dipolo) e il LUMO (dipolarofilo) è favorita, nello stato di transizione endo, dall'interazione orbitalica secondaria tra l'azoto nitronico e il carbonio carbonilico dell'olefina; tale interazione non è possibile per un approccio eso tra gli addendi;<sup>26</sup> ne risulta quindi la formazione del solo addotto endo **1.10**.

La reazione tra C,N-difenil nitrone e maleato di metile è stereoselettiva; anche in questo caso le interazioni orbitaliche secondarie tra l'azoto nitronico e il carbonio carbonilico dell'olefina favoriscono lo stato di transizione endo.<sup>26</sup>

Nella Figura 1.8 è riportata la reazione tra il tetraidropiridin-N-ossido e olefine monosostituite:<sup>27</sup>

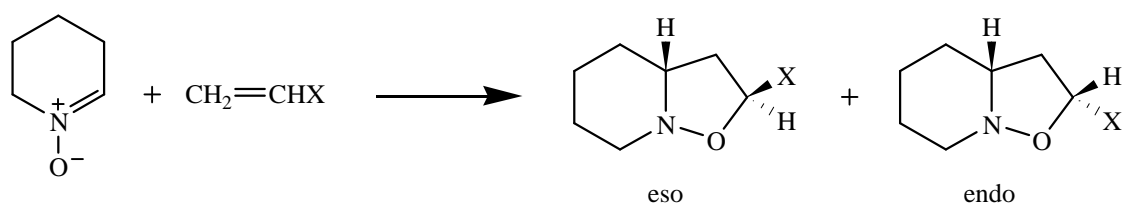


Figura 1.8. Reazione tra il tetraidropiridin-N-ossido e olefine monosostituite.

Il nitrone è chiaramente bloccato nella configurazione E, i possibili stati di transizione del processo sono indicati in Figura 1.9:



Figura 1.9. Possibili stati di transizione della reazione tra il tetraidropiridin-N-ossido e olefine monosostituite.

La reazione tra questo nitrone e il propene porta esclusivamente alla formazione dell'addotto eso. Non essendo infatti possibili interazioni orbitaliche secondarie, lo stato di transizione eso, meno compresso stericamente, risulta maggiormente stabilizzato. L'addotto eso prevale anche nella reazione con l'acrilato di metile (eso:endo 80:20), in questo caso quindi i fattori sterici prevalgono sulle interazioni orbitaliche secondarie.

La reazione tra il C-*p*-metossifenil N-fenil nitrone e il crotonato di metile (Figura 1.10)





La reazione avviene esclusivamente sul doppio legame più reattivo; anche in questo caso si ha iniziale isomerizzazione Z-E e quindi cicloaddizione del più reattivo nitrone E.

La reazione tra il cis-3-ciclobuten-1,2-diolo e il 3,4-diidroisochinolin N-ossido porta in modo altamente selettivo alla formazione dell'addotto sin, l'addotto anti è presente solo in tracce (Figura 1.15).<sup>31,32</sup>

Analogo decorso stereochimico ha la reazione tra questo dipolarofilo e altri nitroni ciclici e non.

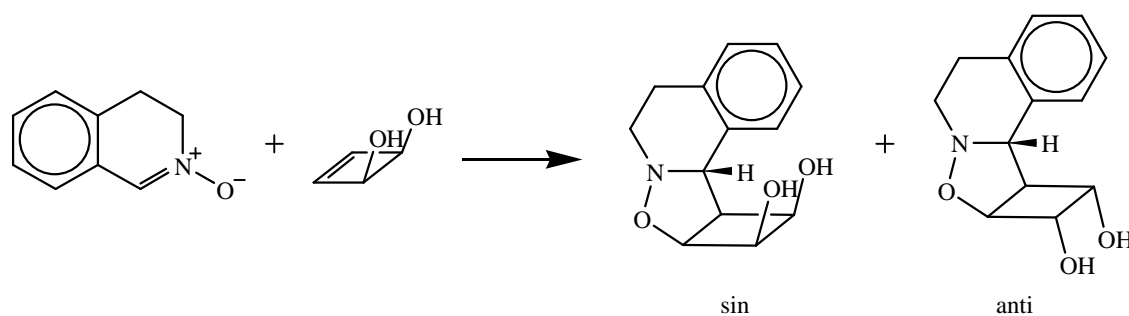


Figura 1.15. Reazione tra il cis-3-ciclobuten-1,2-diolo e il 3,4-diidroisochinolin N-ossido.

Dal punto di vista sterico è chiaro che l'attacco sin è fortemente sfavorito; esso però può essere stabilizzato dalla formazione di un legame ad idrogeno tra l'ossigeno nitronico e il gruppo ossidrilico ad esso più vicino (Figura 1.16).

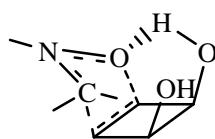


Figura 1.16. Stabilizzazione mediante legame ad idrogeno nell'attacco sin nella reazione tra il cis-3-ciclobuten-1,2-diolo e il 3,4-diidroisochinolin N-ossido.

Questa ipotesi è confermata dall'osservazione che in solventi polari protici, in grado di interagire con il nitrone e l'ossidrilico dell'olefina, si ottengono percentuali paragonabili dei due isomeri sin e anti.

## 1.2 Applicazioni sintetiche

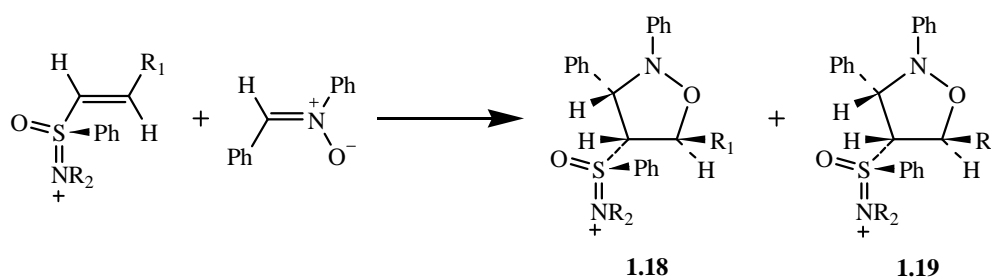
Negli ultimi anni la reazione di cicloaddizione 1,3-dipolare tra nitroni ed olefine ha avuto innumerevoli applicazioni sintetiche, tale processo consente infatti di ottenere in modo regio e stereoselettivo eterocicli pentaatomici, introducendo contemporaneamente sull'anello vari tipi di sostituenti. Le isossazolidine prodotte possono essere, a loro volta, utilizzate come precursori di molecole complesse, composti naturali o biattivi. Al fine di evidenziare la versatilità di questo processo vengono di seguito riportati alcuni recenti esempi della sua applicazione.

### 1.2.1 Nuovi dipolarofili

Le vinilsolfossimmine sono state recentemente utilizzate come dipolarofili in cicloaddizioni 1,3-dipolari con nitroni.<sup>33</sup>

Nella Tabella 1.3 e nello Schema 1.1 è indicato l'andamento della loro reazione con il C,N-difenil nitrone.

Le reazioni sono altamente regioselettive e danno solo 4-solfonimidoilisossazolidine come miscela racemica dei due cicloaddotti diastereomerici **1.18** e **1.19**. Il rapporto tra i prodotti è cineticamente controllato, esso infatti non varia in modo significativo nel corso della reazione.



Schema 1.1. Reazione tra la vinilsolfossimmina e il C,N-difenil nitrone.

**Tabella 1.3:** Andamento delle reazioni tra vinilsolfossimmine e C,N-difenil nitrone.

Vinilsolfossimmine		Rapporto 1.18:1.19
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
H	Tos	65:35
Me	Tos	64:36
Ph	Tos	67:33
Ph	2,4,6-( <i>i</i> -Pr) <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	75:25
Ph	Me	47:53

Come indicato in Tabella 1.3, la diastereoselettività della reazione delle N-tosilvinilsolfossimmine con il nitrone è indipendente dalla natura del sostituito R<sup>1</sup>. In generale la stereoselettività della reazione, sebbene resti sempre modesta, aumenta all'aumentare dell'ingombro sterico di R<sup>2</sup>; la selettività più bassa si osserva infatti per R<sup>2</sup> = Me, la più alta per R<sup>2</sup> = 2,4,6-(*i*-Pr)<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>.

La conformazione a minore energia della solfossimmina è quella in cui l'ossigeno è approssimativamente sin coplanare all'idrogeno β-vinilico (Figura. 1.17).<sup>34</sup> Si ritiene che il dipolarofilo si mantenga in questa conformazione anche nello stato di transizione della cicloaddizione, la stereochimica del processo si spiega supponendo che l'attacco del nitrone avvenga in modo endo di preferenza sulla faccia meno impedita dell'alchene, ovvero anti rispetto al gruppo S-fenile (Figura 1.17).

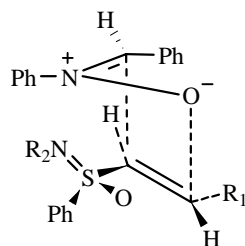


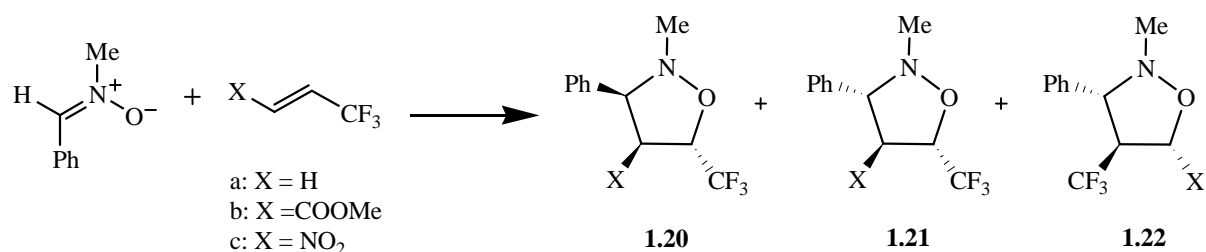
Figura 1.17. Conformazione a minore energia di una generica vinilsolfossimmina.

Da tempo è nota l'attività biologica degli eterocicli trifluorometilati;<sup>35</sup> essi vengono utilizzati come farmaci e fitofarmaci, hanno infatti proprietà antimicotiche, antitumorali

e antivirali.

Per la sintesi di questi eterocicli si ricorre a cicloaddizioni 1,3-dipolari. Inizialmente si sono utilizzati dipoli trifluorometilati;<sup>6,38</sup> più recente è l'impiego di olefine trifluorometilate.

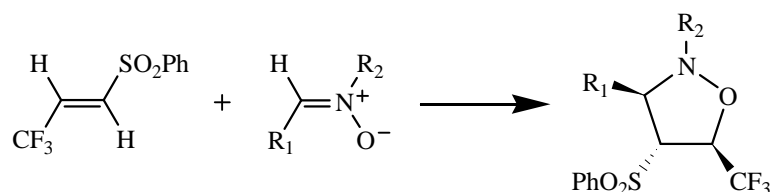
La reazione del C-fenil N-metil nitrone con 3,3,3-trifluoropropene<sup>39</sup> (Schema 1.2) fornisce una miscela di trans e cis 3-fenil-5-trifluorometilisossazolidine (**1.20a** e **1.21a**) e del loro regioisomero **1.22a**. I prodotti **1.20a**, **1.21a**, **1.22a** si ottengono nel rapporto 50:23:27. Analogamente procede la reazione del C-fenil N-metil nitrone con il 4,4,4-trifluoro-2-butenato (**1.20b**:**1.21b**:**1.22b** = 57:29:17). Se si utilizza come dipolarofilo il 3,3,3-trifluoro-1-nitropropene la reazione procede in modo regiospecifico e fornisce le 5-trifluorometilisossazolidine **1.20c** e **1.21c** in rapporto 69:31.



Schema 1.2. Reazione tra il C-fenil-N-metil nitrone e il 3,3,3-trifluoropropene.

Calcoli sugli FMO del nitrone e delle olefine trifluorometilate fanno supporre che queste cicloaddizioni siano HO-controllate. Come precedentemente osservato, in presenza di un gruppo non fortemente elettrone-attrattore sull'olefina la cicloaddizione non procede in modo altamente regioselettivo; con un'olefina più elettrone-deficiente la reazione è invece regio specifica.

Utilizzando come dipolarofilo l'1,1,1-trifluorometil-3-fenilsolfonilpropene la cicloaddizione procede, indipendentemente dal nitrone impiegato, in modo regio e stereospecifico (Schema 1.3).<sup>40</sup>



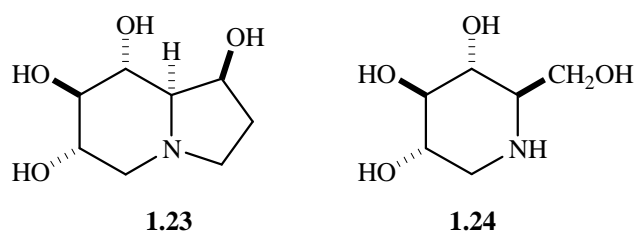
Schema 1.3. Cicloaddizione tra l'1,1,1-trifluorometil-3-fenilsolfonilpropene e un generico nitrone.



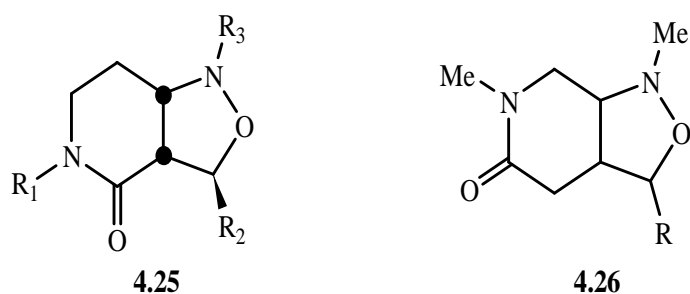


## 1.2.2 Azaeterocicli

Le cicloaddizioni 1,3-dipolari di nitroni ed olefine hanno trovato da tempo ampia applicazione nella sintesi di azaeterocicli come precursori di alcaloidi.<sup>41</sup> Nuovo impulso alla ricerca in questo campo viene dalle recenti scoperte sull'attività biologica di indolizidine e piperidine poliossidrilate,<sup>42</sup> come la castanospermina **1.23** e la deossinojrimicina **1.24**.

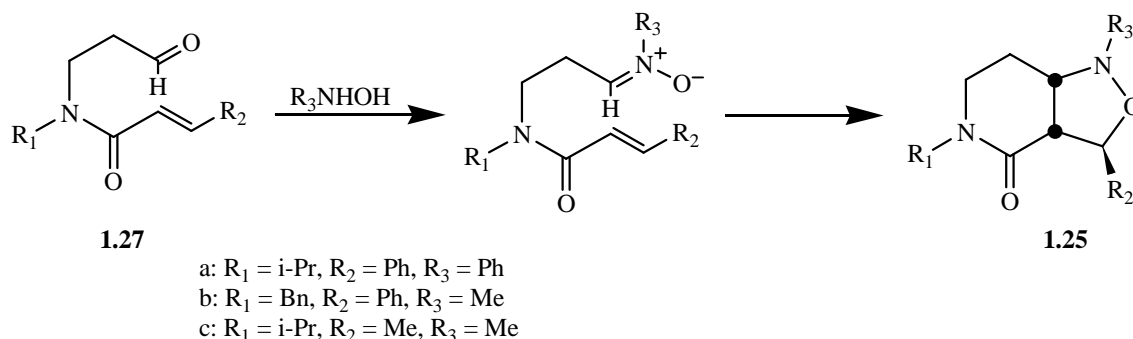


La capacità di questa classe di molecole di modulare in vivo la chimica degli oligosaccaridi in mammiferi, insetti e piante la pone come candidata per un range estremamente ampio di applicazioni: per esempio nella cura del diabete, nel controllo della crescita delle piante e nella lotta contro i loro parassiti. Si è inoltre verificato che alcune indolizidine e piperidine poliossidrilate inibiscono in vitro la replicazione e la citotossicità dell'HIV. Nel contesto appena delineato si inseriscono le sintesi dei lattami **1.25** e **1.26**.<sup>43</sup>



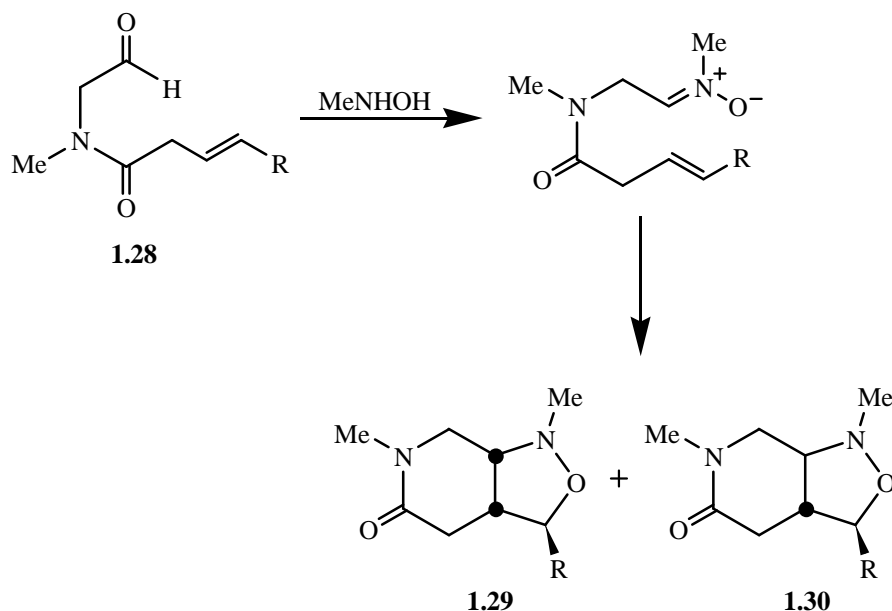
I primi sono stati ottenuti a partire dall'aldeide **1.27** (Schema 1.4), che trattata con idrossilammine sostituite, in EtOH a refluxo, fornisce i cicloaddotti **1.25a-c**. La cicloaddizione procede in modo regio e stereospecifico, si ottengono infatti

esclusivamente isossazolidine 5-sostituite, con giunzione cis tra l'anello isossazolidinico e il lattame.



Schema 1.4. Sintesi dei lattami **1.25**.

Analogamente a partire dall'aldeide **1.28** si ottengono i cicloaddotti **1.29** e **1.30** (Schema 1.5). Anche in questo caso la reazione è regiospecifica, la stereochimica del processo dipende dalla natura di R: gli addotti cis (**1.29**) si ottengono come prodotto predominante (cis:trans = 70:30) o pressoché unico (cis:trans 99:1) se il gruppo R è rispettivamente un metile o un fenile, se R è un idrogeno si forma in modo stereospecifico l'addotto trans.

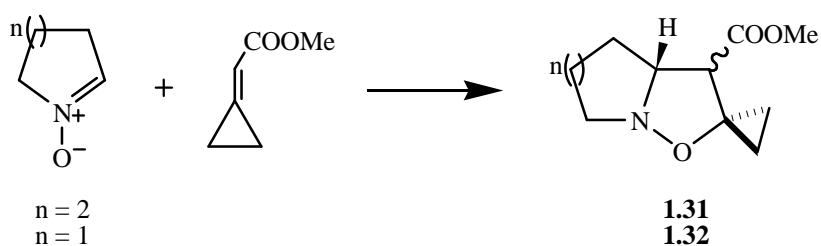


Schema 1.5. Sintesi dei cicloaddotti **1.29** e **1.30**.

L'apertura dell'anello isossazolidinico, per riduzione con  $\text{LiAlH}_4$ , consente di trasformare i composti **1.25**, **1.29** e **1.30** nei corrispondenti ammino-alcoli, utili prodotti di partenza per la sintesi di alcaloidi naturali.

Un'altra metodologia per la sintesi di azaeterocicli si basa sulla cicloadizione tra nitroni e alchilidenciclopropani, seguita da riarrangiamento termico.

Facendo reagire il metossicarbonilmetilenciclopropano e il 3,4,5,6-tetraidropiridin-N-ossido,<sup>44</sup> in toluene ad  $80\text{ }^\circ\text{C}$ , si ottiene una miscela delle due isossazolidine diastereomeriche **1.31** (Schema 1.6).



Schema 1.6. Metodologia alternativa per la sintesi di azaeterocicli.

Come indicato nello Schema 1.6, l'olefina reagisce anche con il pirrolidin-N-ossido fornendo, sebbene con rese più basse, l'isossazolidina **1.32**.

La regioselettività osservata è in accordo con i dati FMO riportati in Figura 1.19.

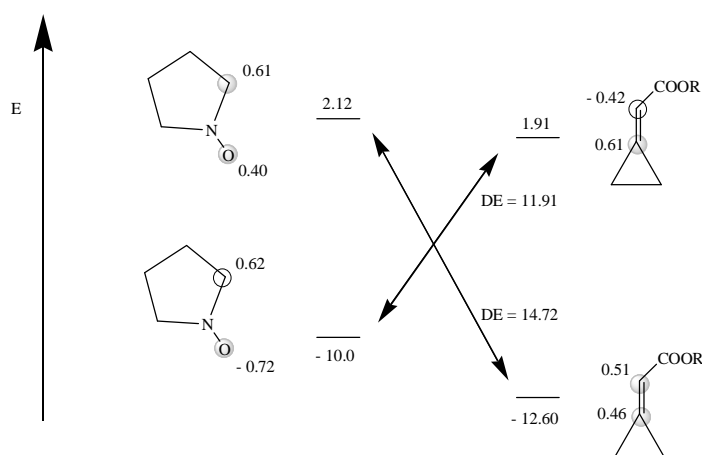
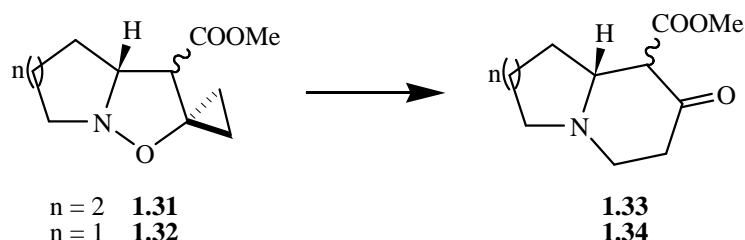


Figura 1.19. Dati FMO relativi alla reazione tra pirrolidin-N-ossido e metossicarbonilmetilenciclopropano.

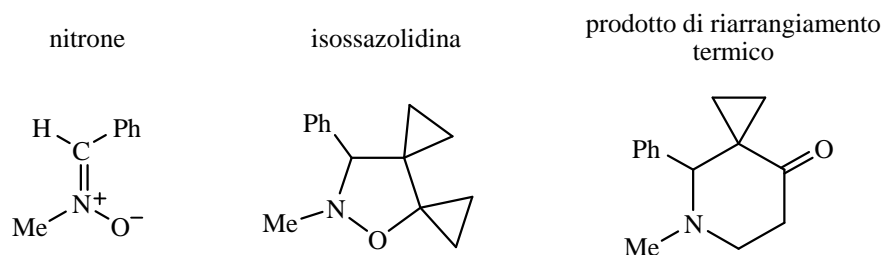
Le isossazolidine **1.31** e **1.32** per riscaldamento (450 °C) sotto vuoto ( $10^{-3}$  mmHg) si riarrangiano, per via radicalica, rispettivamente al quinolizidinone **1.33** e all'indolizidinone **1.34** (Schema 1.7).



Schema 1.7. Riarrangiamento termico delle isossazolidine **1.31** e **1.32**.

Per riduzione dei gruppi chetonici di **1.33** e **1.34** con  $\text{NaBH}_4$  si ottengono i corrispondenti alcoli che costituiscono validi intermedi per la sintesi di quinolizidine e indolizidine.

L'uso di biciclopropilidene come dipolarofilo<sup>45</sup> in cicloaddizioni con nitroni ha consentito di ampliare l'utilità sintetica della metodologia appena descritta (Schema 1.8).



Schema 1.8. Esempio generale di riarrangiamento termico di un'isossazolidina.

Il biciclopropilidene ha elevata reattività verso i nitroni; il suo comportamento, anomalo rispetto a quello di altri alcheni tetrasostituiti, si attribuisce alle sue peculiari proprietà elettroniche, in particolare all'elevata energia del suo livello HOMO.<sup>46</sup>

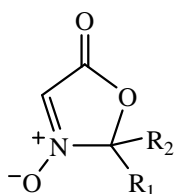
Per evitare il riarrangiamento termico dei cicloaddotti è necessario condurre le reazioni di cicloaddizione di questi alcheni a basse temperature.

Allorché le isossazolidine prodotte si sottopongono a riarrangiamento, i due anelli sui carboni 4 e 5 mostrano reattività nettamente diverse; solo quello sul carbonio 5,

adiacente al labile legame N-O, è modificato dal trattamento termico.

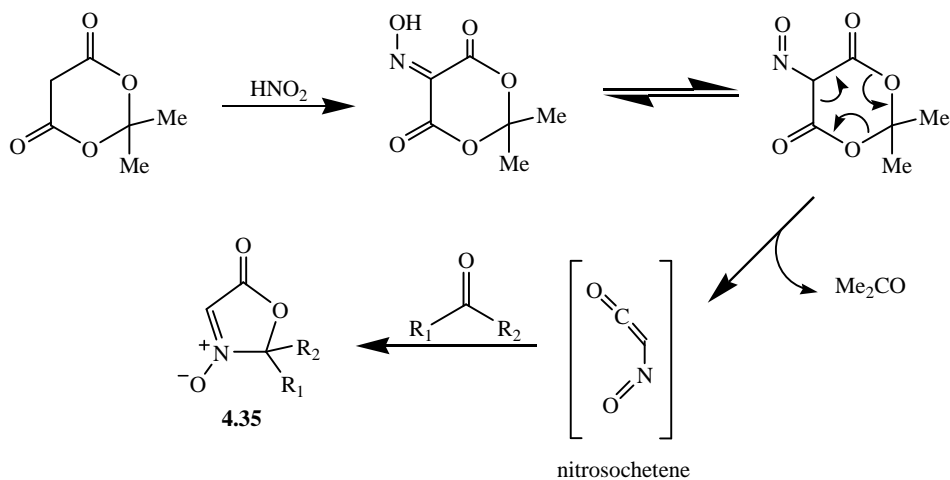
### 1.2.3 Amminoacidi

Una nuova procedura sintetica ha consentito la produzione dei nitroni ciclici altamente funzionalizzati a struttura generale:



Questi si ottengono trattando il 5-isonitroso-2,2-dimetil-1,3-diossano-4,6-dione (acido di Meldrum) con chetoni ciclici e non.<sup>47</sup>

L'andamento della reazione è indicato nello Schema 1.9.



Schema 1.9. Procedura sintetica per la formazione di nitroni ciclici.

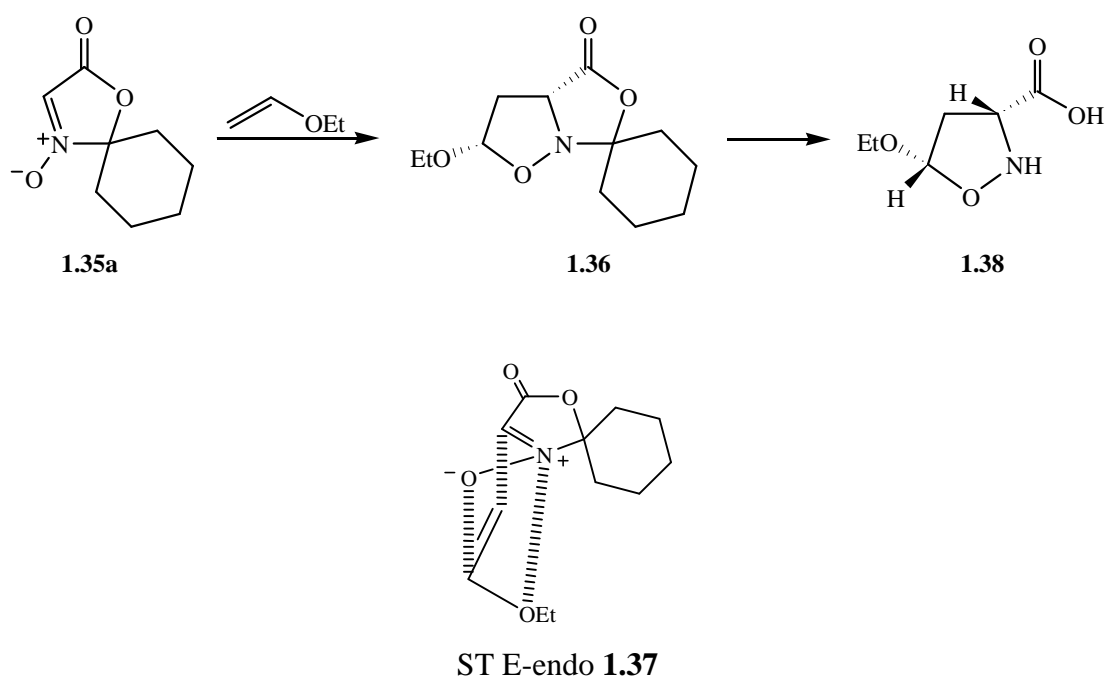
A partire dal tautomero dell'acido isonitroso di Meldrum si ottiene, per riarrangiamento termico, l'intermedio nitroso chetene. Questo per reazione con il chetone fornisce, tramite un meccanismo non del tutto noto, il nitrone ciclico **1.35**. La resa di **1.35** dipende fortemente dal chetone utilizzato.

Le reazioni di questi nitroni con le olefine, in genere, avvengono sotto pressione.

Il nitrone **1.35a**, che si ottiene per reazione tra l'acido isonitroso e il cicloesanoone, reagisce con l'etilviniletere fornendo con resa quantitativa l'isossazolidina **1.36** (Schema 1.10).

Si ritiene che la reazione proceda attraverso lo stato di transizione E-endo **1.37**. La stereospecificità del processo è attribuita all'interazione dell'azoto nitronico carico positivamente con l'ossigeno dell'etil vinil etere.

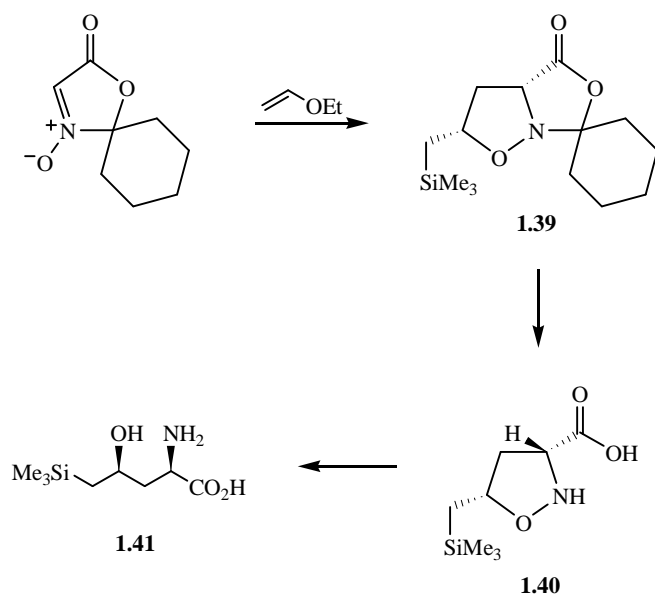
L'idrolisi alcalina di **1.36** dà, con resa elevata, l'amminoacido ciclico **1.38**.



Schema 1.10. Stereospecificità della reazione tra il nitrone **1.35a** e l'etil vinil etere.

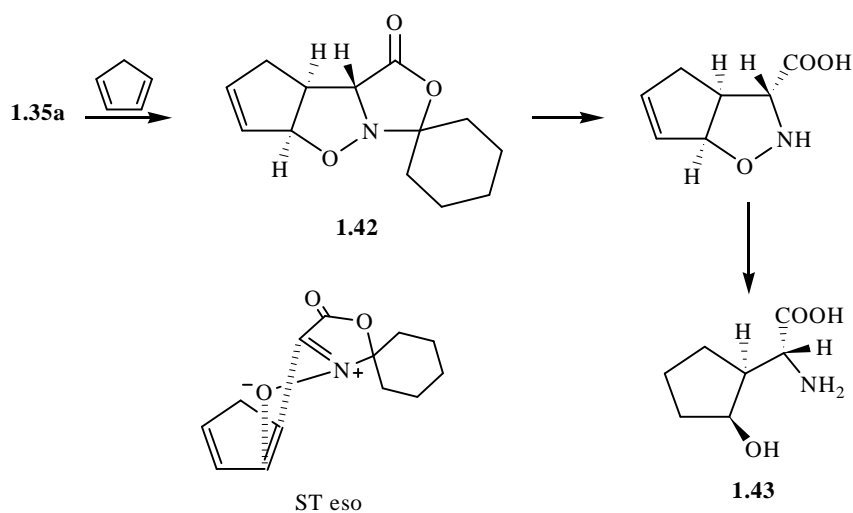
Con la stessa regio e stereoselettività procede la reazione di **1.35a** con alliltrimetilsilano (Schema 1.11); si forma, infatti, attraverso lo stato di transizione endo, l'isossazolidina **1.39**.

Per idrolisi alcalina di **1.39** si ottiene l'amminoacido ciclico **1.40**, questo sottoposto ad idrogenazione catalitica dà l'acido 2-ammino-4-idrossi-5-(trimetilsilil)pentanoico (**1.41**).



Schema 1.11. Regio e stereoselettività della reazione tra il nitrone **1.35a** e l'alliltrimetilsilano.

Il ciclopentadiene reagisce con **1.35a** fornendo il solo cicloaddotto **1.42** (Schema 1.12). In questo caso, visto l'ingombro sterico del ciclopentadiene e la ridotta possibilità di interazioni orbitaliche secondarie, la reazione procede per via *exo*. Per idrolisi alcalina di **1.42**, seguita da idrogenazione catalitica, si ottiene l' $\alpha$ -ciclopentil  $\alpha$ -amminoacido **1.43**.

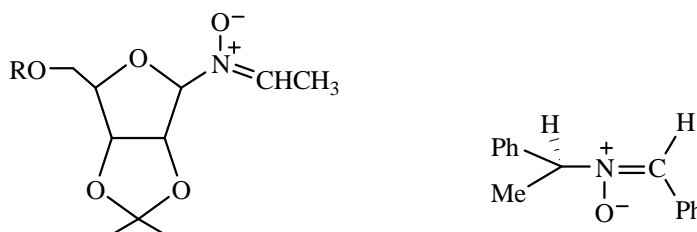


Schema 1.12. Stereospecificità della reazione tra il nitrone **1.35a** e il ciclopentadiene.

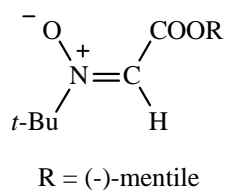


### 1.2.4 Sintesi enantioselettive

La questione dell'induzione asimmetrica in cicloaddizioni tra nitroni ed olefine è stata studiata a lungo, per lo più utilizzando nitroni con sostituenti chirali sull'azoto,<sup>48,49</sup> le strutture di alcuni di essi sono indicate di seguito:

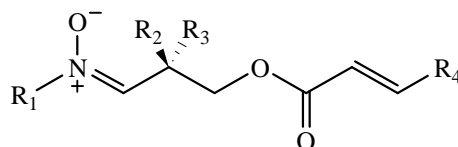


Un altro nitrone che dà prodotti di alta purezza ottica è il derivato dell'L(-)-mentilgliossalato.<sup>49</sup>



Molto meno diffuso è l'uso di olefine enantiomericamente pure.<sup>50</sup>

Ottimi risultati si sono ottenuti nelle cicloaddizioni intramolecolare di nitroni chirali del tipo:<sup>50</sup>

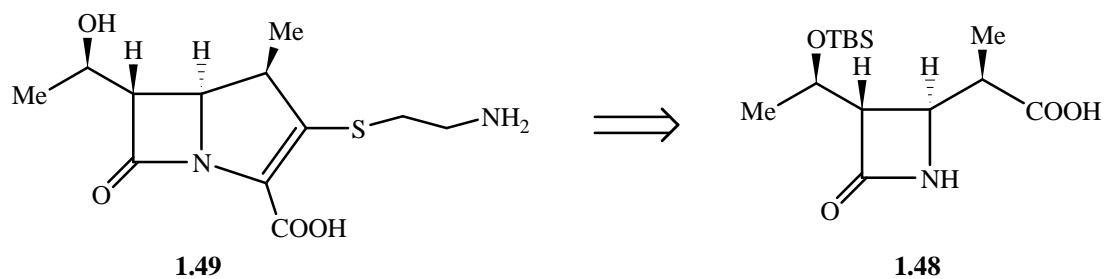


Recentemente l'applicazione di analoghi nitroni chirali ha consentito la sintesi di tetraidrofurani altamente funzionalizzati ed enantiomericamente puri.<sup>51</sup>

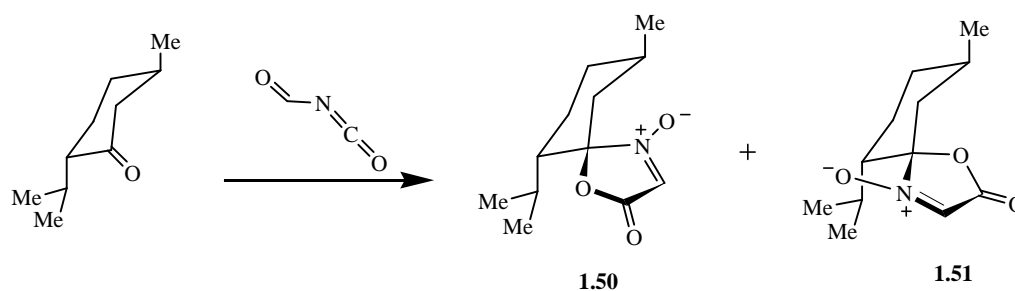
I nitroni sono stati sintetizzati a partire dagli esteri **1.44a-d**; questi sono stati ridotti alle corrispondenti aldeidi con diisobutilalluminioidrato a -72 °C e quindi trattati, senza



Un approccio analogo a quello descritto è stato utilizzato<sup>52</sup> per la sintesi del composto **1.48**, noto precursore della 1- $\beta$ -metiltienamicina **1.49**.



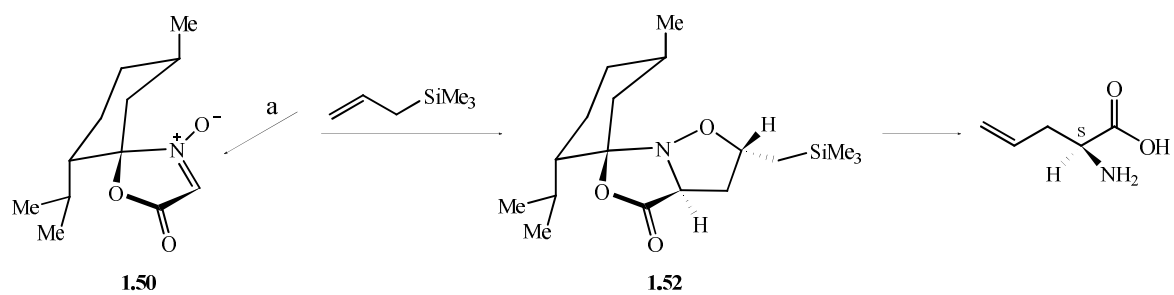
Utilizzando la procedura basata sull'acido isonitroso di Meldrum, è stata effettuata la sintesi di amminoacidi non proteinogenici enantiomericamente puri.<sup>53</sup> A tal fine si è utilizzato il nitrone chirale ottenuto facendo reagire l'acido isonitroso di Meldrum con *l*-mentone (Schema 1.15).



Schema 1.15. Esempio di sintesi di amminoacidi non proteinogenici enantiomericamente puri.

I due prodotti **1.50** e **1.51** si separano per via cromatografica.

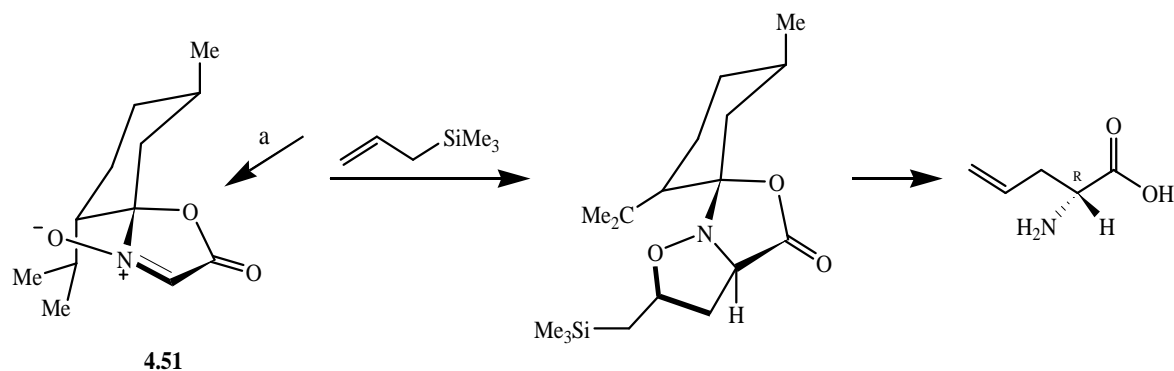
La reazione tra **1.50** e alliltrimetilsilano fornisce il cicloaddotto **1.52** come unico prodotto. L'alliltrimetilsilano, come indicato nello Schema 1.16 si avvicina a **1.50** dal lato meno impedito (lato a), attraverso il risultante stato di transizione eso si ottiene **1.52**.



Schema 1.16. Sintesi dell'(*S*)-allilglicina dalla reazione tra il nitrone **1.50** e l'alliltrimetilsilano.

L'ulteriore trattamento dell'isossazolidina prodotta, fornisce l'(*S*)-allilglicina, consentendo inoltre il recupero dell'induttore di chiralità.

Mediante la stessa procedura si ottiene, a partire dal nitrone **1.51**, l'(*R*)-allilglicina (Schema 1.17).



Schema 1.17. Sintesi dell'(*R*)-allilglicina dalla reazione tra il nitrone **1.51** e l'alliltrimetilsilano.

## 2. Nucleosidi Modificati

### 2.1 Nucleosidi modificati come agenti antivirali

Modifiche strutturali di sistemi nucleosidici possono assumere oggi un'importanza cruciale nella intesi di nuovi potenziali farmaci antivirali<sup>54</sup>.

Nella terapia d'infezioni causate da virus e anche nel trattamento d'alcune neoplasie, gli analoghi nucleosidici sono di recente emersi come importanti agenti chemioterapici<sup>55a,b</sup>.

Dalla scoperta che nucleosidi modificati possono proteggere in maniera efficace le cellule dall'azione letale d'alcuni virus, quali il virus dell'immunodeficienza umana (HIV), il virus dell'herpes simplex, il virus dell'epatite C, il cytomegalovirus, parecchi lavori sono infatti apparsi in letteratura riguardanti la loro sintesi<sup>56a,b</sup>, le applicazioni terapeutiche<sup>57a,b</sup> e il meccanismo d'azione<sup>58a,b</sup>.

Attualmente diversi farmaci a struttura nucleosidica sono stati approvati dalla Food and Drug Administration e sono correntemente impiegati in terapie antivirali (figura4.1). L'aciclovir e il ganciclovir sono utilizzati contro i virus erpetici (HSV-1 e HSV-2); l'AZT, il ddI, il ddC, il d4T, il 3TC e l'abacavir sono utilizzati per il trattamento dell'AIDS e delle patologie ad esso collegate; il eTC è impiegato per il trattamento dell'HVB.

La maggior parte degli analoghi nucleosidici consiste nella modificazione di substrati naturali a livello della base eterociclica o dell'unità zuccherina<sup>59</sup>. La struttura generale di questi composti è ben definita da tre elementi chiave:

- 1) il gruppo idrossimetilico, necessario per l'attivazione attraverso la fosforilazione operata da chinasi;
- 2) La base eterociclica, necessaria per il riconoscimento da parte degli enzimi e per la costruzione del filamento complementare nel processo di sintesi degli acidi nucleici;
- 3) Lo spaziatore (l'anello furanosico nei composti naturali), che consente un'opportuna disposizione degli acidi nucleici;

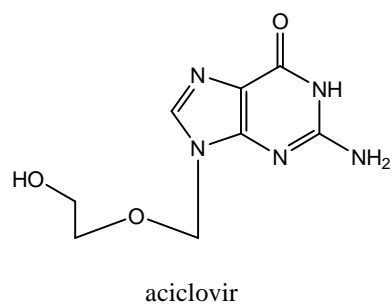
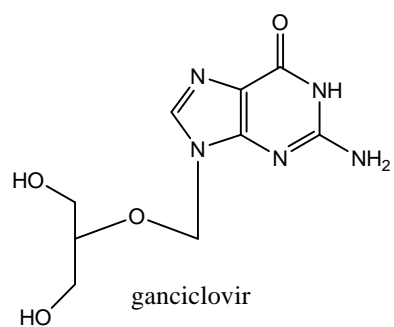
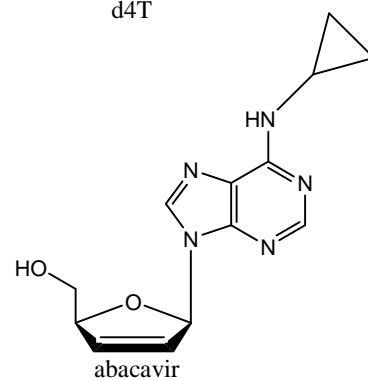
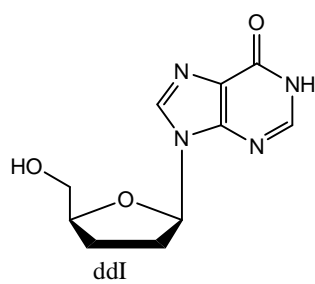
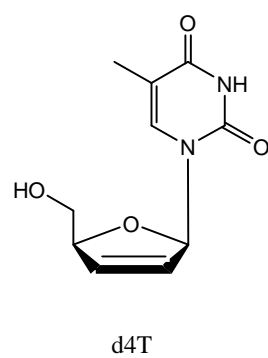
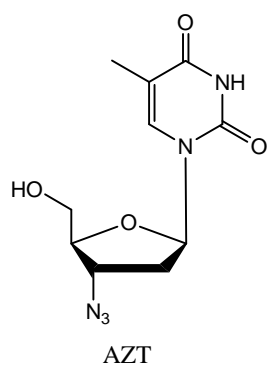
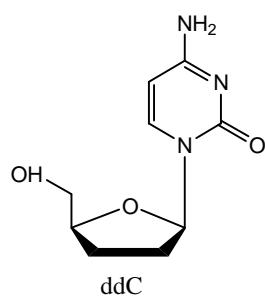
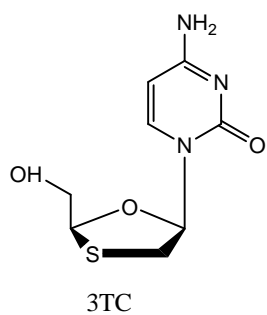


Figura 2.1

A questo riguardo, è interessante speculare che gli effetti biologici mostrati dagli analoghi nucleosidici dipendono in maniera preminente dalla disposizione relativa del gruppo idrossimetilico e della base eterociclica. Data l'alta specificità delle chinasi che fosforilano la posizione 5', solo poche variazioni al gruppo idrossimetilico sono permesse<sup>60a,b</sup>.

Esiste, tuttavia, una vasta famiglia di composti, raggruppati sotto il nome di antibiotici nucleosidici, che presentano complesse catene laterali al posto del gruppo idrossimetilico<sup>61a,b</sup>. Le interazioni basate sulla formazione di legame idrogeno tra le basi eterocicliche sono fondamentali per l'attività biologica dei nucleosidi modificati. Quindi, ogni variazione di quest'unità deve essere in grado di preservare queste forze intramolecolari. Come conseguenza, solo variazioni minori di queste basi sono riportate in analoghi nucleosidici biologicamente attivi. La più notevole di questo tipo di modificazioni strutturali si riscontra nei C-nucleosidi, in cui il tipico legame glucosidico C-N è sostituito con un legame C-C non idrolizzabile<sup>62a,b</sup>. D'altra parte, numerose variazioni sono possibili per lo spaziatore che portano a composti che mostrano attività. Le modificazioni più interessanti dell'anello furanosico sono focalizzate principalmente su 2',3'-dideossinucleosidi<sup>63a,b</sup> e su 2'-fluoro nucleosidi<sup>64</sup>. Anche la disposizione relativa 1',4'- del gruppo idrossimetilico e della base eterociclica può essere modificata per ottenere i cosiddetti isonucleosidi, composti d'entrambe le serie enantiomere D e L, che hanno mostrato interessanti attività antivirali.

Nella figura 4.2 sono riassunte alcune delle possibili modificazioni descritte che includono la sostituzione dell'atomo d'ossigeno con un metilene (nucleosidi carbociclici), un atomo di zolfo (tionucleosidi), un atomo d'azoto (azanucleosidi).

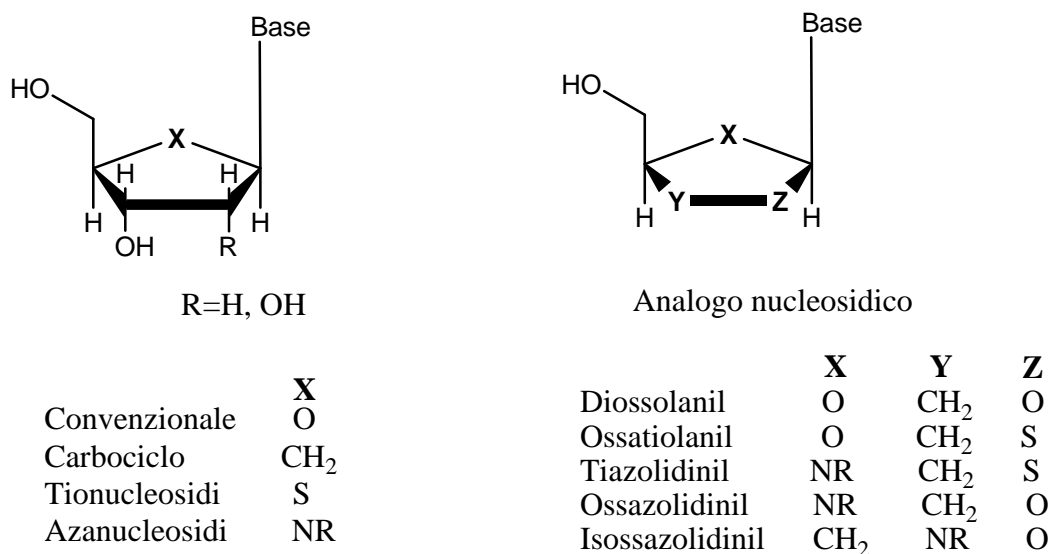


Figura 2.2

Analoghi carbociclici (come carbavir), tionucleosidi ed azanucleosidi sono stati e sono oggetto di studi da parte di numerosi gruppi di ricerca.

L'anello furanosico può anche essere sostituito da un anello piranosico. Analoghi piranosil nucleosidi sono stati proposti da Eschenmoser come un'alternativa ai nucleosidi convenzionali in catene d'oligonucleotidi<sup>65</sup>.

Anche gli analoghi corrispondenti contenenti un anello a quattro termini sono stati studiati in dettaglio<sup>66</sup>.

## 2.2 Nucleosidi eterociclici

La modifica chimica dei frammenti degli acidi nucleici, a livello della base azotata e/o dell'unità zuccherina, offre quindi ampie opportunità per la sintesi di nuove molecole caratterizzate da interessante attività antivirale e/o antitumorale.

I dati riportati in letteratura suggeriscono la creazione di nuove molecole che incorporano elementi strutturali diversi, pur mantenendo le relazioni strutturali atte al riconoscimento molecolare da parte dell'appropriato enzima. In quest'ottica, nuove classi d'analoghi nucleosidici sono state sviluppate e la progettazione di nuovi anelli "ribosidici" è sfociata nella scoperta d'efficaci agenti biologicamente attivi. In



particolare, risultati promettenti sono stati ottenuti con una nuova generazione di nucleosidi in cui l'unità ribosio è sostituita da anelli eterociclici alternativi.

Una delle strategie utilizzate per la creazione di nuovi composti biologicamente attivi è la sostituzione d'opportuni gruppi funzionali presenti nel lead, con strutture bioisosteriche. In tal modo le modifiche apportate consentono di ottenere composti con un profilo biologico sovrapponibile o antitetico rispetto al lead.

La caratteristica comune degli analoghi nucleosidici è la presenza di un gruppo idrossimetilico, sull'anello a cinque termini, in relazione spaziale cis con la base azotata attraverso un legame glicosidico o pseudo-glicosidico. Si è trovato che analoghi nucleosidici ottenuti per sostituzione dell'anello ribosidico o 2'-deossiribosidico, con carbocicli o con anelli caratterizzati dalla presenza di uno o più eteroatomi (O,S,N) mostrano ancora attività antivirale<sup>67</sup>.

La giustificazione di tal evidenza sperimentale è che la presenza di più eteroatomi nell'anello pentetomico potrebbe favorire la conformazione richiesta per l'interazione con l'opportuno enzima. L'interesse verso analoghi nucleosidici in cui l'anello furanosico è sostituito con un differente sistema eterociclico (Nucleosidi Eterociclici) è apparsa in letteratura solo in questi ultimi anni.

L'importanza d'analoghi nucleosidici contenenti un anello eterociclico alternativo, come "spaziatore" tra l'unità idrossimetilica e la base azotata, è stata ben messa in evidenza sin dalla scoperta delle notevoli proprietà anti-HIV della lamivudina<sup>68a,b</sup> (figura 4.3).

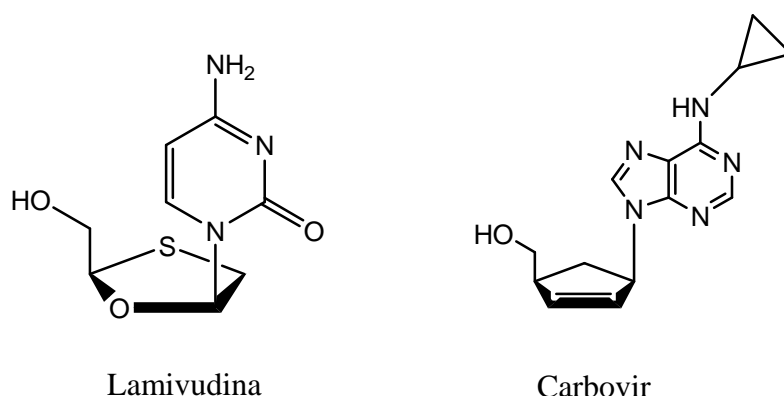


Figura 3.3

Anche l'attività biologica di numerosi diossolanil nucleosidi è stata testata e dimostrata. In molti di questi composti un interesse cruciale assume la modificazione strutturale a livello della base azotata. L'analogo 1,3-diossolanico della tiazofurina (indicarla con un numero), un C-nucleoside con proprietà antitumorali, è stato preparato a partire dal D-mannitolo<sup>69</sup>.

Nell'ultimo decennio è stata introdotta una nuova classe di nucleosidi modificati, i nucleosidi isossazolidinici, ottenuti in maniera stereoselettiva mediante reazioni di cicloaddizione<sup>70</sup>. In particolare, isossazolidinil nucleosidi sono stati efficacemente sintetizzati per cicloaddizione 1,3-dipolare di nitroni a vinil nucleobasi. Il procedimento sintetico è stato applicato alla preparazione d'analoghi N,O-nucleosidici della timida e dell'adenina<sup>71</sup>. La reazione è stata condotta utilizzando il nitrone derivato dalla formaldeide, che è stato generato *in situ* da idrossilammina e paraformaldeide (figura 2.4)

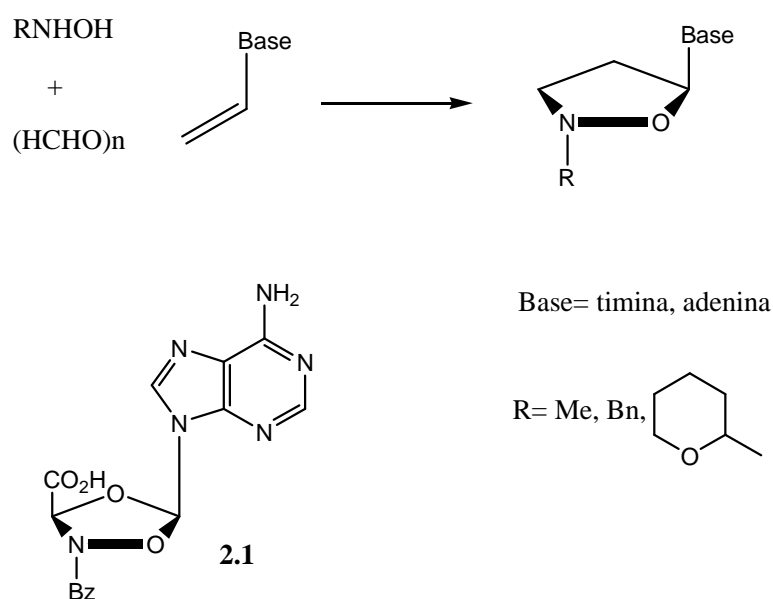


Figura 2.4

Sono stati preparati isossazolidinil nucleosidi sostituiti in posizione 3 utilizzando gli opportuni nitroni. In tal modo è stato ottenuto il nucleoside modificato **2.1** è stata anche completata la sintesi di tutti i 4'-aza analoghi dei 2',3'-dideozinucleosidi contenenti citosina, adenina, guanina, uracile e 5-metilcitosina<sup>72</sup>.

## 3. Liquidi Ionici

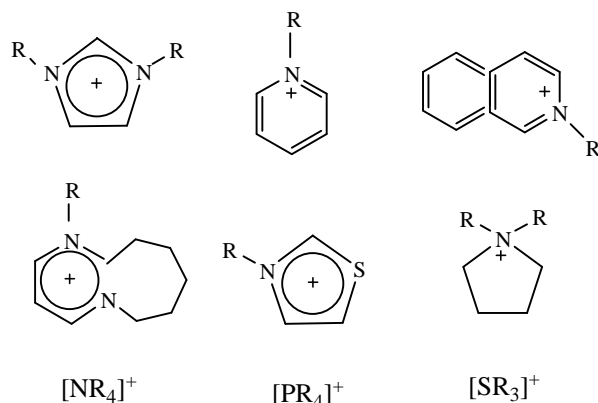
### 3.1 Aspetti generali

I liquidi ionici possono essere considerati una nuova e promettente classe di solventi. Di recente c'è stata, nei loro confronti, una vera e propria esplosione di interesse. L'aumento di tale interesse è dovuto al progressivo incremento della produzione di queste sostanze, precedentemente utilizzate per applicazioni elettrochimiche specializzate, verificatosi al fine di migliorare la loro utilità ed efficacia proprio come solventi di reazione.<sup>73</sup>

I liquidi ionici possono essere definiti come liquidi costituiti esclusivamente da ioni. Questo termine però racchiude un'ulteriore definizione speciale, in modo tale che essa possa essere distinta dalla classica definizione di "sale fuso".<sup>74</sup> Mentre questi ultimi infatti sono generalmente considerati sali con elevato punto di fusione, estremamente viscosi e corrosivi, i liquidi ionici sono invece già liquidi a basse temperature (< 100°C) e possiedono una viscosità relativamente bassa.<sup>75</sup>

La definizione appena fornita di liquido ionico non risponde tuttavia al problema più generale, ovvero "cos'è un liquido ionico. La composizione chimica generale dei liquidi ionici, comunque, è sorprendentemente costante e regolare, anche se la composizione specifica e le proprietà fisiche e chimiche variano notevolmente. La maggior parte dei liquidi ionici è costituita da un catione organico (i più comuni, e quelli maggiormente studiati sono gli ioni tetraalchilammonio, tetraalchilfosfonio, N-alchilpiridinio, 1,3-dialchilimidazolio e trialchilsolfonio)<sup>76</sup> e da un anione inorganico poliatomico (Figura 3.1).

### Cationi



### Anioni

$\text{BF}_4^-$ ,  $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{CF}_3\text{CO}_2^-$ ,  $\text{SbF}_6^-$ ,  $\text{HexBEt}_3^-$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}_2^-$ ,  $\text{OTs}^-$ ,  $\text{HSO}_4^-$ ,  $\text{AuCl}_4^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{AlCl}_4^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ , anioni di carborano,  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ .

Figura 3.1. Cationi e anioni dei più comuni liquidi ionici.

Essi sono comunemente espressi anche sotto forma di sigle, così ad esempio il liquido ionico triflato di 1-alkil-3-metilimidazolio è indicato con l'abbreviazione  $[\text{C}_n\text{mim}]^+[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$ , dove  $n$  indica il numero d'atomi di carbonio nella catena lineare alchilica in posizione 1; la catena lineare, oltre che con il termine  $\text{C}_n$ , può anche essere indicata con le normali lettere dell'alfabeto, preferibilmente in minuscolo: “ $e$ ” se la catena alchilica è un etile, “ $b$ ” se essa è costituita da un butile, e così via. Naturalmente “ $m$ ” si riferisce al metile situato sull'anello in posizione 3 e “ $im$ ” all'imidazolo (Figura 3.2).

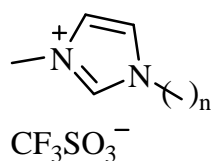


Figura 3.2. Liquido ionico  $[\text{C}_n\text{mim}]^+[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$ .

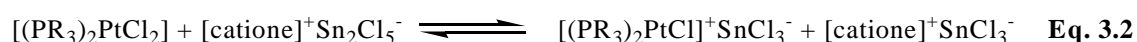
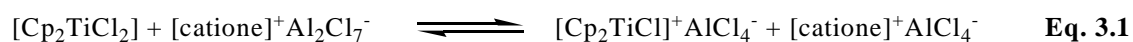
Le catene alchiliche più comunemente utilizzate sono l'etile, il butile, l'esile, l'ottile ed il decile. Per quel che riguarda invece i sali di N-alchilpiridinio, essi vengono abbreviati con la sigla  $[C_npy]^+$ .

### ***3.2 Liquidi Ionici come solventi per reazioni***

Una delle caratteristiche principali dei liquidi ionici è quella di solubilizzare una vasta categoria di composti organici, inorganici e organometallici, facendo di questi mezzi di reazione i solventi ideali per reazioni che procedono in condizioni mediate da catalizzatori. E' poi interessante notare come, a seconda delle proprietà coordinative dell'anione, il liquido ionico possa essere utilizzato come un normale solvente inerte, oppure come cocatalizzatore.

Nel caso specifico di reazioni catalizzate da derivati organometallici o da metalli di transizione i liquidi ionici con ioni tetrafluoroborato o esafluorofosfato sono considerati come solventi inerti: in questi casi il ruolo del liquido ionico è unicamente quello di fornire un debole mezzo di coordinazione polare per il catalizzatore ed inoltre di consentire un'ottima solubilizzazione di reagenti e prodotti. L'utilizzo dei liquidi ionici permette spesso di combinare in maniera appropriata le proprietà del solvente stesso, cosa che invece non può essere realizzata adoperando l'acqua o un qualsiasi altro comune solvente organico.

I liquidi ionici formati dalla reazione di un alogenuro con un acido di Lewis (ad esempio sali cloroalluminati o clorostannati) generalmente agiscono come cocatalizzatori. Il motivo risiede nell'acidità o nella basicità di Lewis, che determina forti interazioni con il complesso catalizzatore. In molti casi l'acidità di Lewis di un liquido ionico è utilizzata per convertire il precursore del catalizzatore neutro nella corrispondente forma attiva cationica. Alcuni esempi riguardano l'attivazione di  $[Cp_2TiCl_2]^{65}$  nei sali (melts) acidi cloroalluminati e quella di  $[(PR_3)_2PtCl_2]$  nei sali clorostannati (Equazioni 3.1 e 3.2):



Esistono diversi buoni motivi per considerare i liquidi ionici solventi alternativi in reazioni ben conosciute, catalizzate da metalli di transizione. Oltre al vantaggio legato alla loro natura non volatile, di particolare interesse è la ricerca di nuove reazioni bifasiche, con una fase costituita da un catalizzatore ionico. La possibilità di migliorare le proprietà di solubilizzazione, attraverso la differente combinazione catione/anione, permette una sistematica ottimizzazione della reazione bifasica stessa, per esempio per quel che riguarda la selettività del prodotto. Un'importante alternativa per aumentare la selettività nelle reazioni in multifase deriva dalla preferenziale solubilità di un solo reagente nel solvente catalizzatore o dall'estrazione *in situ* degli intermedi di reazione fuori lo strato del catalizzatore.<sup>75</sup>

Infine, i liquidi ionici possono essere superiori all'acqua o ai comuni solventi organici nelle catalisi con metalli di transizione, in particolar modo quando, come catalizzatori, vengono utilizzati complessi ionici. In questi casi è possibile ottenere un significativo incremento della stabilità e dell'attività del catalizzatore.

Negli ultimi dieci anni, l'utilizzo dei liquidi ionici come nuova classe di solventi per reazioni come idrogenazioni catalitiche, idroformilazioni, isomerizzazioni, ossidazioni, alcossi- carbonilazioni, idrodimerizzazioni, oligomerizzazioni e polimerizzazioni, reazioni di Heck (Heck coupling) ha subito una rapida e continua espansione dovuta alla sempre più pressante esigenza di "metodologie sintetiche pulite" in accordo con i principi della Green Chemistry.

### ***3.3 Liquidi Ionici come "solventi green"***

I liquidi ionici sono considerati promettenti solventi per "processi puliti", soprattutto per quel che riguarda l'impiego ed il consumo di solventi e catalizzatori, in particolare nell'abbattimento o eliminazione dei VOCs. Al contrario dei solventi organici volatili e

dei mezzi d'estrazione, i liquidi ionici infatti non presentano una pressione di vapore misurabile, perciò non vi è una perdita di solvente mediante evaporazione.

Riguardo allo sforzo per ridurre al minimo il consumo di catalizzatori, due interessanti aspetti nascono dall'utilizzo dei liquidi ionici: primo, la "speciale" solubilità, caratteristica di un mezzo di reazione ionico, permette, in molti casi, una procedura di reazione bifasica. Lo sfruttamento del gap di miscibilità tra la fase del catalizzatore ionico ed i prodotti permette, in questo caso, l'effettivo isolamento del catalizzatore dal prodotto ed il suo riutilizzo. Secondo, la natura non volatile dei liquidi ionici consente un miglior isolamento del prodotto tramite distillazione o estrazione con CO<sub>2</sub> supercritica. Anche in questa circostanza esiste la possibilità di poter riutilizzare il catalizzatore ionico isolato. In entrambi i casi, la reattività totale dei catalizzatori impiegati subisce un notevole incremento, mentre il consumo degli stessi, relativo al prodotto generato, si riduce sensibilmente.

## 4. Microonde

### 4.1 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 d'identificazione e l'ottimizzazione di nuovi composti organici potenzialmente 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 d'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 d'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 d'energia fosse adatta per accelerare le reazioni organiche è apparsa solo nel 1986<sup>77</sup>, a causa dei pericoli associati all'infiammabilità dei solventi organici e della mancanza di sistemi atti a controllare tali rischi. Nonostante ancora oggi taluni laboratori utilizzino forni a microonde da cucina, 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 d'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 4.1 riassume, raggruppati per classi di sistemi organici sintetici, i principali campi applicativi dell'irraggiamento di potenza a microonde.

**Tabella 4.1 Alcuni campi d'applicazione del riscaldamento a microonde.**

<i>Sistema trattato</i>	<i>Processi promossi</i>	<i>Vantaggi<sup>a</sup></i>	<i>Grado di sviluppo attuale</i>
<b>Sistemi organici sintetici</b> Sintesi organica in fase liquida e solida.	Processi chimici	Velocità, incremento di resa	Laboratorio
Curing resine termoindurenti (erelativi compositi)	Fluidificazione, processi chimici di curing e post-curing, promozione di adesione resina-fibra	Velocità di processi chimici, rapidità, omogeneità del riscaldamento.	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

<sup>a</sup> ottenuti attraverso il riscaldamento a microonde, rispetto ai corrispondenti processi termici convenzionali;

I risultati, sorprendenti per rapidità, resa, selettività, ottenuti dall'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 d'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 3.2, le microonde sono radiazioni elettromagnetiche non ionizzanti che coprono l'intervallo nominale di frequenza da 300 MHz a 300 GHz, immediatamente superiore, cioè, a quello da 3 kHz a 300 MHz delle radioonde.

**Tabella 4.2 radioonde e microonde nell'ambito dello spettro delle radiazioni elettromagnetiche**

<i>Banda</i>	<i>Frequenza</i>	<i>Energia del fotone</i>
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	$3 \times 10^4$ GHz ÷ $3 \times 10^5$ GHz	0,1-1 eV
Vicino IR-vicino UV	$3 \times 10^5$ GHz ÷ $3 \times 10^6$ GHz	1-10 eV
Lontano UV	$3 \times 10^6$ GHz ÷ $3 \times 10^7$ GHz	10-100 eV
Raggi X “morbidi”	$3 \times 10^7$ GHz ÷ $3 \times 10^9$ GHz	100 eV-10 KeV
Raggi X “duri”- $\gamma$ “duri”	$3 \times 10^9$ GHz ÷ $3 \times 10^{11}$ GHz	10KeV-1MeV
Raggi $\gamma$ “duri”- $\gamma$ “cosmici”	$3 \times 10^{11}$ GHz ÷ $3 \times 10^{13}$ GHz	1MeV-100 MeV

Come schematizzato in Tabella 4.3, 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 4.3 Radioonde e microonde: bande di frequenza e frequenze ISM**

<i>Bande</i>	<i>Intervalli di frequenza</i>	<i>Frequenza ISM</i>
<b>Radioonde</b>		
VLF	3 ÷ 30 KHz	
LF	30 ÷ 300 KHz	
MF	300 ÷ 3000 KHz	
HF	3 ÷ 30 MHz	13,560±0,007 MHz 27,120±0,163 MHz
VHF	30 ÷ 300 MHz	40,680±0,020 MHz
<b>Microonde</b>		
UHF	300 ÷ 3000 MHz	896±10 MHz (UK) 915±13 MHz (Americhe) 2,450±50 MHz
SHF	3 ÷ 30 GHz	5,800±0,075 GHz 24,125±0,125 GHz
EHF	30 ÷ 300 GHz	

Le microonde sono caratterizzate da livelli d'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 d'intervento diretto delle microonde (e meno ancora delle radiofrequenze, d'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<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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.

#### ***4.2 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, o comunque in modo del tutto 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 d'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 d'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 d'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 d'energia sotto forma di calore. L'energia assorbita dal mezzo dipende dal fattore di dispersione o tangente dielettrica ( $\tan \delta$ ) che si definisce come:  $\tan \delta = e''/e'$  dove  $e'$  è la costante dielettrica (o permittività dielettrica) dell'ambiente,  $e''$  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 d'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  $\tan \delta$  sono inoltre adatti per le reazioni promosse a microonde. Sfortunatamente, i valori di  $\tan \delta$  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 4.1, 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)<sup>78</sup>.

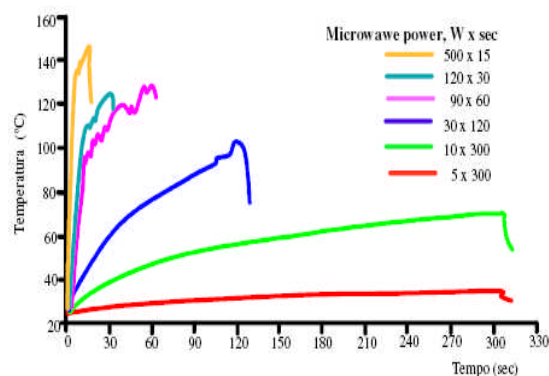


Figura 4.1

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 un'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<sup>79</sup>.

In Tabella 3.4, 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<sup>80</sup>.

**Tabella 4.4 Fattori di dispersione dei materiali  
(misura a 3000 MHz).**

<i>Materiale</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tang δ (x10)</i>
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.

### ***4.3 Apparecchiatura per il riscaldamento alle 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.

### ***4.4 Generatori di potenza a microonde***

E' stata sviluppata una grande varietà di dispositivi di questo tipo (*tubi a microonde*), con potenze d'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 cavità 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.

#### ***4.5 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.

#### ***4.6 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 d'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 4.2)

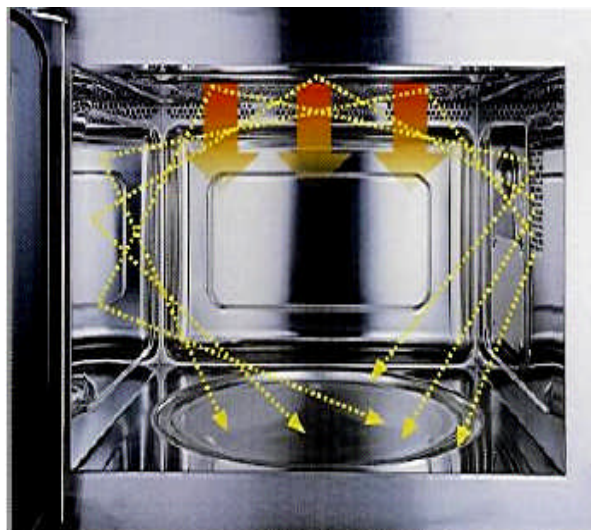


Figura 4.2

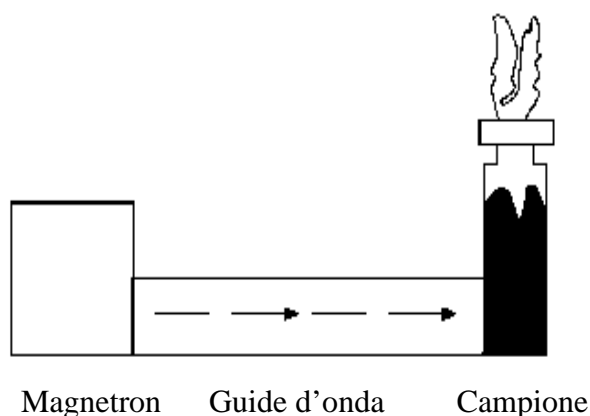
La cavità è rivestita di molti strati di materiale plastico anticorrosione, trasparente alle radiazioni (fluoropolimeri, PEEK, polipropilene, ecc.), per proteggerla dagli schizzi di sostanze corrosive in caso di rottura dei contenitori delle miscele di reazione. L'energia si diffonde nell'intero volume 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 4.3, vengono schematizzate le principali parti costituenti una tipica apparecchiatura per il riscaldamento a microonde.

Figura 4.3



#### ***4.7 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.

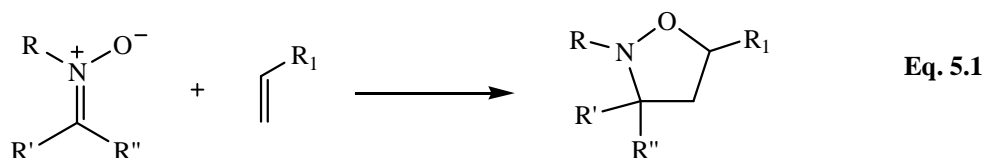
La camera è fornita di un camino di esalazione dei vapori che a seconda dei modelli, è collegato a sistemi di ventilazione programmabili o a dispositivi di aspirazione e di abbattimento dei fumi, in particolare per gli acidi.

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.

## Discussione dati sperimentali

### 5. Cicloaddizione 1,3-dipolare di nitroni in liquido ionico e catalizzatore

Le cicloaddizioni 1,3-dipolari sono reazioni molto importanti per la costruzione di eterocicli a cinque termini, interessanti strutture contenute in vari prodotti naturali.<sup>70</sup> Le cicloaddizioni 1,3-dipolari sono applicate in numerose sintesi con nitroni, nitril ossidi, azidi e altri composti 1,3-dipolari fornendo cicloaddotti diversi. In particolare, le cicloaddizioni 1,3-dipolari tra nitroni e alcheni forniscono isossazolidine (Equazione 5.1), interessanti intermedi per la sintesi di  $\beta$ -ammino alcoli e alcaloidi.<sup>71,72</sup>



In passato, mediante cicloaddizioni 1,3 dipolari abbiamo sintetizzato 4' aza-analoghi di 2',3'-dideossinucleosidi ciclici e biciclici agenti attivi nei test "in vitro" contro l'HIV. Il nostro primo cicloaddotto è stato l'AdT (4'-aza-2',3'-dideossitimidina) il quale ha evidenziato proprietà antivirali piuttosto buone rispetto all'AZT (3'-azido-2',3'-dideossitimidina); la reazione prevede la formazione *in situ* del nitrone e la successiva cicloaddizione 1,3-dipolare con una vinilnucleobase (Figura 5.1).<sup>81</sup>

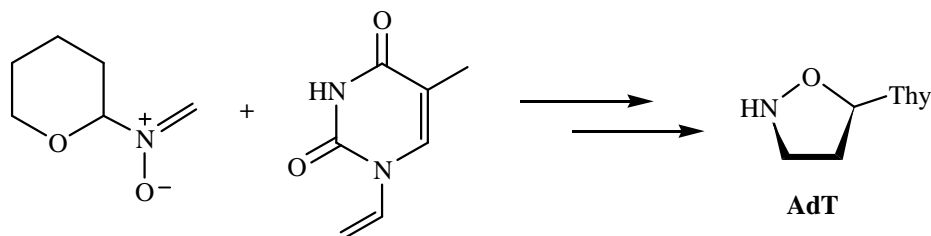
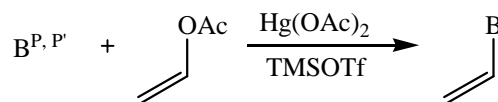


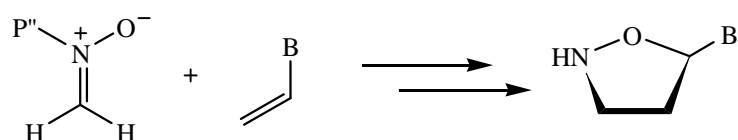
Figura 5.1. Cicloaddizione 1,3-dipolare tra l'*N*-tetraidropiran-2-il nitrone e l'*N*-1-Viniltimina.

Seguendo questo approccio, abbiamo proposto l'applicazione di un metodo alternativo di vinilazione delle nucleobasi (Schema 5.1) le quali sono state successivamente utilizzate come dienofili in reazioni di cicloaddizione 1,3-dipolare per la sintesi di una classe completa di nucleosidi isossazolidinici (Schema 5.2).<sup>82,84a</sup>



B = Thy, Cyt, Ura; P = P' = TMS.  
 B = Ade; P = Bz.  
 B = Gua; P = Ac; P' = Carbamoyl.

Schema 5.1. Reazione di vinilazione di una generica nucleobase.

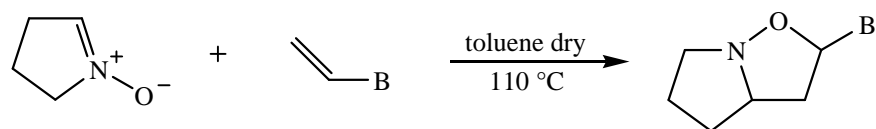


P'' = gruppo protettore

B = Ura, Cyt, Ade, Gua

Schema 5.2. Esempio generale di sintesi di un nucleoside isossazolidinico.

Tale protocollo è stato quindi esteso alla preparazione di nucleosidi isossazolidinici biciclici con mobilità conformazionale ristretta (Schema 5.3).<sup>85b</sup>



B = Thy, Ura, Cyt

Schema 5.3. Cicloaddizione 1,3-dipolare per la sintesi di un nucleoside isossazolidinico biciclico.

Come sottolineato nell'introduzione le cicloaddizioni 1,3-dipolari rappresentano il metodo più importante per la costruzione di eterocicli a cinque termini.

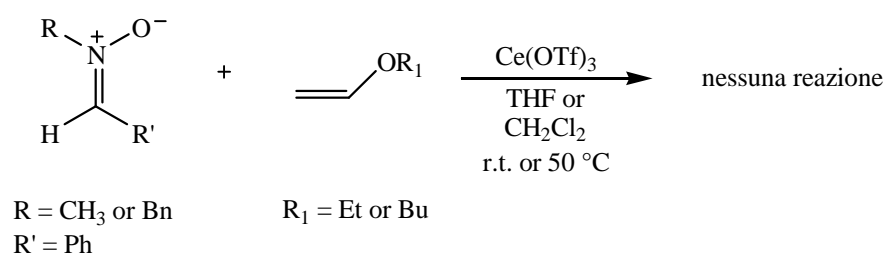
Struttura e stereochimica dei cicloaddotti dipendono largamente dalla natura elettronica del dipolo e del dipolarofilo e la catalisi acida di Lewis ha dimostrato giocare un importante ruolo in relazione a regio-, diastereo- ed enantioselettività dei risultanti prodotti. Nelle cicloaddizioni 1,3-dipolari catalizzate da acidi di Lewis, infatti la coordinazione dell'acido di Lewis all'atomo di ossigeno del nitrone fornisce un'interazione dominante  $LUMO_{\text{nitrone}}-HOMO_{\text{alchene}}$  (reazione a domanda inversa di elettroni) rendendo questo approccio più selettivo,<sup>86</sup> mentre la coordinazione dell'acido di Lewis all'atomo di ossigeno dell'alchene elettron-povero dà un'interazione dominante  $HOMO_{\text{nitrone}}-LUMO_{\text{alchene}}$  (reazione a domanda normale di elettroni).

Anche la velocità di reazione dipende dalla presenza o meno del catalizzatore.

In tutte le cicloaddizioni 1,3-dipolari da noi effettuate in passato e sin qui descritte sono state impiegate le convenzionali, di fatto piuttosto drastiche, condizioni di reazione: toluene a riflusso (110 °C). Ciò ci ha indotto a ricercare condizioni più blande che fossero nel contempo anche eco-compatibili e l'uso dei liquidi ionici (IL) come mezzi di reazione c'è parsa la soluzione più conveniente.

L'impiego di IL come solventi, in reazioni di cicloaddizione, è stato descritto in alcune recenti pubblicazioni, soprattutto per la reazione di Diels-Alder.<sup>87</sup> Studi su cicloaddizioni 1,3-dipolari in IL, invece sono molto più rari e questi ultimi sono qui usati come co-solventi e non come mezzi di reazione.<sup>88</sup>

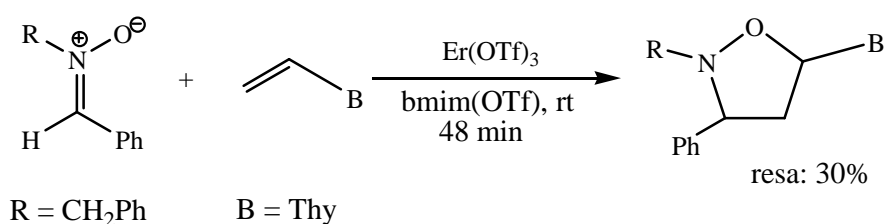
In questo contesto e partendo da alcuni insoddisfacenti risultati preliminari ottenuti dal



Schema 5.4. Risultati preliminari relativi a reazioni di cicloaddizione 1,3-dipolari di nitroni con olefine elettron-ricche.

nostro gruppo di ricerca su reazioni di cicloaddizione di nitroni con alcheni elettron-ricchi in presenza di  $\text{Ce}(\text{OTf})_3$  come catalizzatore (Schema 5.4),

in solventi convenzionali come THF o CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, abbiamo unito la nostra precedente esperienza nel campo delle cicloaddizioni e della catalisi acida di Lewis<sup>89</sup> con le versatili proprietà dei IL al fine di individuare nuove strategie per interessanti sintesi di isossazolidine, così abbiamo messo a punto un metodo di ciclizzazione “soft” tra nitroni e vinilnucleobasi ottenendo nucleosidi modificati: tale metodo consiste nell’uso contemporaneo di Er(OTf)<sub>3</sub>, erbio triflato, e bmim(OTf), 1-butil-3-metilimidazolotriflato, a temperatura ambiente<sup>90</sup> (schema 5.5).



Schema 5.5 Reazione generale in condizioni “soft” di reazione.

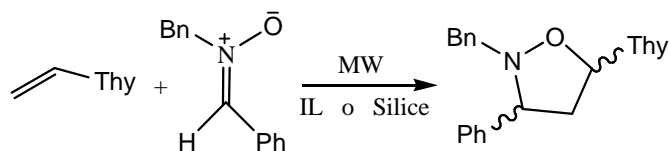
Rispetto alle condizioni convenzionali le reazioni di cicloaddizione effettuate in IL sono più veloci e selettive. Inoltre è molto importante notare che la reazione in queste condizioni è caratterizzata da un semplice work-up: la miscela di reazione è diluita con acqua e il recupero dell’isossazolidina è ottenuto mediante estrazione con etere a cui segue la purificazione del prodotto per cromatografia flash. Ancora, e aspetto forse di maggior rilievo: una volta rimossa sotto vuoto l’acqua dalla fase acquosa, il rimanente IL contenente l’Er(OTf)<sub>3</sub> può essere riciclato e riutilizzato senza perdita né d’attività, né di selettività.

## ***6. Liquidi ionici associati alle Microonde nella cicloaddizione 1,3-dipolare tra nitroni e vinilnucleobasi.***

Nel tentativo di migliorare le rese dei prodotti di cicloaddizione tra nitroni e vinilnucleobasi, solo il 30% nella reazione precedente (schema 5.5), abbiamo associato ai liquidi ionici le microonde, studiando come reazione modello la cicloaddizione 1,3-dipolare fra il *N*-benzil-*C*-fenilnitroni e la viniltimina non protetta mediante



l'applicazione di potenze variabili di microonde in liquido ionico su silice come supporto solido.



Schema 6.1 Reazione generale tra *N*-benzil-*C*-fenil nitrone e viniltimina.

**Tabella 6.1 Reazione tra *N*-benzil-*C*-fenilnitrone e viniltimina in varie condizioni sperimentali.**

#	Alchene	Nitrone	IL	Supporto	Potenza(W)	T(min)	Resa <sup>b</sup> %
1 <sup>a</sup>			bmim(BF <sub>4</sub> )	/	400	1	20
2 <sup>a</sup>			bmim(BF <sub>4</sub> )	/	400	4	30
3 <sup>a</sup>			/	Silice	750	1	5
4 <sup>a</sup>			/	Silice	90	2	50

<sup>a</sup> rapporto vinil nucleobase:nitrone 1:2;

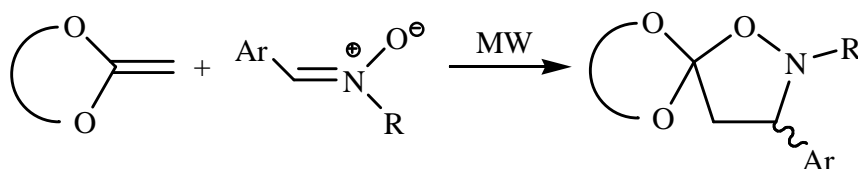
<sup>b</sup> rese calcolate dopo isolamento dei prodotti tramite colonna cromatografica;

Dall'analisi della tabella 6.1 si evince un leggero miglioramento nelle rese, fino al 50% nella reazione 4, ma il dato più interessante è un ulteriore abbattimento dei tempi di reazione oscillanti tra 1 minuto e 4 minuti.

Sulla scia di questi dati abbiamo cercato di capire se davvero il supporto inerte fosse necessario alla nostra reazione e così abbiamo testato la reazione modello tra *N*-benzil-*C*-fenilnitrono e viniltimina con il solo uso di potenze variabili di microonde.

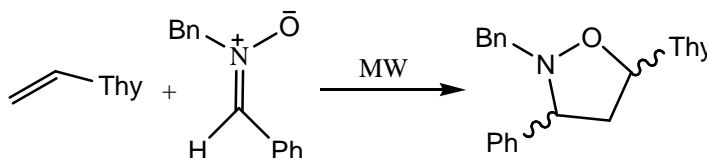
### 7. Ciclizzazione 1,3-dipolare tra nitroni e vinilnucleobasi in condizioni “solvent free” e senza supporto inerte

Non sono presenti in letteratura molti esempi di ciclizzazione 1,3-dipolare tra nitroni e alcheni con il solo uso delle microonde<sup>91</sup>:



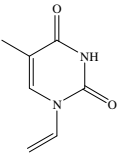
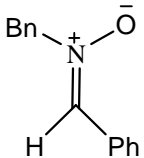
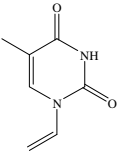
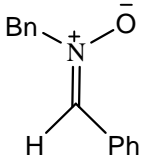
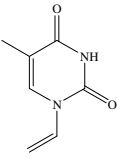
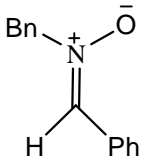
Schema 7.1 Esempio di ciclizzazione 1,3-dipolare tra nitrono e alchene “catalizzata” dalle microonde.

Nello schema 7.1 è presentato uno dei rari esempi, nonostante ciò abbiamo testato la cicloaddizione 1,3-dipolare fra il *N*-benzil-*C*-fenilnitrono e la viniltimina non protetta con il solo uso di microonde in assenza di solventi e di qualunque tipo di supporto solido:



Schema 7.2 Reazione tra *N*-benzil-*C*-fenilnitrono e viniltimina con il solo uso delle microonde.

**Tabella 7.1 Reazione tra *N*-benzil-*C*-fenilnitrono e viniltimina con l'applicazione di potenze variabili di microonde.**

#	Alchene	Nitrono	Potenza(W)	T(min)	Resa <sup>b</sup> %
1 <sup>a</sup>			160	10	/
2 <sup>a</sup>			400	10	/
3 <sup>a</sup>			750	10	80

<sup>a</sup> rapporto vinil nucleobase:nitrono 1:2;

<sup>b</sup> rese calcolate dopo isolamento dei prodotti tramite colonna cromatografica;

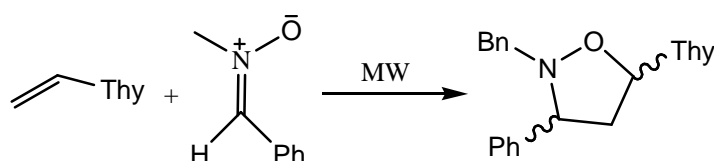
La reazione 3 della tabella 7.1 mostra chiaramente che in queste nuove condizioni sperimentali si ha un netto miglioramento nella resa dei prodotti di reazione rispetto ai nostri precedenti tentativi, quasi mantenendo invariati i tempi di reazione che comunque si presentano del tutto soddisfacenti.

Un'altra importante osservazione da fare è che la procedura sintetica e la fase di work-up successiva risultano essere molto semplici e sono suddivise in sei fasi:

- 1) l'alchene e il nitrono vengono pestati assieme in un mortaio;
- 2) la miscela così ottenuta è omogeneizzata al vortex;
- 3) si trasferisce la miscela in un vessel aperto;
- 4) il vessel è inserito in un forno a microonde domestico con l'applicazione di 750 W di potenza;
- 5) dopo l'appropriato tempo di reazione la miscela di reazione, che ora appare come uno sciroppo, è sciolta in cloroformio o metanolo e analizzata per TLC;
- 6) il prodotto viene purificato tramite colonna cromatografica;

dopo purificazione è interessante notare che il nitrone e la nucleobase non reagita possono essere recuperate e riutilizzati senza perdita di efficacia della reazione.

Visti i risultati incoraggianti di questa reazione abbiamo testato la nostra reazione modello cambiando solo il nitrone impiegato, che questa volta è stato *N*-metil-*C*-fenilnitrono ottenendo gli stessi risultati come si evince chiaramente dalla tabella 7.1.



Schema 7.3 Reazione tra *N*-metil-*C*-fenilnitrono e viniltimina con il solo uso delle microonde.

**Tabella 7.2 Reazione tra *N*-metil-*C*-fenilnitrono e viniltimina con l'applicazione di potenze variabili di microonde.**

#	Alchene	Nitrono	Potenza(W)	T(min)	Resa <sup>b</sup> %
1 <sup>a</sup>			750	15	80

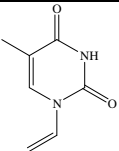
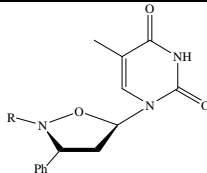
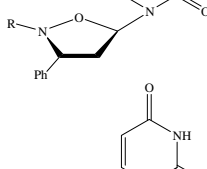
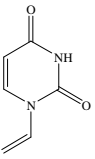
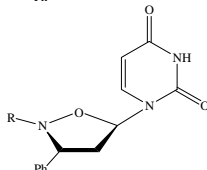
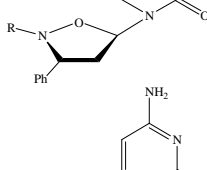
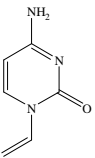
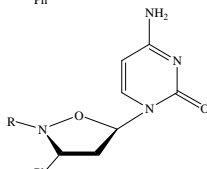
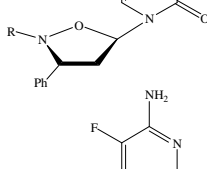
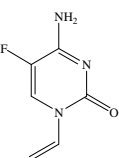
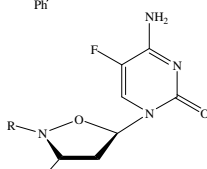
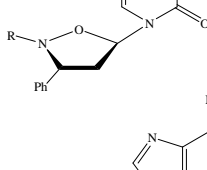
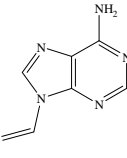
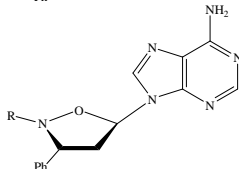
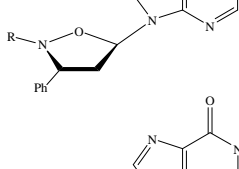
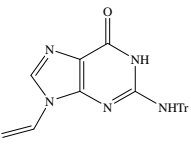
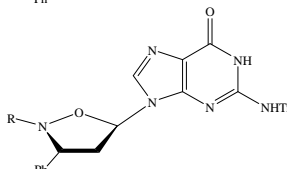
<sup>a</sup> rapporto vinil nucleobase:nitrono 1:2;

<sup>b</sup> rese calcolate dopo isolamento dei prodotti tramite colonna cromatografica;

Un'altra osservazione da fare sulla tabella 7.2 è che in questo caso i tempi di reazione si sono leggermente allungati mantenendo la stessa potenza d'irraggiamento (750 W).

A questo punto avevamo messo a punto una metodica sintetica che, secondo noi, poteva essere estesa a tutta una serie di nitroni e vinilnucleobasi con la concreta possibilità di ottenere risultati del tutto simili a quelli appena presentati, così abbiamo sintetizzato una vasta serie di nitroni, considerando anche le loro caratteristiche strutturali che potrebbero ritornare utili in un'eventuale applicazione terapeutica dei loro prodotti di ciclizzazione, che è stata messa a reagire con la quasi totalità delle basi azotate, puriniche e pirimidiniche, precedentemente vinilate con la metodica già presentata in questa tesi.

**Tabella 7.3. Ciclizzazione “solvent-free” 1,3-dipolare di *N*-vinilnucleobasi non protette con *N*-benzil-*C*-fenil nitrone e *N*-metil-*C*-fenil nitrone sotto l’applicazione di potenze variabili di microonde.<sup>a</sup>**

#	<i>N</i> -vinil nucleobase	Nitrono	T (min)	Prodotto	Rapporto <i>endo:exo</i>	Resa % <sup>b</sup>
1 <sup>a</sup>		<b>2a</b>	10		80:20	80
2 <sup>a</sup>	<b>1a</b>	<b>2b</b>	15		80:20	80
3 <sup>a</sup>		<b>2a</b>	12		78:22	80
4 <sup>a</sup>	<b>1b</b>	<b>2b</b>	20		70:30	80
5 <sup>c</sup>		<b>2a</b>	25		75:25	50
6 <sup>c</sup>	<b>1c</b>	<b>2b</b>	25		65:35	60
7 <sup>c</sup>		<b>2a</b>	25		84:16	90
8 <sup>c</sup>	<b>1d</b>	<b>2b</b>	25		71:29	90
9 <sup>a</sup>		<b>2a</b>	20		70:30	70
10 <sup>a</sup>	<b>1e</b>	<b>2b</b>	20		72:28	72
11 <sup>a</sup>		<b>2a</b>	50		75:25	20
	<b>1f</b>					

<sup>a</sup> rapporto vinilnucleobase:nitrono 1:2;

<sup>b</sup> rese calcolate dopo isolamento dei prodotti tramite colonna cromatografica;

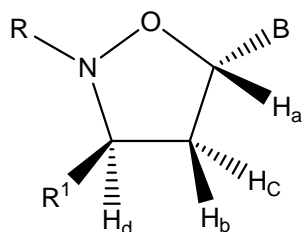
<sup>c</sup> rapporto vinilnucleobase:nitrono 2:1;

L’analisi della tabella 7.3 mostra come la metodica usata dia ampie garanzie di riuscita con una vasta seria di molecole reagenti con tempi di reazione che oscillano tra i 10 e i 25 minuti e rese che vanno dal discreto per le reazioni 5 e 6 all’eccellente per la reazione 7 e 8, solo nel caso della reazione 11 i tempi si dilatano, 50 minuti, senza ottenere di confronto un dato soddisfacente nella resa di reazione, solo il 20 %.

Dalla analisi della tabella si evince un altro dato interessante: il rapporto stereoisomerico che si presenta discreto sempre per la reazione 5 e 6, buono o eccellente per tutte le altre reazioni.

Il valore del rapporto *endo:eso* è stato stabilito attraverso analisi accurate di spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$ . Il metodo si basa sulla misura delle costanti di accoppiamento  $J$  dei protoni legati all'anello isossazolidinico; in letteratura è riportato che per questi protoni l'accoppiamento in *cis* risulta essere sempre maggiore rispetto all'accoppiamento in *trans*<sup>92</sup>.

Utilizzando come riferimento la struttura generale dei composti ottenuti mediante le reazioni di ciclizzazione 1,3-dipolare è possibile spiegare con maggiore chiarezza il metodo utilizzato per la determinazione del rapporto *endo:eso*:

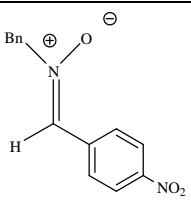
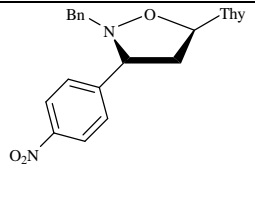
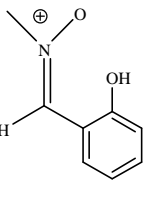
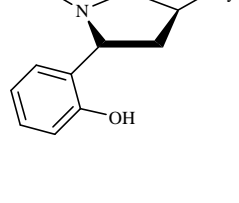
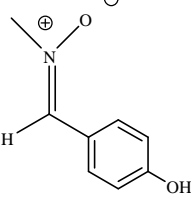
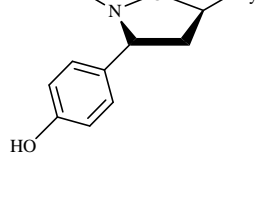
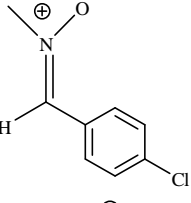
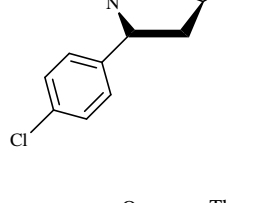
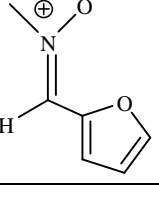
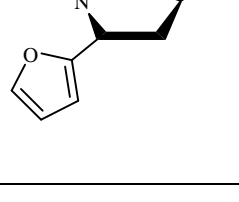


L'anello isossazolidinico presente in figura rappresenta l'isomero *endo* e per definirlo abbiamo calcolato le costanti di accoppiamento  $J_{\text{Ha-Hb}}$ ,  $J_{\text{Ha-Hc}}$ ,  $J_{\text{Hd-Hc}}$ ,  $J_{\text{Hd-Hb}}$ . Come detto, l'accoppiamento in *cis* risulta essere maggiore di quello in *trans* e considerando ciò si ha che  $J_{\text{Ha-Hb}} > J_{\text{Ha-Hc}}$  e  $J_{\text{Hd-Hc}} > J_{\text{Hd-Hb}}$ . Utilizzando le  $J$  calcolate possiamo risalire alla disposizione spaziale dei protoni  $\text{H}_a$  e  $\text{H}_d$ , la quale indica la natura dell'isomero ottenuto; se questi ultimi si trovano in *trans* tra loro l'isomero ottenuto è quello *endo*, in *cis* avremo quindi l'isomero *eso*.

Dalla figura possiamo vedere come il protone  $\text{H}_a$  si accoppia mediante una  $J_{\text{cis}}$  con  $\text{H}_b$ , mentre il protone  $\text{H}_d$  si accoppia mediante una  $J_{\text{trans}}$  con  $\text{H}_b$ . L'accoppiamento di  $\text{H}_c$  con i protoni  $\text{H}_a$  e  $\text{H}_d$  risulta rispettivamente  $J_{\text{trans}}$  e  $J_{\text{cis}}$ . Poiché gli accoppiamenti dei protoni  $\text{H}_a$  e  $\text{H}_d$  con i protoni  $\text{H}_b$  e  $\text{H}_c$  risultano essere diversi essi si troveranno in una disposizione spaziale *trans*.

Successivamente è stata sintetizzata un'altra serie di nitroni sempre testati nelle stesse condizioni sperimentali e i dati di queste nuove reazioni sono presentati in tabella 7.4

**Tabella 7.4 Reazione tra alcuni nitroni e la viniltimina a 750 W**

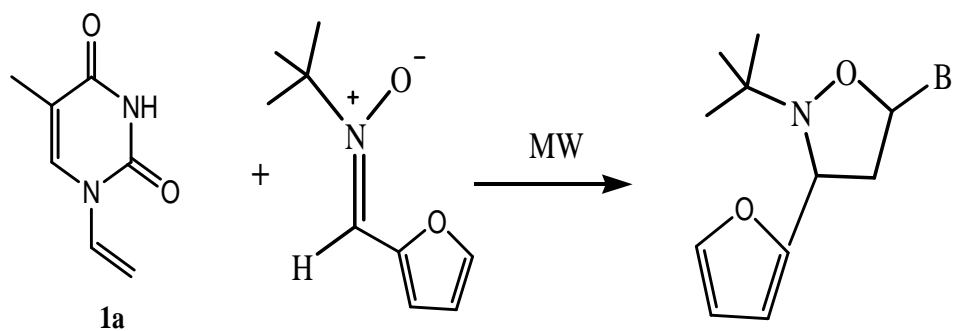
#	Nitrone	Viniltiminat (min)	prodotto	Rapporto endo:exo resa % <sup>b</sup>
12 <sup>a</sup>		30		80:16 90
13 <sup>a</sup>		20		75:25 86
14 <sup>a</sup>		22		76:24 85
15 <sup>a</sup>		20		81:19 80
16 <sup>a</sup>		20		65:35 76

<sup>a</sup>rapporto vinilnucleobase:nitrone 1:2;

<sup>b</sup> rese calcolate dopo isolamento dei prodotti tramite colonna cromatografica;

Come detto precedentemente la tabella 7.5 conferma i dati della tabella precedente, ma quello che a noi interessava particolarmente era riuscire ad ottenere un prodotto di ciclizzazione il piu' possibilmente stereoselettivo, anche nell'ottica di una ipotetico utilizzo futuro di questi prodotti in terapie mediche dove è noto che le varie molecole sono attive anche in base alla loro stereochimica.

Così nel tentativo di soddisfare questa necessità, abbiamo testato la nostra reazione modello tra la viniltimina e la viniladenina con un nitrono ingombrato stericamente tale da poter indirizzare la reazione di ciclizzazione verso la formazione preferenziale di un addotto di ciclizzazione piuttosto del suo corrispondente stereoisomero, il nitrono da noi scelto e poi sintetizzato è stato il *C*-furyl-*N*-*tert*-butilnitrono:



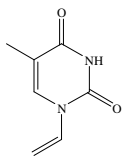
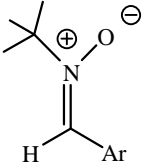
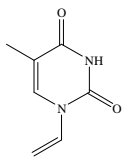
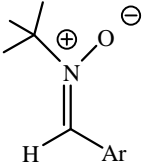
Schema 7.3 Reazione generale con l'uso del nitrono impedito stericamente

B= Timina, Adenina

Ar= Fur



**Tabella 7.5 reazione con nitrone impedito stericamente.**

#	Alchene	Nitrono	Potenza (W)	T(min)	Resa <sup>b</sup> %	Stereoselettività
17 <sup>a</sup>			160	11	91	100:0
18 <sup>a</sup>			400	35	78	100:0

<sup>a</sup>rapporto vinilnucleobase:nitrono 1:2;

<sup>b</sup> rese calcolate dopo isolamento dei prodotti tramite colonna cromatografia;

Come possiamo notare dalla tabella 7.5 abbiamo ottenuto quello che cercavamo ottenendo dalla reazione un solo isomero.

A questo punto è bene fare alcune osservazioni di notevole importanza, finora tralasciate, per il lavoro condotto e per i risultati ottenuti. Per quanto riguarda la stereoselettività della reazione è possibile considerare che l'introduzione di un gruppo ingombrante, come il *t*-butile, sull'azoto del ciclo isossazolidinico comporti la formazione di un unico stereoisomero, come confermato da studi spettroscopici <sup>1</sup>H-NMR. Infatti, nella figura 7.1 è riportato un intervallo dello spettro NMR protonico, effettuato sul grezzo di reazione della 4'-aza-4'-(*N*-*tert*-butil)-3'-futil-2',3'-dideossitimidina.

L'intervallo espanso è relativo al protone legato al C1' del ciclo isossazolidinico, che, in generale, rappresenta un segnale caratteristico per l'individuazione dei possibili stereoisomeri prodotti nella cicloaddizione 1,3-dipolare.

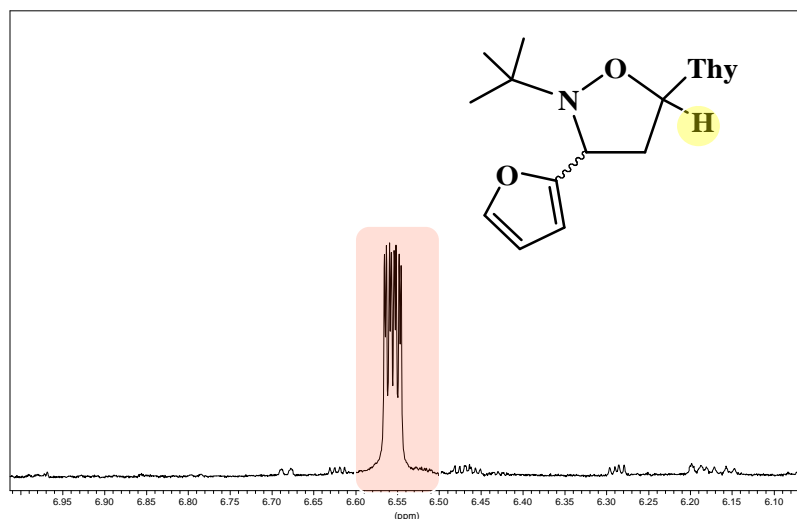


Figura 1

Lo spettro protonico mette in evidenza la presenza di un solo diastereoisomero (rapporto *endo/exo* 0:100), a differenza del comportamento che si osserva ad esempio per il cicloaddotto 4'-aza-4'-(*N*-metil)-3'-furiil-2',3'-dideoossitimidina, preparato in precedenza nel nostro laboratorio, che differisce esclusivamente per la sostituzione di un gruppo *t*-butilico ingombrante con un semplice metile (Figura 7.2).

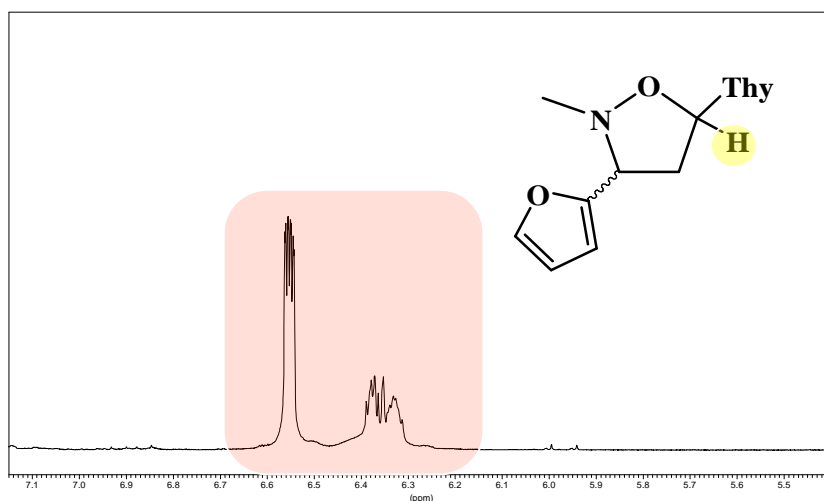


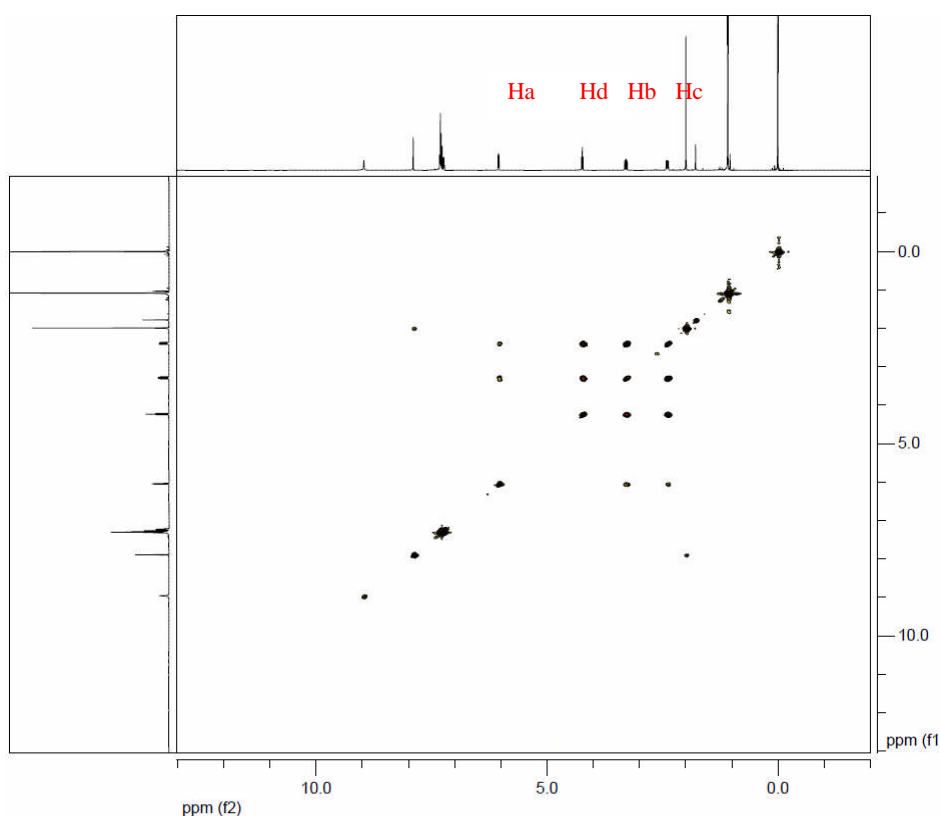
Figura 7.2

La considerazione più immediata e più rilevante da fare è che la presenza del gruppo ingombrante durante lo stato di transizione orienta verso la formazione di un solo diastereoisomero a differenza del metile, che, in questo caso, non solo comporta la

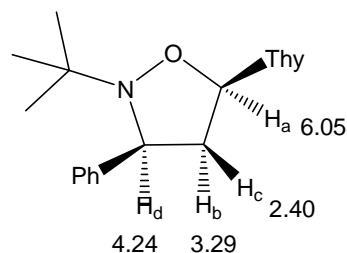
formazione di due diastereoisomeri, ma anche un rapporto diastereoisomerico molto scadente (65:35).

Per poter definire quale fosse lo stereoisomero preponderante è, invece, stato necessario effettuare indagini spettroscopiche più complesse.

Infatti, inizialmente abbiamo condotto uno spettro bidimensionale COSY sul cicloaddotto 4'-aza-4'-(*N*-*tert*-butil)-3'-fenil-2',3'-dideossi-timidina, con il quale è stato possibile risalire alle correlazioni fra i protoni vicini.



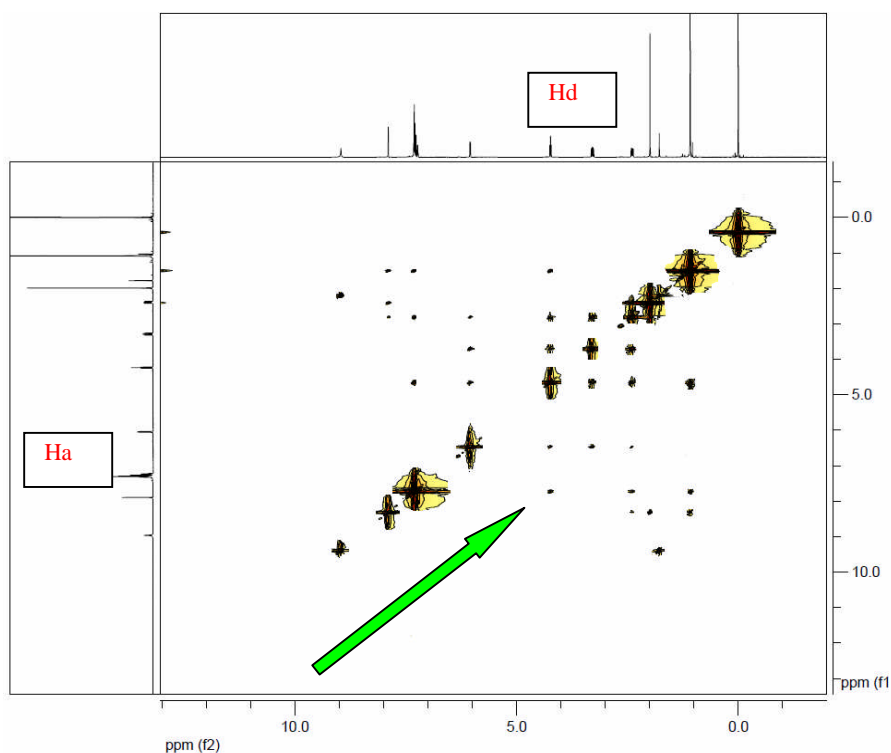
Abbiamo, pertanto, assegnato i *chemical shift* esatti dei protoni più significativi per lo studio della diastereospecificità della reazione. Se identifichiamo i protoni del ciclo con H<sub>a</sub> e H<sub>d</sub> come quelli sul C1' e C3' rispettivamente e H<sub>b</sub>, H<sub>c</sub> come i protoni geminali sul C2', i valori di *chemical shift* in ppm sono i seguenti:



Un successivo esperimento NOESY sulla stessa molecola mette in relazione gli accoppiamenti protonici *long range*, oltre a quelli vicinali e geminali già osservati nella COSY.

In particolare, la presenza di una correlazione fra il protone H<sub>a</sub> e H<sub>d</sub> del ciclo ci ha portato a concludere che l'isomero ottenuto è quello in cui i due protoni in oggetto risultano in *cis*, e quindi l'isomero *exo*; d'altro canto questo risultato sembra allinearsi con quelli riportati in letteratura su strutture simili laddove il *t*-butile tende ad orientare sempre verso la formazione del prodotto *exo*.

Tuttavia, è bene precisare che per avere una conferma definitiva di questo risultato sarà più corretto effettuare studi spettroscopici su prodotti di cicloadizione in cui si formano entrambi i diastereoisomeri, per osservare che la correlazione fra H<sub>a</sub> e H<sub>d</sub> si osserva solo nel caso dell'isomero *exo* e non in quello *endo*, laddove i due protoni in oggetto risulterebbero in *trans*.



## **8. Prove biologiche sui cicloaddotti ottenuti**

Il primo passo nello sviluppo di un nuovo farmaco è la scoperta o la sintesi di molecole con potenziale attività farmacologica. Per legge, la sicurezza e l'efficacia dei farmaci deve essere accertata prima della loro commercializzazione. La maggior parte degli effetti biologici di una molecola deve essere evidenziata, oltre che in studi *in vitro*, anche negli animali da laboratorio prima che possa prendere l'avvio la sperimentazione nell'uomo.

La maggior parte delle sostanze candidate a diventare un nuovo farmaco viene identificata attraverso uno di questi quattro approcci:

- 1) mediante modificazioni della struttura chimica di una molecola conosciuta;
- 2) mediante lo screening di eventuali attività biologiche condotto su un gran numero di prodotti naturali, banche di entità chimiche precedentemente scoperte o grosse "librerie" di peptici ed acidi nucleici;
- 3) mediante la progettazione razionale del farmaco basata sulla conoscenza di meccanismi biologici e strutturistica chimica;
- 4) mediante le biotecnologie e la clonazione con uso di geni per produrre più grandi peptici e proteine.

Indipendentemente dalla sua origine, la molecola che si intende studiare viene sottoposta ad una serie di prove sperimentali per la sua caratterizzazione farmacologica, il cosiddetto *screening*. Per definire l'attività e selettività del potenziale futuro farmaco, vengono impiegati saggi biologici a livello molecolare, cellulare, di organo e sull'animale *in toto*. Il tipo ed il numero dei test di screening iniziali dipendono dall'obiettivo farmacologico. Farmaci antinfettivi saranno provati in primo luogo contro una serie di agenti infettivi; farmaci ipoglicemizzanti saranno testati in primo luogo per valutarne la capacità di abbassare il tasso di zucchero nel sangue, ecc.

## ***8.1 Saggi biologici con il virus di Epstein-Barr (EBV)***

Alcuni tests biologici usano il virus di Epstein-Barr per la determinazione delle potenziali attività farmacologiche, sia come agenti antivirali che come agenti antitumorali, di nuovi composti target.

Il virus di Epstein-Barr (EBV) è stato scoperto nel tentativo di trovare la causa di un linfoma, il più comune tumore che colpiva i bambini di alcune regioni dell'Africa centrale.

Tale sindrome clinica era nota, retrospettivamente, ai clinici e ai patologi fin dall'inizio del XX secolo, ma solo nel 1958 Dennis Burkitt la descrisse dettagliatamente definendone le caratteristiche cliniche ed epidemiologiche<sup>93</sup>.

Nel 1962 lo stesso Burkitt suggerì che tale linfoma, che da lui prese il nome di (BL), potesse essere causato da un virus<sup>94</sup>. Nel 1964 Epstein e Barr<sup>95</sup> e Pulvertaft riportarono contemporaneamente in alcune pubblicazioni su *Lancet* il primo tentativo di produrre linee cellulari linfoblastoidi da campioni di biopsie di linfoma di Burkitt. Successivamente furono trovate, in sezione sottili di tali linee cellulari, particelle virali morfologicamente simili al gruppo degli Herpesvirus<sup>96</sup>. Tali particelle furono riscontrate anche in linee linfoidi generate da pazienti con diverse patologie, da pazienti con infezione mononucleotica e da individui apparentemente sani.

Cellule che producevano particelle virali furono trovate da W. e G. Henle<sup>97</sup> nell'intento di ottenere antigeni rivelabili con immunofluorescenza indiretta usando sieri di pazienti con linfoma di Burkitt come fonte di anticorpi.

Sulla base di altri studi epidemiologici gli Henle e i loro collaboratori dimostrarono che EBV era anche l'agente eziologico della mononucleosi infettiva, dal momento che anticorpi contro gli antigeni riscontrati nelle linee cellulari BL erano assenti prima della mononucleosi e comparivano dopo la malattia. Una sorprendente proprietà biologica dell'EBV, vale a dire la sua capacità di causare continua crescita di linee cellulari linfoidi, fu scoperta dalla coltivazione contemporanea di cellule letalmente X-irradiate di una linea BL (JiJoye) e da linee leucemiche (LS) con linfociti freschi neonatali.

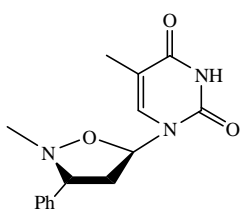
Le cellule neonatali furono indotte a proliferare indefinitivamente in vitro, che il principale trasformatore fosse EBV fu dimostrato da una serie di esperimenti nei quali si dimostrava che l'attività trasformante era presente in un ultrafiltrato, che poteva essere

purificato con centrifugazione a gradiente di zucchero e che l'attività trasformante era neutralizzata da siero umano contenente anticorpi anti-EBV.

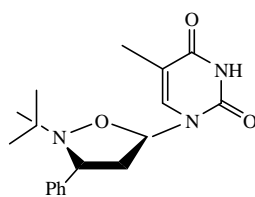
Si dimostrò quindi che il virus era capace di immortalizzare, provocare la proliferazione indefinita, *in vitro* i linfociti di alcuni primati non umani. Alcune di queste linee cellulari rilasciavano grande quantità di virus che furono utilizzati per caratterizzazioni biologiche, immunologiche, biochimiche.

## 8.2 Saggi biologici sui cicloaddotti ottenuti

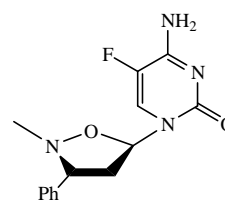
Per quanto concerne i composti da noi ottenuti, in prima analisi è importante sottolineare che gli addotti sintetizzati sono stati scelti in funzione di quelli che potevano essere i gruppi sostituenti, sull'anello isossazolidinico, più interessanti da un punto di vista farmacologico certamente tanto è stato fatto ma altrettanto dovrà essere fatto per riuscire a trovare le combinazioni più opportune in funzione di una migliore attività biologica, infatti su tre dei nostri cicloaddotti sono già state effettuate delle prove biologiche che ne hanno evidenziato la loro attività, sia antivirale che antitumorale, anche se ancora a livelli di concentrazione non ottimali.



Composto 1



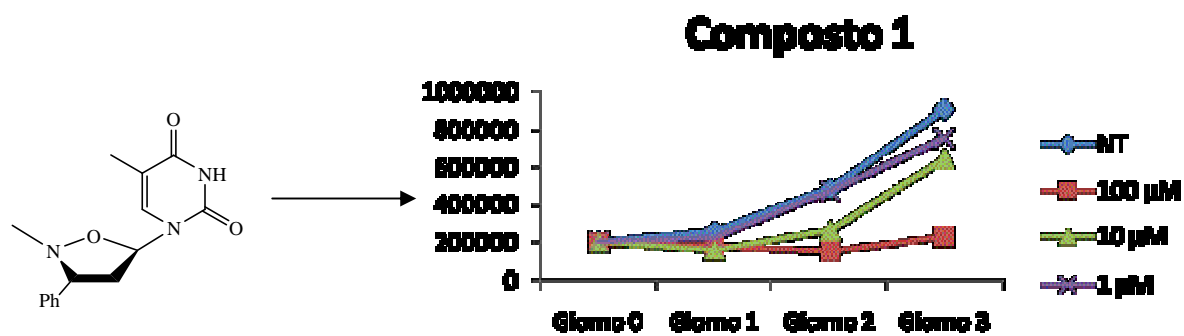
Composto 2



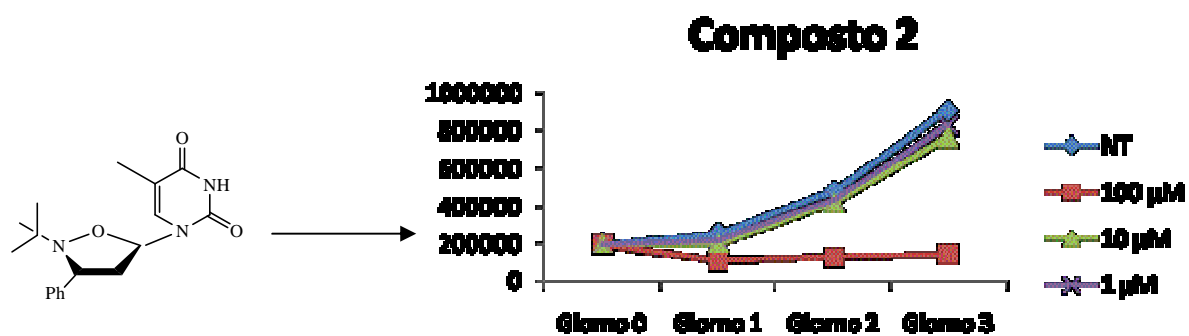
Composto 3

I tre composti sono stati testati con le linee cellulari CS LCL (linea cellulare immortalizzata *in vitro* con il virus di Epstein-Barr [EBV]) e con Jiloye (linea tumorale EBV-positiva).

Risultati linea CS LCL:

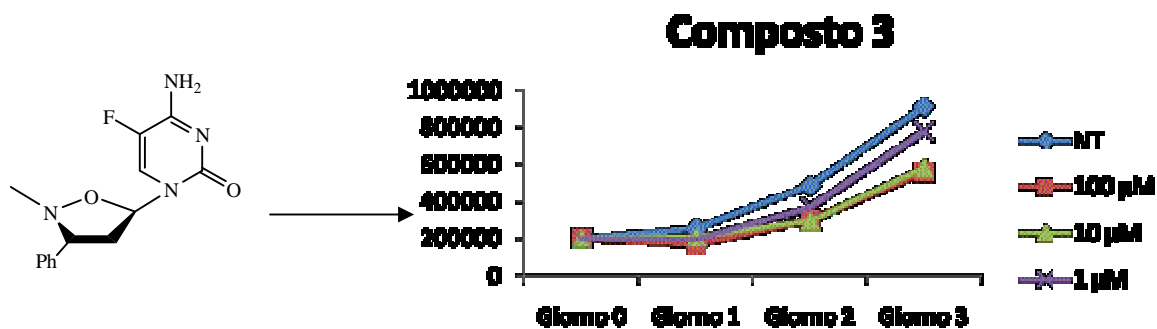


Dal grafico si evince che la crescita cellulare è totalmente inibita dopo tre giorni a concentrazioni 100 µM.



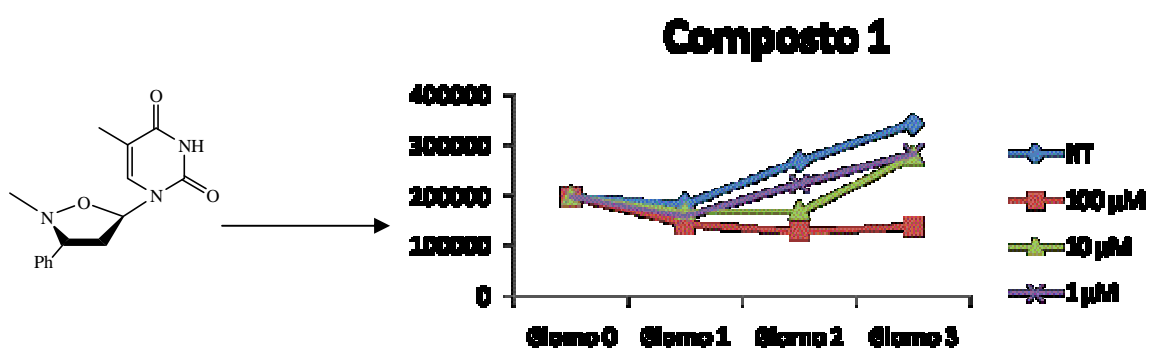
Anche in questo caso dal grafico si evince che la crescita cellulare è totalmente inibita dopo tre giorni a concentrazioni 100 µM.



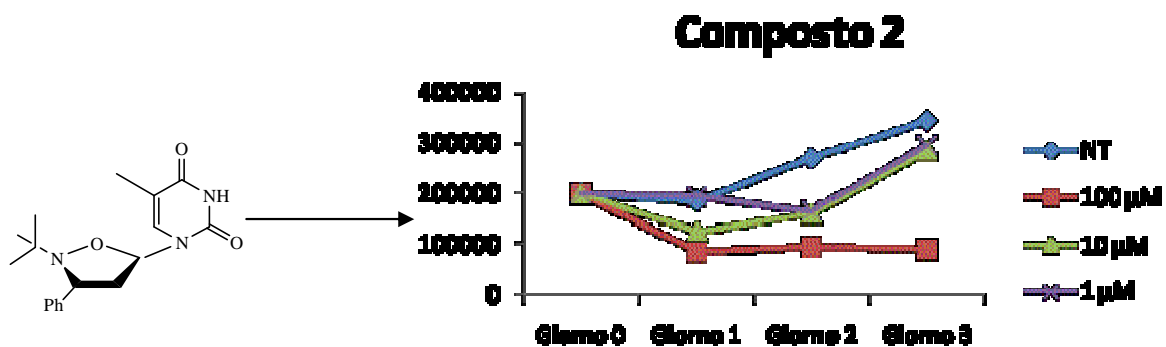


In questo caso non abbiamo dati di inibizione cellulare attendibili.

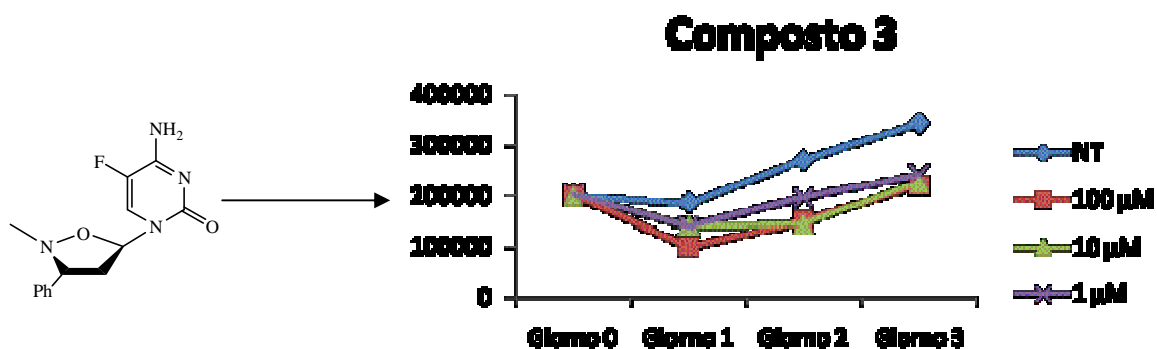
**Risultati linea Jiloye:**



Dal grafico si evince che la crescita cellulare è totalmente inibita dopo tre giorni a concentrazioni 100 µM.



Anche in questo caso dal grafico si evince che la crescita cellulare è totalmente inibita dopo tre giorni a concentrazioni 100 µM.



In questo caso non abbiamo dati di inibizione cellulare attendibili.

I risultati di entrambe le linee cellulari presentano dati incoraggianti, come l'inibizione quasi totale della crescita cellulare dopo soli due giorni di trattamento con i primi due composti, e ancora non abbiamo dati definitivi per tutta una serie di molecole affini già sintetizzate e che potrebbero dimostrarsi ancora più efficaci.

## 9. Conclusioni

La particolare metodologia di cicloadizione 1,3-dipolare, assistite da microonde, ha permesso di ottenere, in tempi brevi e con alte rese, 4'-aza-2',3'-dideossinucleosidi desiderati. Il metodo, come già dimostrato da studi precedenti, si propone come strategia sintetica innovativa e, messo a confronto con i metodi classici di reazione, risulta vantaggioso in più punti di seguito riassunti:

- 1) costruzione dei nucleosidi senza l'uso di nessun tipo di protezione delle nucleobasi;
- 2) reazioni altamente regioselettive;
- 3) tempi di reazione brevi;
- 4) rese chimiche elevate;
- 5) minore formazione di sotto-prodotti;
- 6) esclusione del solvente durante la reazione.

Di grande importanza è l'aspetto stereochimico di questo studio che ha mostrato come l'utilizzo di nitroni contenenti gruppi *N-ter*-butilici porti a reazioni altamente diastereoselettive, con un rapporto *eso/endo* maggiore del 98% a favore di un unico diastereoisomero. La fase successiva riguarderà l'enantioselezione del processo attraverso la messa a punto di vie di sintesi enantioselettive sia dei composti modello già preparati, che di ulteriori nucleosidi modificati a partire anche da vinilnucleobasi non naturali, come ad esempio la 5-fluorovinilcitosina e il 5-fluoroviniluracile. Lo studio dell'attività biologica, di cui questa tesi riporta alcuni dati preliminari, verrà completato con la valutazione dell'intero set di nucleosidi descritti e l'estensione a nucleosidi modificati con basi azotate non naturali.

## 10. Parte sperimentale

### *Premessa:*

I reagenti commercialmente disponibili sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich.

I solventi sono stati anidrificati e distillati prima dell'uso secondo le procedure riportate in letteratura (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> su CaCl<sub>2</sub>, etere etilico su sodio e benzofenone).

I reagenti a stato solido e quelli a stato liquido commercialmente disponibili con grado di purezza almeno del 98% sono stati utilizzati come tali; gli altri sono stati cristallizzati, i primi, e distillati, i secondi in base alle procedure riportate in letteratura.

Le *N*-vinilnucleobasi sono state sintetizzate nel nostro laboratorio con la metodica presentata anche in questa tesi di dottorato<sup>5</sup>, la stessa cosa vale per il [bmim][BF<sub>4</sub>].

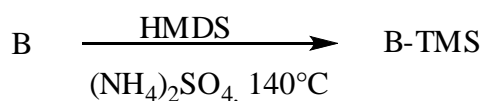
La cromatografia su strato sottile è stata effettuata usando lastre di gel di silice su vetro DURASIL-25UV254 della Merck.

Per la cromatografia flash su colonna corta si è usata silice Merck Kieselgel 60 H senza gesso.

Le reazioni di cicloadizione sono state effettuate mediante irradiazione di microonde in un forno a microonde commerciale (Whirlpool AVM119/1/WP/WH) alla potenza di 750 W.

### **9.1 Metodo generale di sililazione delle nucleobasi (timina, adenina, citosina, uracile).**

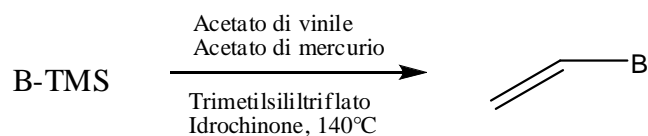
Reazione:



In un pallone a due colli, munito di refrigerante e di agitatore magnetico, sotto leggero flusso di azoto, sono messi a reagire la nucleobase (1eq), l'esametildisilazano (5eq) e tracce di solfato di ammonio ad una temperatura di 140 °C. Al termine della reazione, ovvero quando la sospensione si trasforma in una soluzione limpida, si lascia raffreddare e si elimina la specie volatile per distillazione a pressione ridotta, mantenendo il più possibile le condizioni di anidricità, onde evitare la deprotezione dei trimetilsilili. Si ottiene in tutti i casi un solido bianco.

## 9.2 Metodo generale di Vinilazione delle nucleobasi

Reazione:

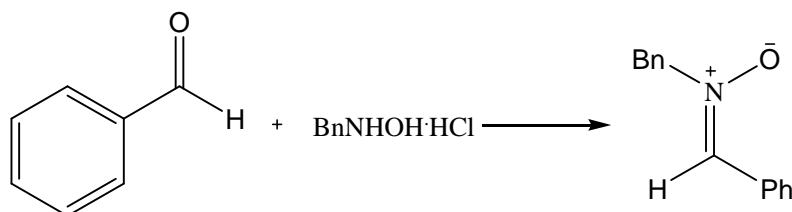


Dopo aver lasciato la nucleobase sililata a riposo per una notte in freezer, nello stesso pallone di reazione vengono aggiunti l'acetato di vinile (5 eq.), l'acetato di mercurio (1 eq.), l'idrochinone (agente anti polimerizzante) e il trimetilsililtriflato (0.1 eq.) che avrà la funzione di catalizzatore. La reazione è svolta sotto flusso di azoto per un tempo che va dalle due alle sei ore, in funzione della nucleobase utilizzata.

Il prodotto ottenuto viene purificato mediante cromatografia flash usando come miscela eluente una soluzione 9:1 di  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  e come fase stazionaria la silice.

### 9.3 Sintesi del C-fenil-N-benzil nitrone

Reazione:



Reattivi	P.M.	Quantità	Moli (mmol)	Densità	Rap. Molare
Benzaldeide	106.04	2.81 ml	30.37	1.146	1.1
N-benzilidrossilammina idroclorata	159.04	2.0 g	12.57		1
Soluzione NaOH 2N	40	1.04 g in 13 ml di acqua	26		
Acqua distillata		16 ml			

Una miscela di una soluzione di NaOH (2N) e di benzaldeide è lasciata sotto agitazione per 10 min. A questa soluzione si unisce quella formata da N-benzilidrossilammina cloridrata precedentemente disciolta in acqua fredda. Il sistema è lasciato in agitazione per 3 h a temperatura ambiente. La reazione è monitorata mediante TLC ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1).

Gli estratti organici sono anidrificati e concentrati sotto vuoto. L'olio ottenuto è lasciato solidificare a  $3^\circ\text{C}$ , quindi è lavato su imbuto a setto poroso con esano per eliminare eventuali tracce di benzaldeide. Il nitrone è ottenuto con resa del 75%.

#### 9.4 Sintesi del C-fenil-N-metil nitrone

Reazione:



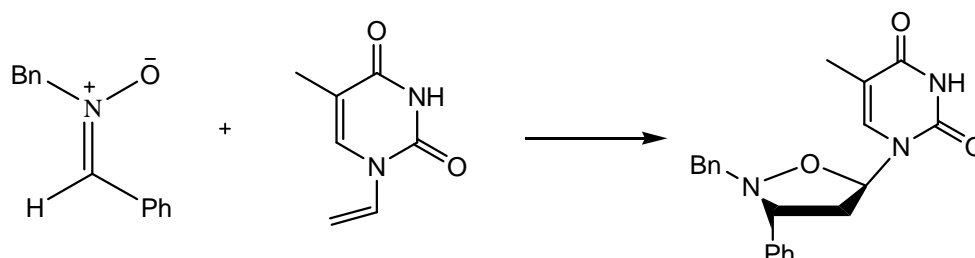
Reattivi	P.M.	Quantità	Moli (mmol)	Densità	Rap. Molare
Benzaldeide	106.04	2.81 ml	30.37	1.146	1.1
N-metilidrossilammina idroclorata	83.52	2.0 g	23.95		1
Soluzione NaOH 2N	40	1.04 g in 13 ml d'acqua	26		
Acqua distillata		16 ml			

La procedura di sintesi ricalca quella precedentemente descritta. Il nitrone si presenta sottoforma di solido bianco (80%).

I dati spettroscopici sono compatibili con quelli riportati in letteratura.

## 9.5 Sintesi del cicloaddotto 4'-aza-4'-(*N*-benzil)-3'-fenil-2',3'-dideossitimidina

Reazione:



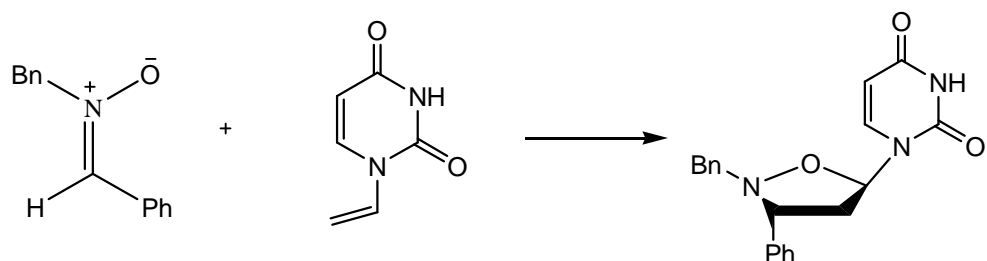
Reattivi	P.M.	Quantità (mmol)	Moli	Rap. Molare
<i>C</i> -fenil- <i>N</i> -benzil nitrone	211	0.416 g	1.97 mmol	2
Viniltimina	152.13	0.150 g	0.986 mmol	1

La particolare metodologia di sintesi ci permette di escludere l'uso del solvente. In un portacampione resistente al calore sono stati inseriti 0.416 g di *N*-benzil-*C*-fenil nitrone e 0.150 g di viniltimina. I reagenti si presentano allo stato solido come polveri; per avere una migliore miscelazione tra essi, abbiamo posto sotto agitazione, per qualche istante, il portacampione al vortex. Successivamente i reagenti sono stati inseriti nel forno microonde ad una potenza di 750 W. La reazione è controllata per TLC utilizzando come miscela eluente una soluzione 9:1(v/v) di CHCl<sub>3</sub>/MeOH, anche se la fine della reazione si può ricondurre all'osservazione della formazione di una soluzione sciropposa (10 min 80%). Il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia su colonna corta. Il prodotto, sotto forma di solido bianco, è stato caratterizzato attraverso analisi <sup>1</sup>H-NMR.



## 9.6 Sintesi del cicloaddotto 4'-aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2',3'-dideoossiuracile

Reazione:

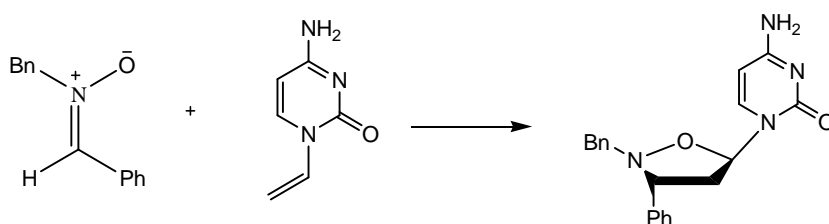


Reattivi	P.M.	Quantità (mmol)	Moli	Rap. Molare
C-fenil-N-benzil nitrone	211	0.305 g	1.45 mmol	2
Viniluracile	138	0.100 g	0.725 mmol	1

La procedura di sintesi ricalca quella precedentemente descritta, il tempo di reazione in questo caso è di 12 minuti. Il cicloaddotto si presenta sotto forma di solido bianco (80%), ed è stato caratterizzato attraverso analisi  $^1\text{H-NMR}$ .

### 9.7 Sintesi del cicloaddotto 4'-aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2',3'-dideossicitosina

Reazione:

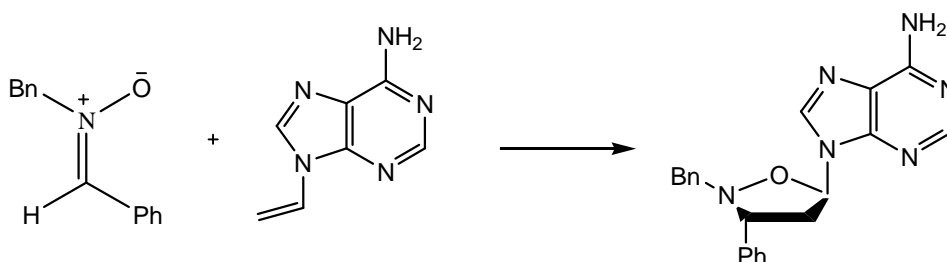


Reattivi	P.M.	Quantità (mmol)	Moli	Rap. Molare
C-fenil-N-benzil nitrone	211	0.077 g	0.365 mmol	1
Vinilcitosina	137	0.100 g	0.73 mmol	2

La procedura di sintesi ricalca quella precedentemente descritta, il tempo di reazione in questo caso è di 25 minuti. Il cicloaddotto si presenta sotto forma di solido giallino (50%), ed è stato caratterizzato attraverso analisi  $^1\text{H-NMR}$ .

### 9.8 Sintesi del cicloaddotto 4'-aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2',3'-dideossiadenina

Reazione:

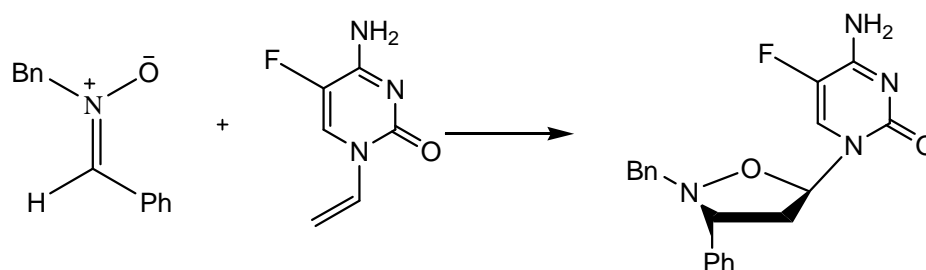


Reattivi	P.M.	Quantità (mmol)	Moli	Rap. Molare
C-fenil-N-benzil nitrone	211	0.260 g	1.24 mmol	1
Viniladenina	161.13	0.100 g	0.62 mmol	2

La procedura di sintesi ricalca quella precedentemente descritta, il tempo di reazione in questo caso è di 20 minuti. Il cicloaddotto si presenta sotto forma di solido bianco (70%), ed è stato caratterizzato attraverso analisi  $^1\text{H-NMR}$ .

### 9.9 Sintesi del cicloaddotto 4'-aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2',3'-dideossi-5-fluorocitosina

Reazione:

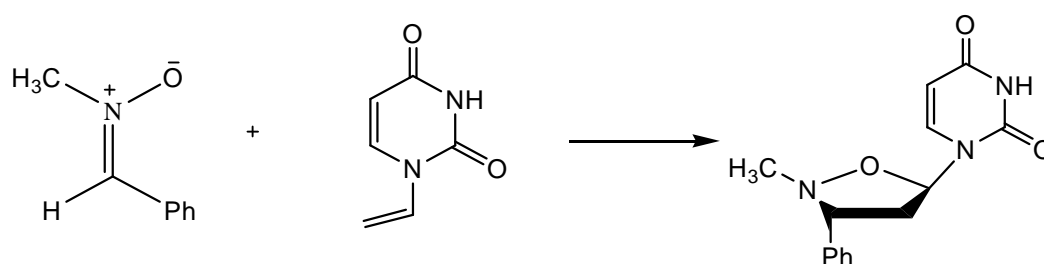


Reattivi	P.M.	Quantità (mmol)	Moli	Rap. Molare
C-fenil-N-benzil nitrone	211	0.075 g	0.35 mmol	1
Vinil-5-fluorocitosina	155	0.110 g	0.71 mmol	2

La procedura di sintesi ricalca quella precedentemente descritta, il tempo di reazione in questo caso è di 25 minuti. Il cicloaddotto si presenta sotto forma di solido giallino (90%), ed è stato caratterizzato attraverso analisi  $^1\text{H-NMR}$ .

### 9.10 Sintesi del cicloaddotto 4'-aza-4'-(*N*-metil)-3'-fenil-2',3'-dideossiuracile

Reazione:

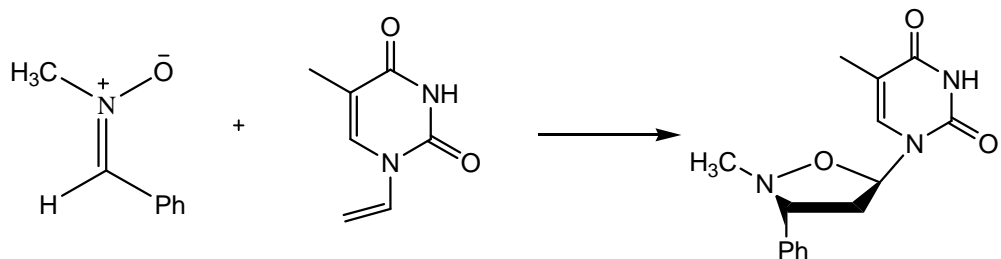


Reattivi	P.M.	Quantità (mmol)	Moli	Rap. Molare
<i>C</i> -fenil- <i>N</i> -metil nitrone	135	0.293 g	2.17 mmol	2
Viniluracile	138	0.150 g	1.08 mmol	1

La procedura di sintesi ricalca quella precedentemente descritta, il tempo di reazione in questo caso è di 20 minuti. Il cicloaddotto si presenta sotto forma di solido bianco (80%), ed è stato caratterizzato attraverso analisi  $^1\text{H-NMR}$ .

### 9.11 Sintesi del cicloaddotto 4'-aza-4'-(*N*-metil)-3'-fenil-2',3'-dideossitimidina

Reazione:

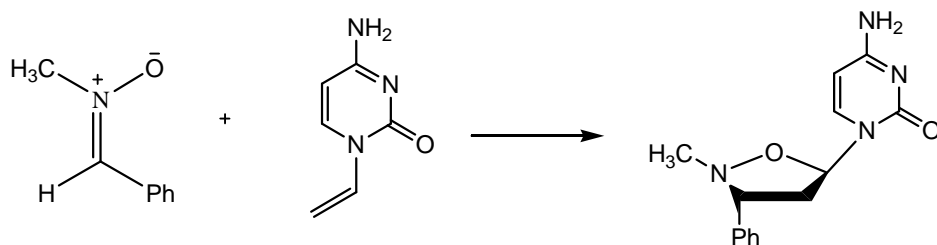


Reattivi	P.M.	Quantità (mmol)	Moli	Rap. Molare
<i>C</i> -fenil- <i>N</i> -metil nitrone	135	0.2665 g	1.97 mmol	2
Viniltimina	152.13	0.150 g	0.986 mmol	1

La procedura di sintesi ricalca quella precedentemente descritta, il tempo di reazione in questo caso è di 15 minuti. Il cicloaddotto si presenta sotto forma di solido bianco (80%), ed è stato caratterizzato attraverso analisi  $^1\text{H-NMR}$ .

### 9.12 Sintesi del cicloaddotto 4'-aza-4'-(*N*-metil)-3'-fenil-2',3'-dideossicitosina

Reazione

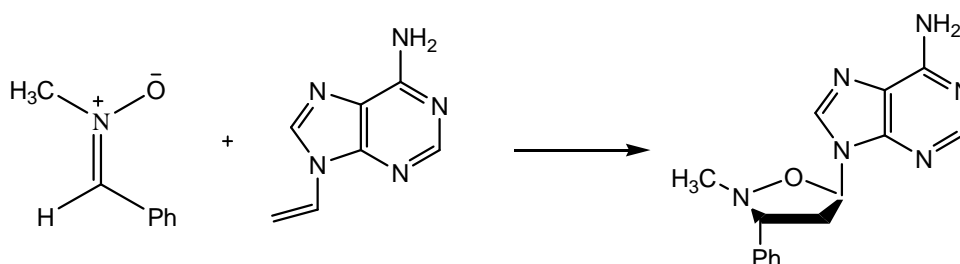


Reattivi	P.M.	Quantità (mmol)	Moli	Rap. Molare
<i>C</i> -fenil- <i>N</i> -metil nitrone	135	0.074 g	0.548 mmol	1
Vinilcitosina	137	0.150 g	1.94 mmol	2

La procedura di sintesi ricalca quella precedentemente descritta, il tempo di reazione in questo caso è di 25 minuti. Il cicloaddotto si presenta sotto forma di solido giallino (60%), ed è stato caratterizzato attraverso analisi <sup>1</sup>H-NMR.

### 9.13 Sintesi del cicloaddotto 4'-aza-4'-(*N*-metil)-3'-fenil-2',3'-dideossiadenina

Reazione:

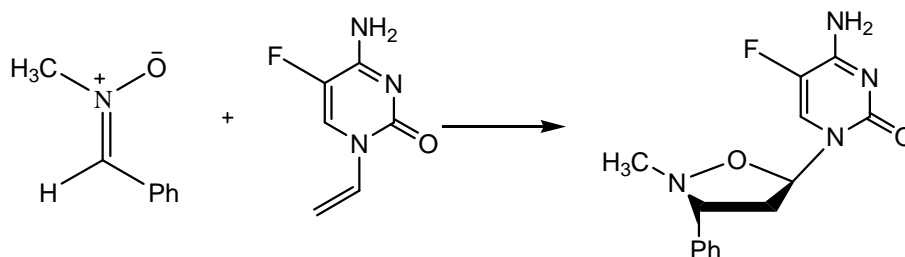


Reattivi	P.M.	Quantità (mmol)	Moli	Rap. Molare
<i>C</i> -fenil- <i>N</i> -metil nitrone	135	0.251 g	1.86 mmol	2
Viniladenina	161.13	0.150 g	0.93 mmol	1

La procedura di sintesi ricalca quella precedentemente descritta, il tempo di reazione in questo caso è di 20 minuti. Il cicloaddotto si presenta sotto forma di solido bianco (72%), ed è stato caratterizzato attraverso analisi <sup>1</sup>H-NMR.

### 9.14 Sintesi del cicloaddotto 4'-aza-4'-(*N*-metil)-3'-fenil-2',3'-dideoossi-5-fluorocitosina

Reazione:

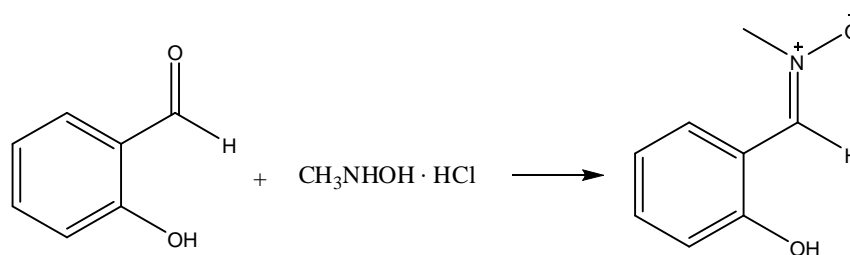


Reattivi	P.M.	Quantità (mmol)	Moli	Rap. Molare
<i>C</i> -fenil- <i>N</i> -metil nitrone	135	0.0435 g	0.322 mmol	1
Vinil-5-fluorocitosina	155	0.100 g	0.645 mmol	2

La procedura di sintesi ricalca quella precedentemente descritta, il tempo di reazione in questo caso è di 25 minuti. Il cicloaddotto si presenta sotto forma di solido giallino (90%), ed è stato caratterizzato attraverso analisi  $^1\text{H-N}$

### 9.15 Sintesi del *C*-2-idrossifenil-*N*-metil-nitrone

Reazione:



Reattivi	P.M.	Quantità	Moli (mmol)	Densità	Rap. Molare
Salicilaldeide	122.12	2.81 ml	26.34	1.146	1.1
<i>N</i> -metilidrossilammina idroclorata	83.52	2.0 g	23.95		1
Soluzione NaOH 2N	40	1.04 g in 13 ml di acqua	26		
Acqua distillata		16 ml			

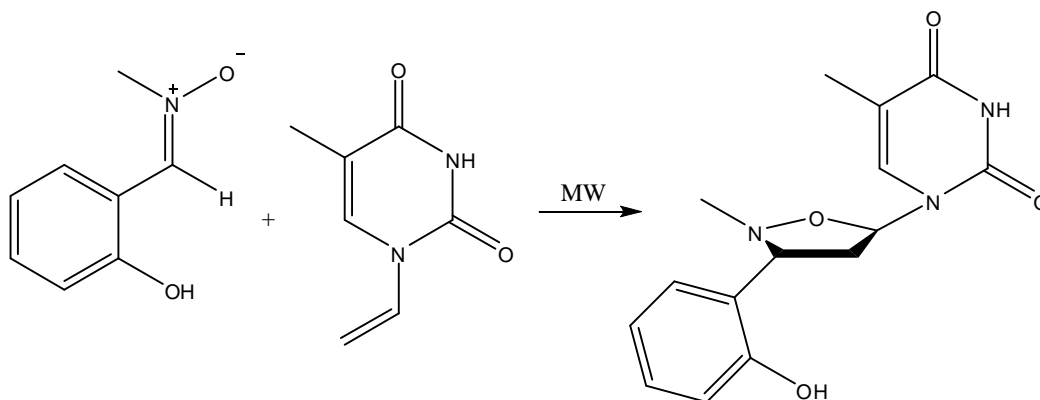
In una beuta da 100 ml è sciolta la metilidrossilammina idroclorata in 3 ml d'acqua distillata. In un'altra beuta sono versati 13 ml di una soluzione 2N di NaOH e 2,81 ml di salicilaldeide. Dopo che la metilidrossilammina è sciolta completamente, le due soluzioni si uniscono e si mantiene sotto agitazione per un'ora a temperatura ambiente. La reazione è controllata per TLC (miscela 9:1 v/v CHCl<sub>3</sub>/MeOH).

A fine reazione, la frazione organica è estratta con CHCl<sub>3</sub> (3x15 mL), anidrificata su solfato di sodio e portata a secco mediante evaporatore rotante. Al termine della rimozione del solvente si ottiene un solido giallo che necessita di un lavaggio con esano per allontanare l'eccesso di salicilaldeide. La resa della reazione risulta essere dell'83% e i dati spettroscopici relativi al nitrone sintetizzato sono compatibili con quelli riportati in letteratura.



## 9.16 Sintesi del cicloaddotto 4'-aza-4'-(*N*-metil)-3'-o-idrossifenil-2',3'-dideossitimidina

Reazione:

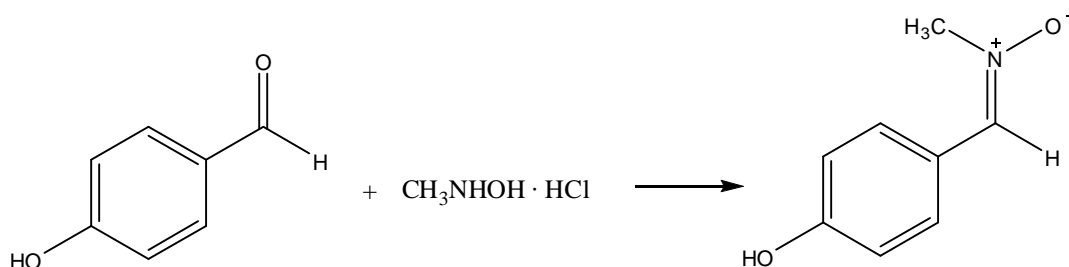


Reattivi	P.M.	Quantità (mmol)	Moli	Rap. Molare
C-2-idrossifenil- <i>N</i> -metil nitrone	151.14	0.285 g	1.886 mmol	2
Viniltimina	152.13	0.143 g	0.940 mmol	1

La procedura di sintesi ricalca quella precedentemente descritta, il tempo di reazione in questo caso è di 20 minuti. Il cicloaddotto si presenta sotto forma di solido bianco (86%), ed è stato caratterizzato attraverso analisi  $^1\text{H-NMR}$ .

### 9.17 Sintesi del C-p-idrossifenil-N-metil nitrone

Reazione:



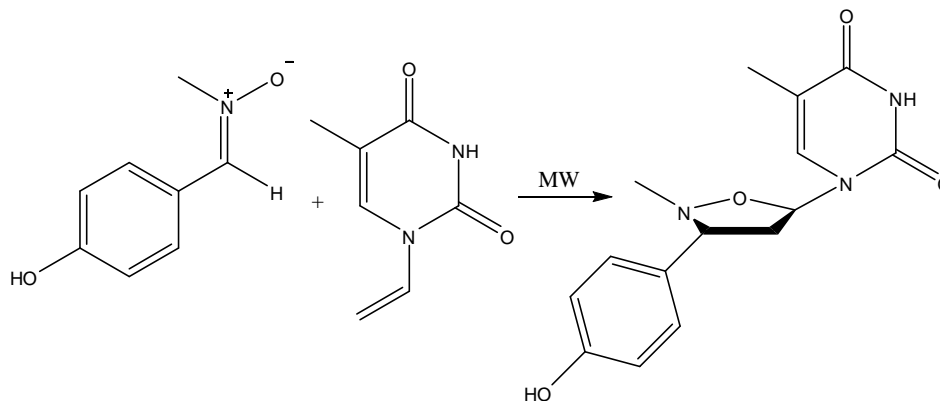
Reattivi	P.M.	Quantità	Moli (mmol)	Densità	Rap. Molare
P-idrossibenzaldeide	122.12	3.22 g	26.34		1.1
N-metilidrossilammina idroclorata	83.52	2.0 g	23.95		1
Soluzione NaOH 2N	40	1.04 g in 13 ml d'acqua	26		
Acqua distillata		16 ml			

La procedura di sintesi ricalca quella precedentemente descritta. Il nitrone si presenta sottoforma di solido bianco (85%).

I dati spettroscopici sono compatibili con quelli riportati in letteratura.

### 9.18 Sintesi del cicloaddotto 4'-aza-4'-(*N*-metil)-3'-*p*-idrossifenil-2',3'-dideossitimidina

Reazione:

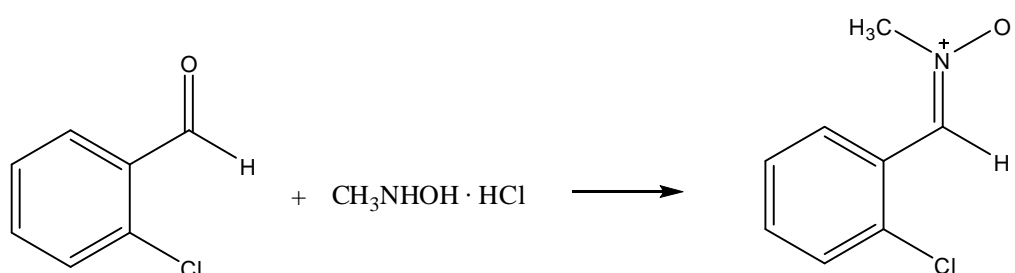


Reattivi	P.M.	Quantità	Moli (mmol)	Rap. Molare
<i>C-p</i> -idrossifenil- <i>N</i> -metil nitrone	151.14	0.285 g	1.886	2
Viniltimina	152.13	0.143 g	0.940	1

La procedura di sintesi ricalca quella precedentemente descritta, il tempo di reazione in questo caso è di 22 minuti. Il cicloaddotto si presenta sotto forma di solido bianco (85%), ed è stato caratterizzato attraverso analisi  $^1\text{H-NMR}$ .

### 9.19 Sintesi del *C*-2-clorofenil-*N*-metil nitrone

Reazione:

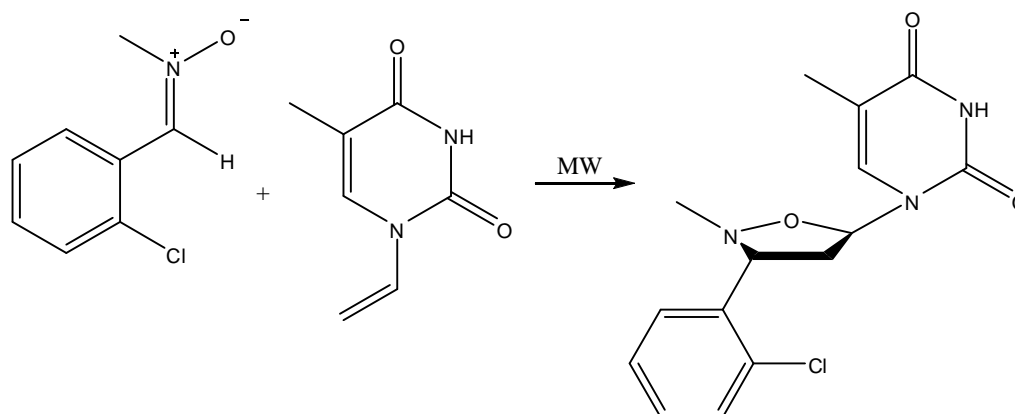


Reattivi	P.M.	Quantità	Moli (mmol)	Densità	Rap. Molare
2-clorobenzaldeide	140.56	2.80 ml	24.86	1.248 g/ml	1.1
<i>N</i> -metilidrossilammina idroclorata	83.52	1.9 g	22.75		1
Soluzione NaOH 2N	40	1.04 g in 13 ml di acqua	26		
Acqua distillata		16 ml			

Anche per questo nitrone si segue la stessa metodologia già descritta. Il prodotto finale si presenta sottoforma di un olio giallino che posto in frigo solidifica (89%).

### 9.20 Sintesi del cicloaddotto 4'-aza-4'-(*N*-metil)-3'-o-clorofenil-2',3'-dideossitimidina

Reazione:

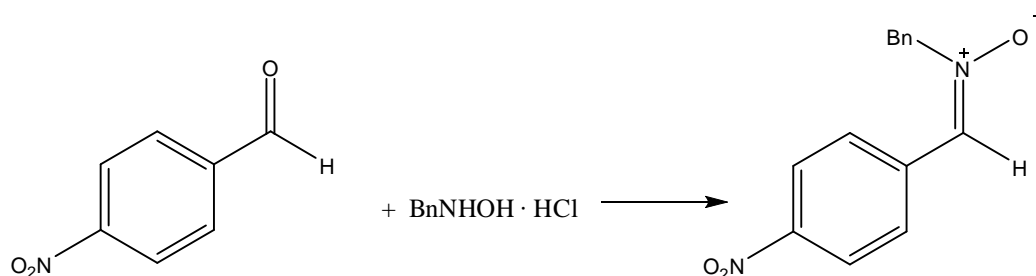


Reattivi	P.M.	Quantità	Moli (mmol)	Rap. Molare
<i>C</i> -2-clorofenil- <i>N</i> -metil nitrone	169.6	0.334 g	1.969	2
Viniltimina	152.13	0.150 g	0.987	1

La sintesi al microonde è durata 20 minuti e il prodotto ottenuto (solido giallo, 80%) è stato caratterizzato con  $^1\text{H-NMR}$ .

### 9.21 Sintesi del *C-p*-nitrofenil-*N*-benzil nitrone

Reazione:



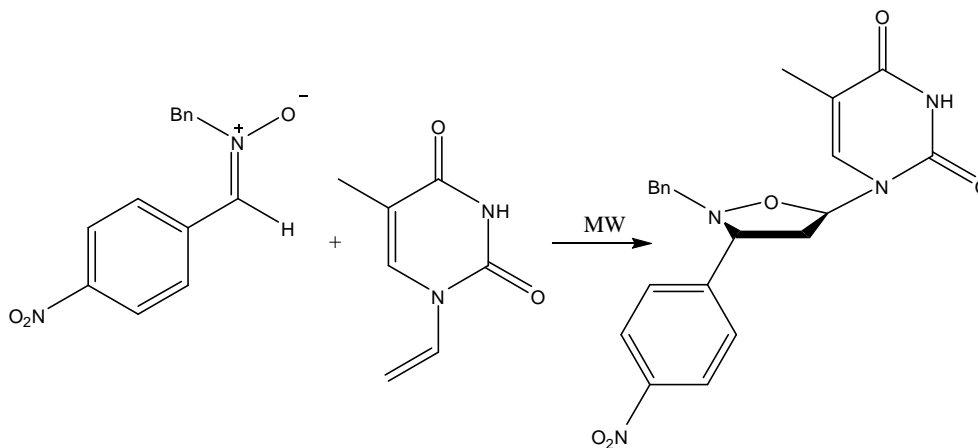
Reattivi	P.M.	Quantità	Moli (mmol)	Densità	Rap. Molare
<i>P</i> -nitrobenzaldeide	151.08	2.70 g	17.87		1.1
<i>N</i> -benzildrossilammina idroclorata	123.14	2.0 g	16.24		1
Soluzione NaOH 2N	40	1.04 g in 13 ml di acqua	26		
Acqua distillata		16 ml			

Il metodo di preparazione di questo nitrone segue quello già descritto per la sintesi del *N*-metil-*C*-idrossifenil nitrone.

I dati spettroscopici sono compatibili con quelli riportati in letteratura.

## 9.22 Sintesi del cicloaddotto 4'-aza-4'-(*N*-benzil)-3'-*p*-nitrofenil-2',3'-dideossitimidina

Reazione:

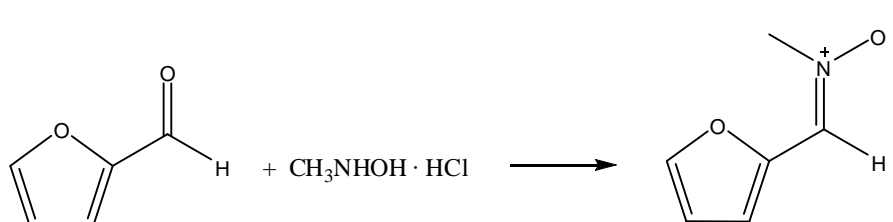


Reattivi	P.M.	Quantità	Moli (mmol)	Rap. Molare
<i>C</i> - <i>p</i> -nitrofenil- <i>N</i> -benzil nitrone	169.6	0.334 g	1.969	2
Viniltimina	152.13	0.150 g	0.987	1

La reazione al microonde è durata 30 minuti e il prodotto (solido giallo, 90%) è stato caratterizzato mediante  $^1\text{H-NMR}$ .

## 9.23 Sintesi del *C*-furiil-*N*-metil nitrone

Reazione:

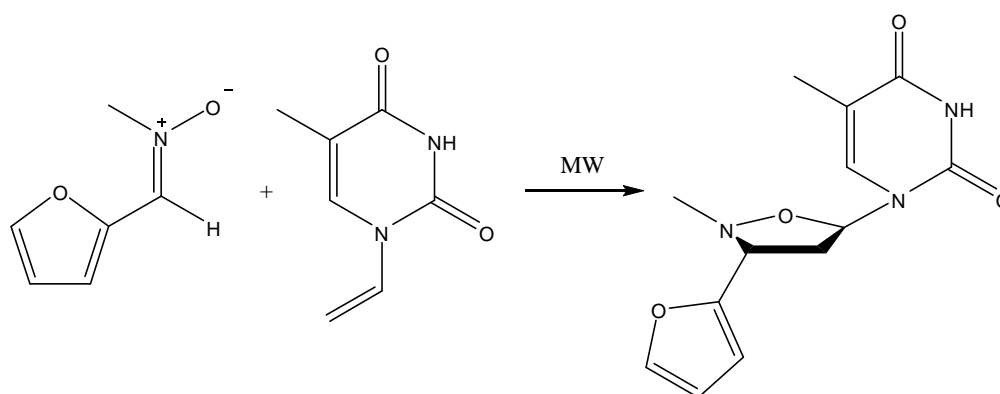


Reattivi	P.M.	Quantità	Moli (mmol)	Densità	Rap. Molare
2-Furaldeide	96.09	2.06 ml	24.86	1.159 g/ml	1.1
<i>N</i> -metilidrossilammina idroclorata	83.52	1.9 g	22.75		1
Soluzione NaOH 2N	40	1.04 g in 13 ml di acqua	26		
Acqua distillata		16 ml			

La procedura di preparazione è descritta in precedenza. Si ottiene un solido bianco (80%).

#### 9.24 Sintesi del cicloaddotto 4'-aza-4'-(*N*-metil)-3'-fural-2',3'-dideossitimidina

Reazione:

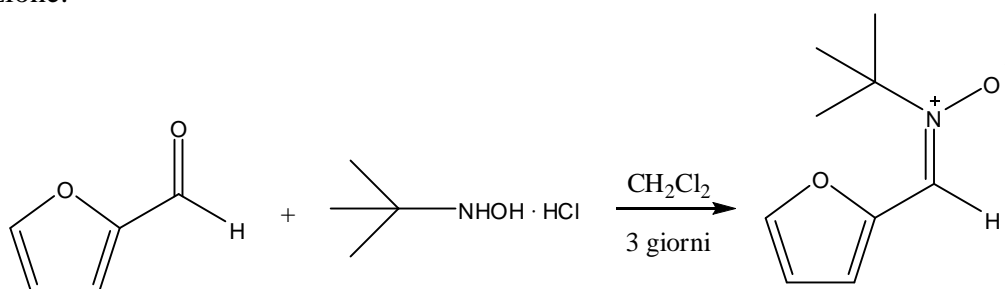


Reattivi	P.M.	Quantità	Moli (mmol)	Rap. Molare
C-furfuril-N-metil nitrone	125.1	0.246 g	1.969	2
Viniltimina	152.13	0.150 g	0.987	1

I tempi di reazione sono pari a 20 minuti. Si osserva la formazione di un solido bianco (76%) e il prodotto è stato caratterizzato mediante  $^1\text{H-NMR}$ .

### 9.25 Sintesi del C-furil-N-t-butil nitrone

Reazione:



Reattivi	P.M.	Quantità	Moli (mmol)	Densità	Rap. Molare
2-Furaldeide	96.09	0.66 ml	7.95	1.159 g/ml	0.5
N-terbutilidrossilammina idroclorata	125.6	2.0 g	15.9		1
Trietilammina	101.19	2.43 ml	17.5	0.727 g/ml	1.1
Solfato di sodio	142	3.16 g	22.2		1.4
Diclorometano		60 ml			

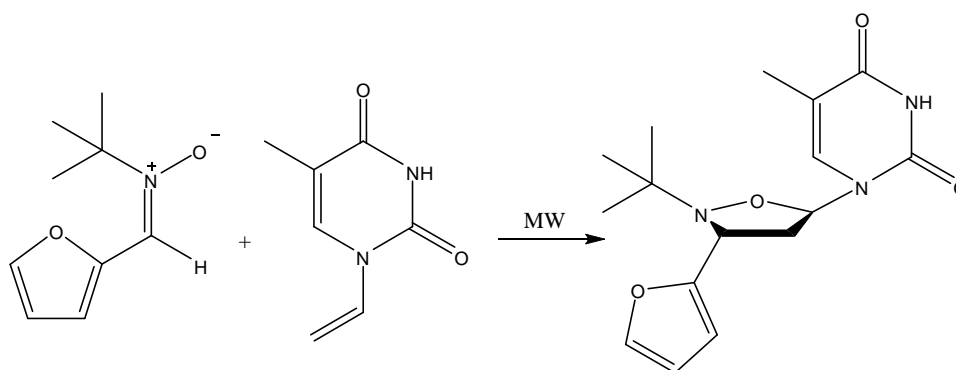


In un pallone da 250 ml vengono posti 60 ml di diclorometano e 2.0 g di N-t-butildrossilammina. La soluzione viene posta sotto agitazione e quando l'idrossilammina è completamente sciolta si aggiungono la trietilammina e la 2-furaldeide. Poiché dalla reazione si libera acqua è stato aggiunto un agente anidrificante come il solfato di sodio. La soluzione è lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per tre giorni. La reazione è controllata per TLC (9:1 v/v cloroformio/metanolo). Secondo l'articolo di riferimento, la reazione sarebbe dovuta durare 4 giorni; sicuramente l'utilizzo del solfato di sodio, introdotto da noi, ha permesso di ottenere il prodotto un giorno prima.

Il prodotto ottenuto viene filtrato e lavato con diclorometano freddo e successivamente tirato a secco mediante l'utilizzo del rotavapor e della pompa rotativa. Il prodotto finale si presenta sotto forma di un solido di colore giallo (80%). I dati spettroscopici sono compatibili con quelli riportati in letteratura.

### 9.26 Sintesi del cicloaddotto 4'-aza-4'-(N-t-butil)-3' furil-2',3'-dideossitimidina

Reazione:

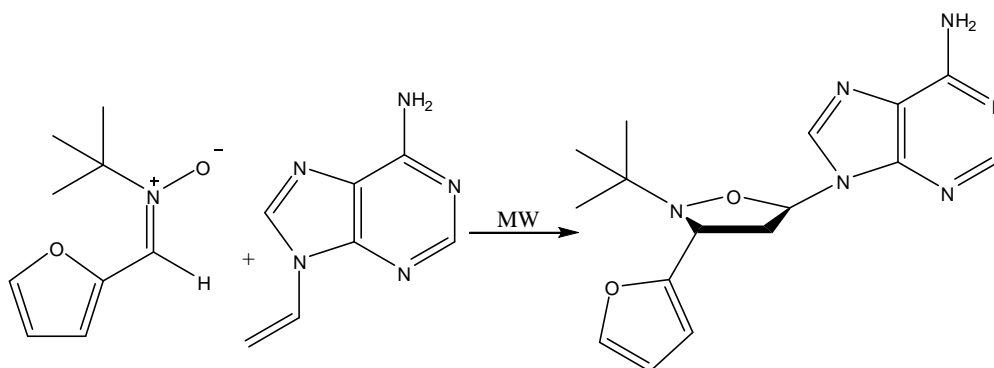


Reattivi	P.M.	Quantità	Moli (mmol)	Rap. Molare
C-furfuril- <i>N</i> - <i>t</i> -butil nitrone	167.2	0.329 g	1.969	2
Viniltimina	152.13	0.150 g	0.987	1

La reazione procede a completezza in 20 minuti e il prodotto (solido bianco, 91%) è stato caratterizzato mediante  $^1\text{H-NMR}$ .

### 9.27 Sintesi del cicloaddotto 4'-aza-4'-(*N*-*t*-butil)-3'-furil-2',3'-dideossiadenosina

Reazione:



Reattivi	P.M.	Quantità	Moli (mmol)	Rap. Molare
C-furfuril- <i>N</i> - <i>t</i> -butil nitrone	167.2	0.311 g	1.861	2
Viniladenina	161.2	0.150 g	0.931	1

La reazione procede a completezza in 20 minuti e il prodotto (solido bianco, 78%) è stato caratterizzato mediante  $^1\text{H-NMR}$ .

## Caratterizzazione dei prodotti di reazione

### *Premessa:*

Gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  sono stati registrati con uno spettrometro Bruker AC 300 a 300MHz, su soluzioni diluite in  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\text{CDCl}_3$ . I *chemical shifts* ( $\delta$ ) sono espressi in ppm rispetto allo standard interno tetrametilsilano. Tutte le costanti di accoppiamento  $J$  sono riportate in Hz.

Gli spettri di massa e i cromatogrammi sono stati ottenuti con un sistema Shimadzu GCMS-QP2010 costituito da un gascromatografo GC-2010, munito di autocampionatore AOC-20i, interfacciato con uno spettrometro di massa a quadrupolo.

Il gascromatografo è munito di una colonna Quadrex 007-5MS (95% polidimetilsilossano, 5% polidifenilsilossano) di lunghezza 30 m, diametro interno 0.25 mm e spessore del film 0.25  $\mu\text{m}$ . La ionizzazione del campione è ottenuta in “impatto elettronico”, (EI).

La analisi sono state effettuate con i seguenti parametri:

### **Iniettore**

Volume di iniezione = 1.5  $\mu\text{l}$

Modalità di iniezione: splitless

Flusso gas carrier = 1 ml/min

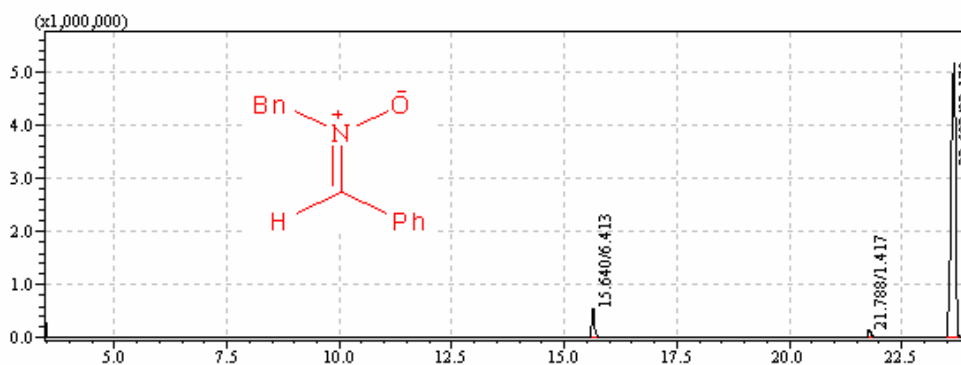
$T_{\text{iniettore}} = 250\text{ }^\circ\text{C}$

### **Preparazione dei campioni da iniettare nel GC-MS**

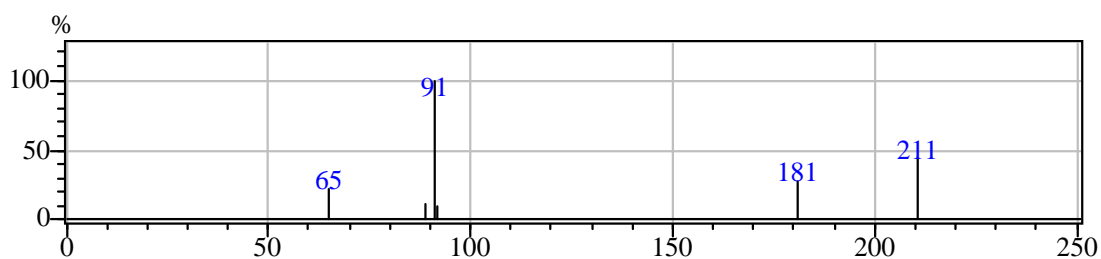
Si prelevano dapprima 2-3-gocce del grezzo di reazione e successivamente si effettua un'estrazione meccanica in etere etilico ed acqua; la fase eterea viene quindi posta su solfato di sodio anidro per 20 minuti, al fine di eliminare le eventuali tracce di acqua, ed infine introdotta in una “vial” da inserire nell'autocampionatore dello strumento.

Gli spettri ESI-MS dei cicloaddotti sintetizzati sono stati acquisiti mediante uno spettrometro LCQ Advantage munito di un analizzatore a trappola ionica (ThermoElectron Company, San Jose, CA).

### 9.3 C-fenil-N-benzil nitrone:

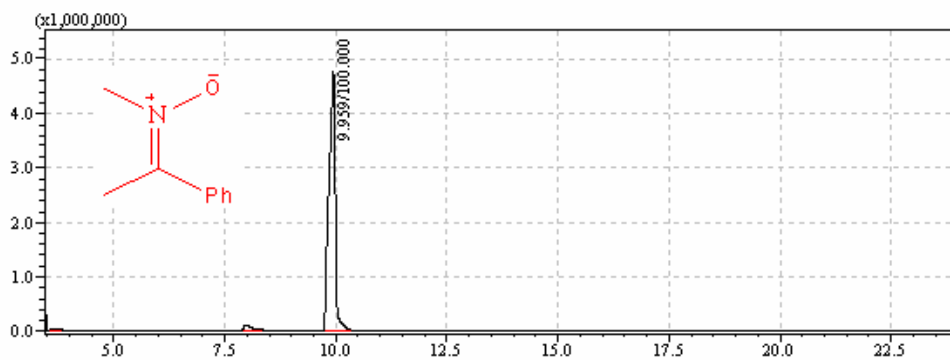


Analisi GC del *N*-benzil *C*-fenil nitrone, **9.3**

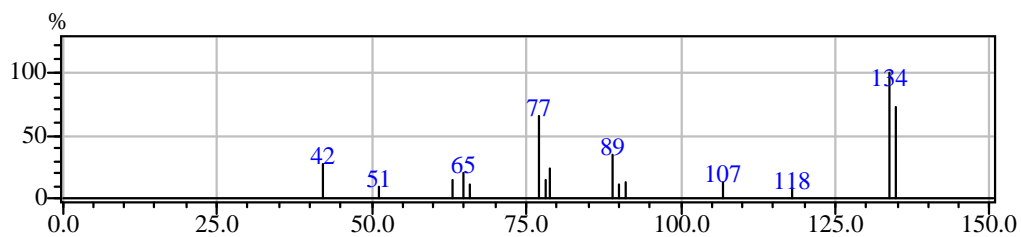


Spettro di massa dell' *N*-benzil-*C*-fenil nitrone, **9.3**

### 9.4 C-fenil-N-metil nitrone:

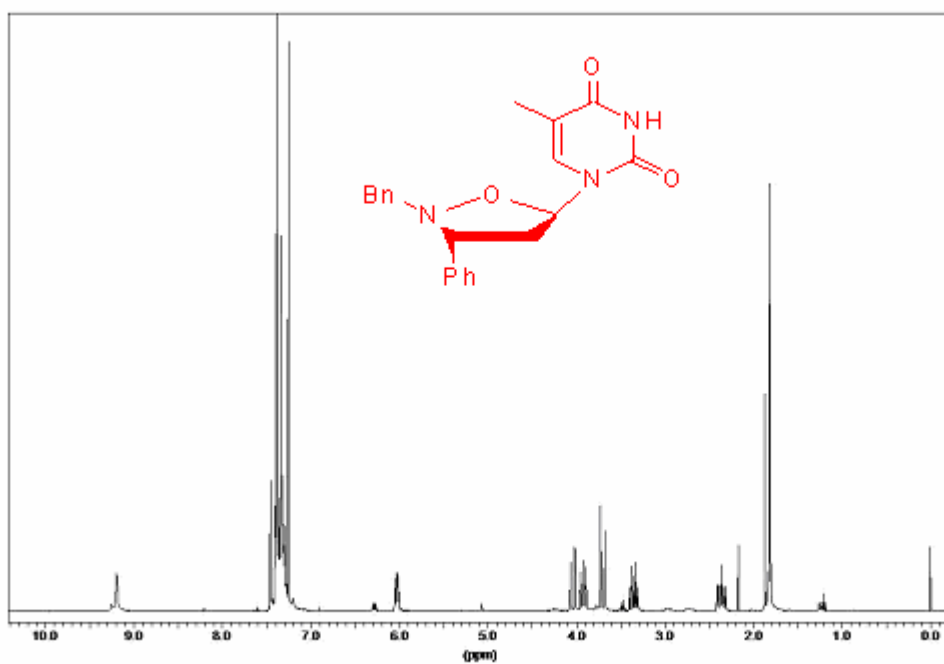


Analisi GC del *N*-metil-*C*-fenil nitrone, **9.4**

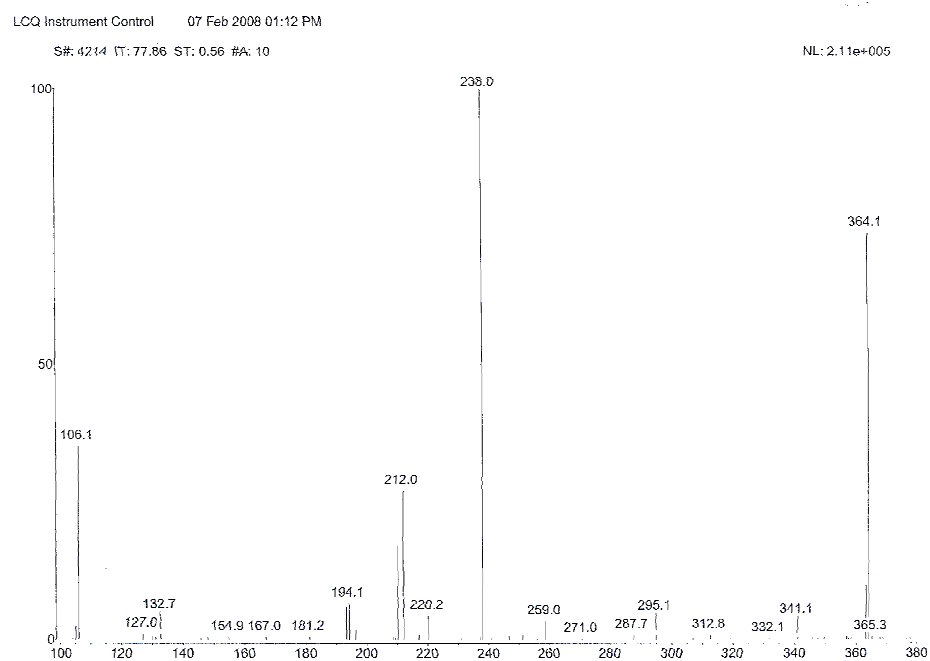


Spettro di massa del *N*-metil-*C*-fenil nitrone, **9.4**

**4'-Aza-4'-(*N*-benzil)-3'-fenil-2'-3' dideossitimidina:**

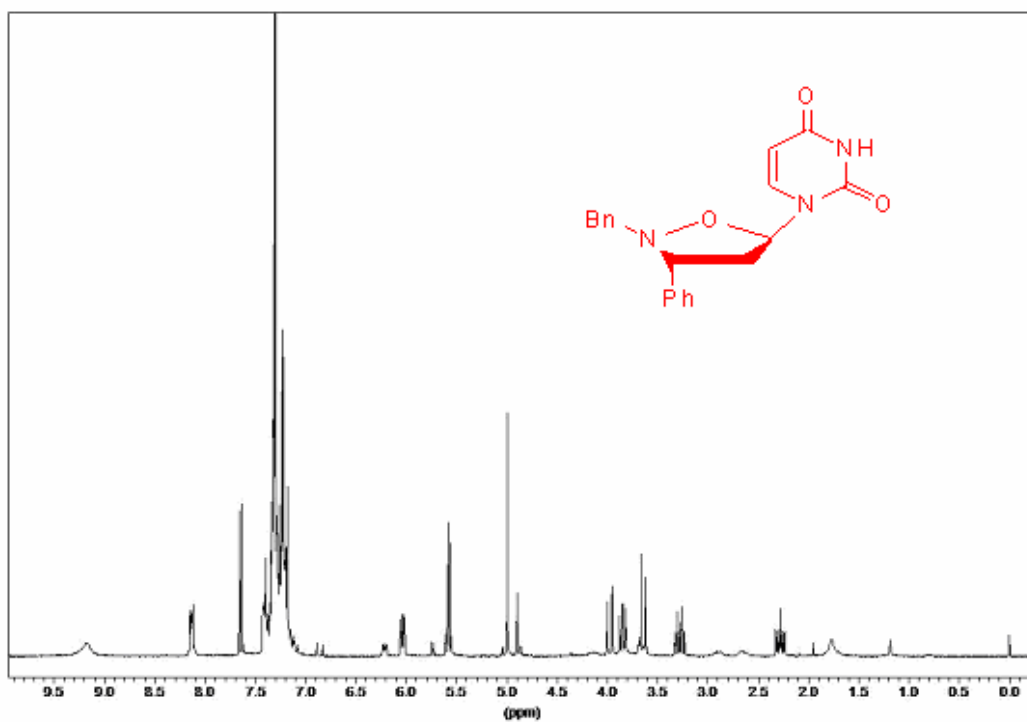


**Spettro <sup>1</sup>H-NMR del cicloaddotto 4'-Aza-4'-(*N*-benzil)-3'-fenil-2'-3' dideossitimidina, 9.5**

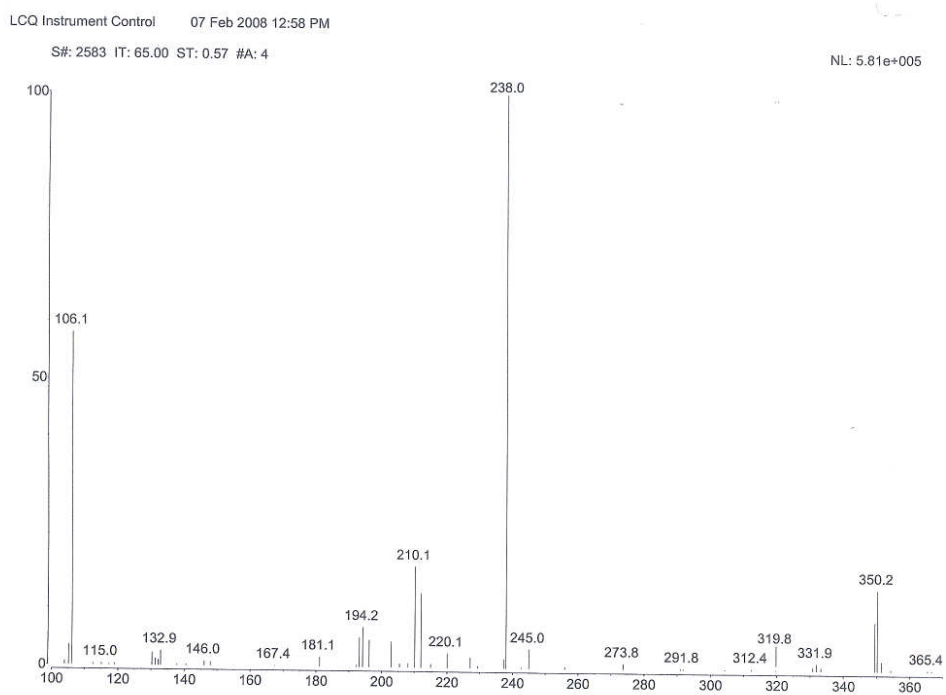


**Spettro ESI-MS del cicloaddotto 4'-Aza-4'-(*N*-benzil)-3'-fenil-2'-3' dideossitimidina, 9.5**

**9.5 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2'-3'dideoossiuracile:**

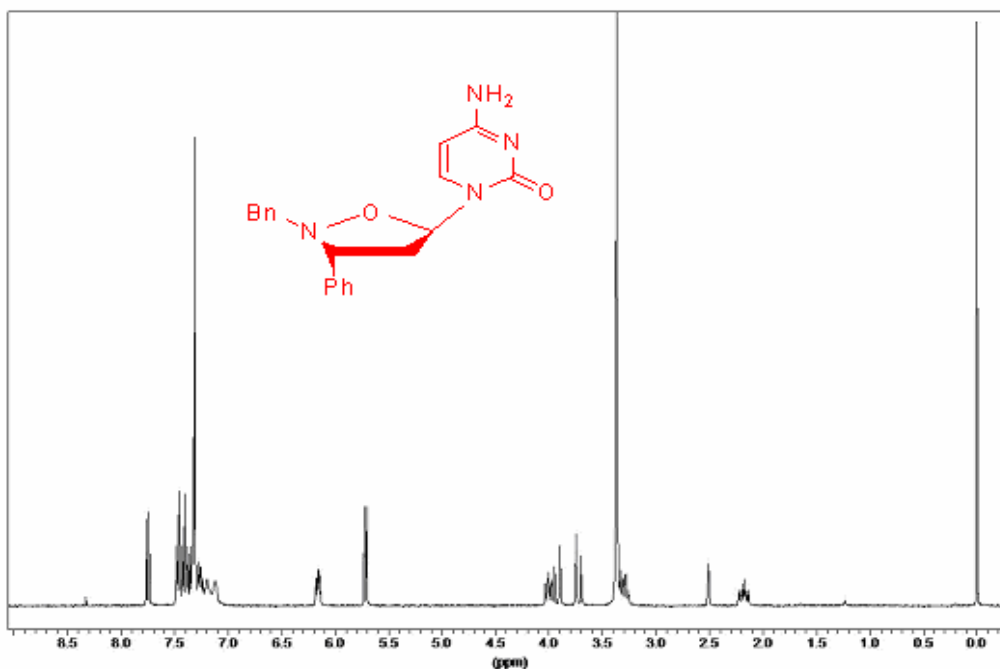


Spettro <sup>1</sup>H-NMR del cicloaddotto 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2'-3'dideoossiuracile, **9.6**

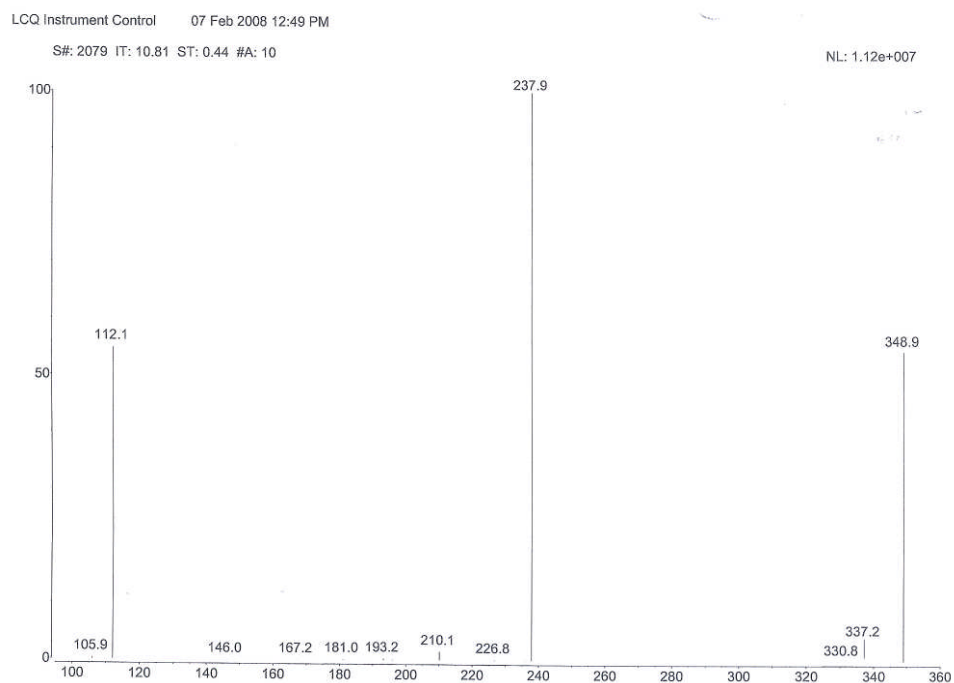


Spettro ESI-MS del cicloaddotto 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2'-3'dideoossiuracile, **9.6**

**9.6 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2'-3'dideossicitosina:**

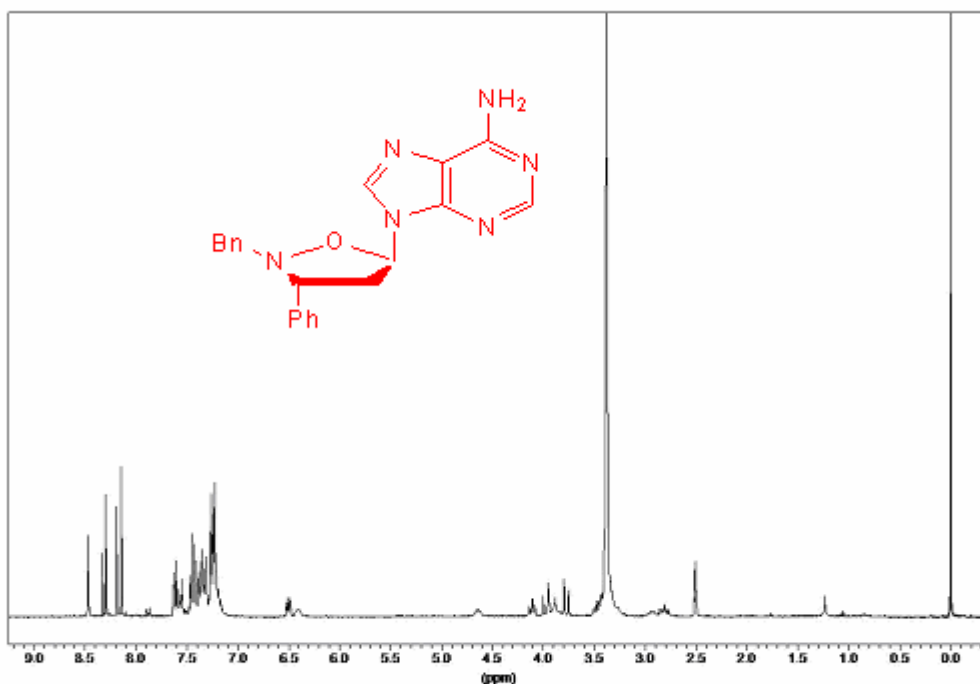


Spettro <sup>1</sup>H-NMR, in DMSO, del cicloaddotto 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2'-3'-dideoxycitosina, **9.7**

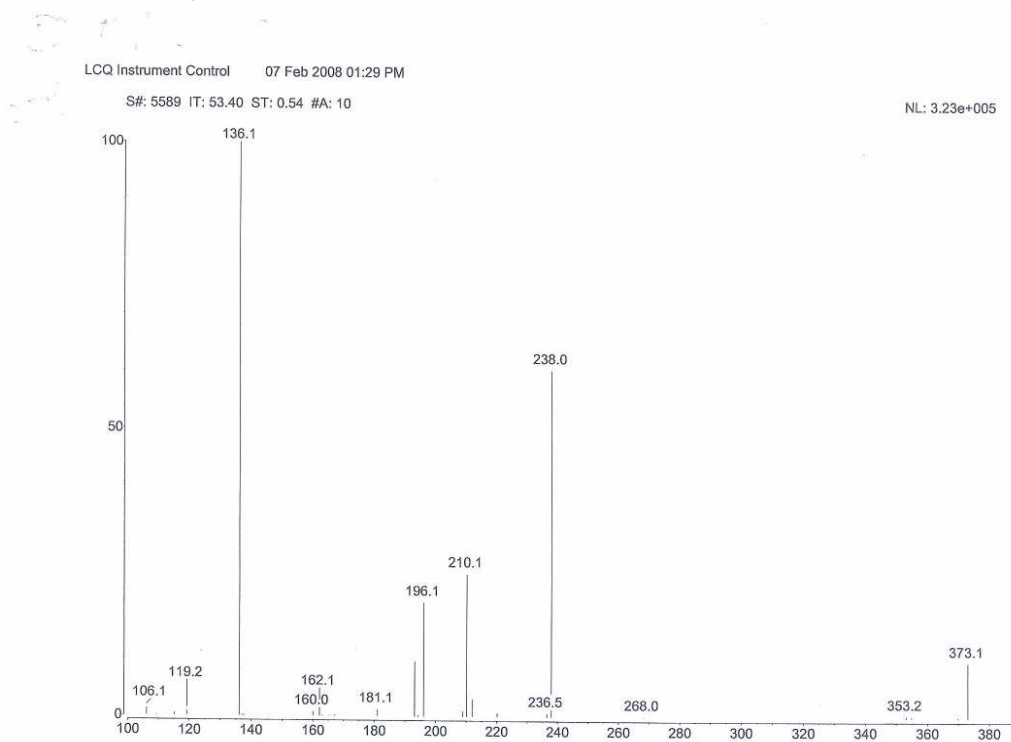


Spettro ESI-MS del cicloaddotto 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2'-3'-dideoxycitosina, **9.6**

**9.8 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2'-3' dideossiadenina:**



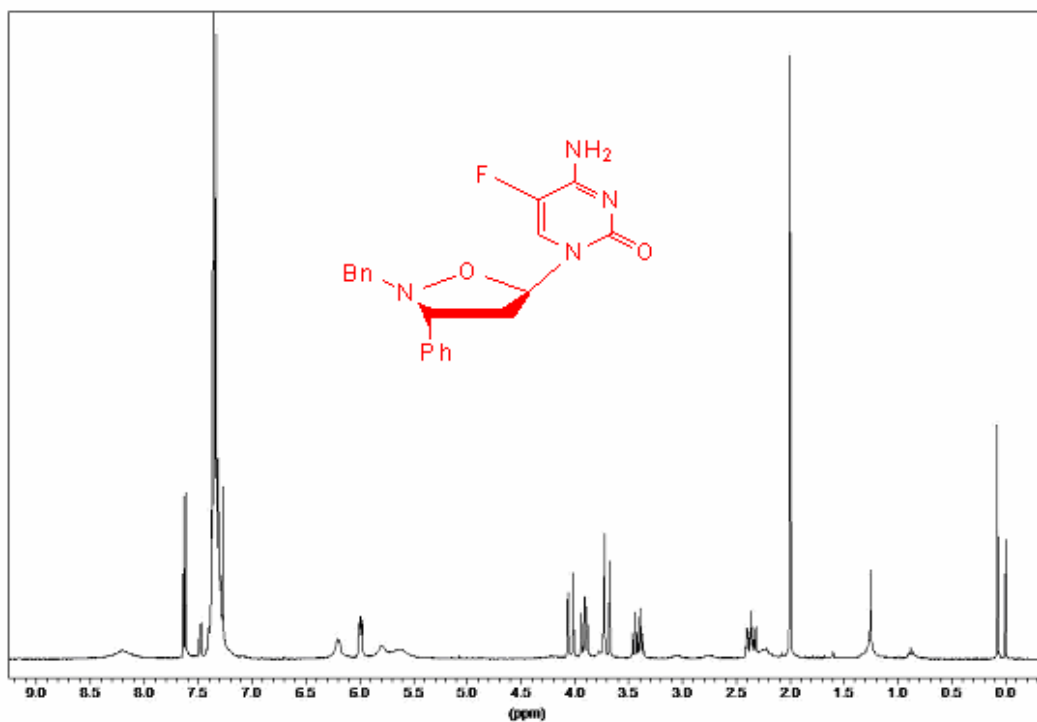
Spettro  $^1\text{H-NMR}$ , in DMSO, del cicloaddotto 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2'-3' dideossiadenina, **9.8**



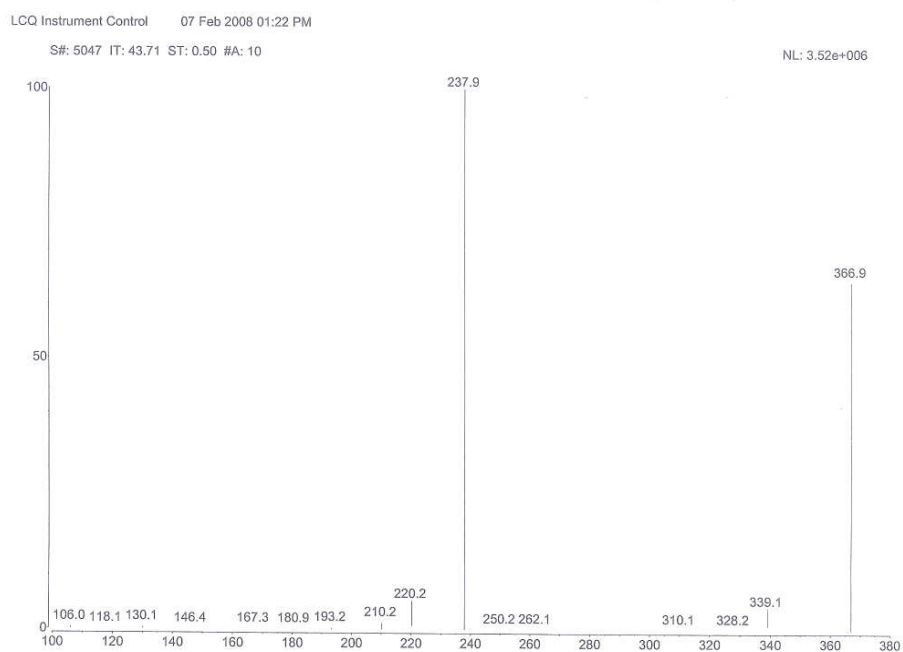
Spettro ESI-MS del cicloaddotto 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2'-3' dideossiadenina, **9.8**



**9.9 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2'-3'dideossi-5-fluorocitosina:**

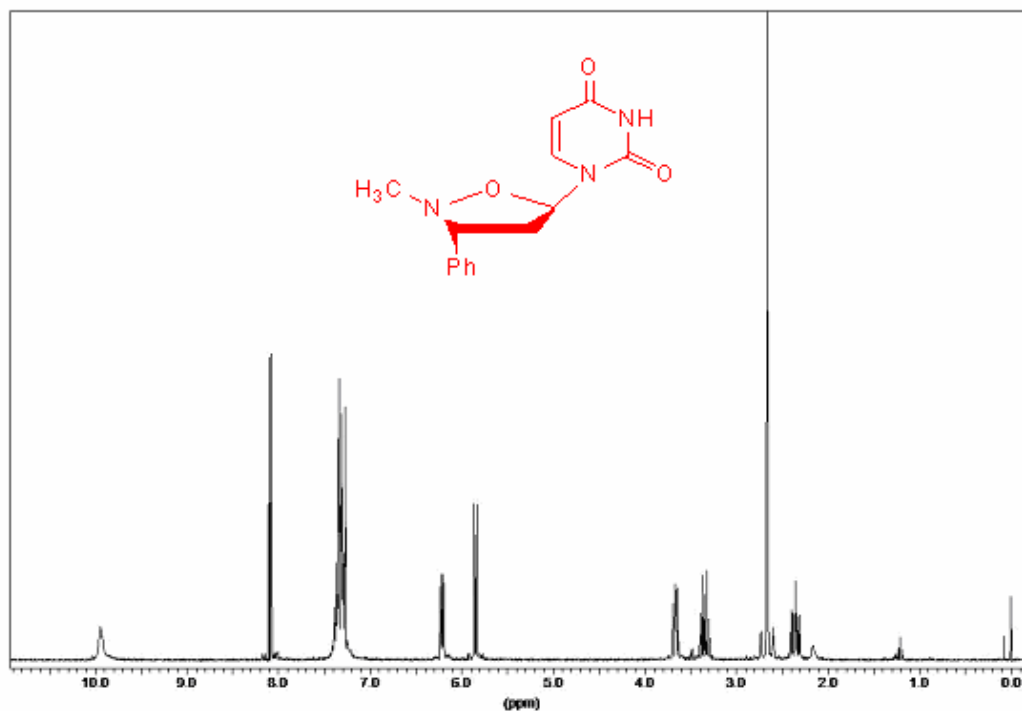


Spettro <sup>1</sup>H-NMR del cicloaddotto 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2'-3'dideossi-5-fluorocitosina, **9.9**



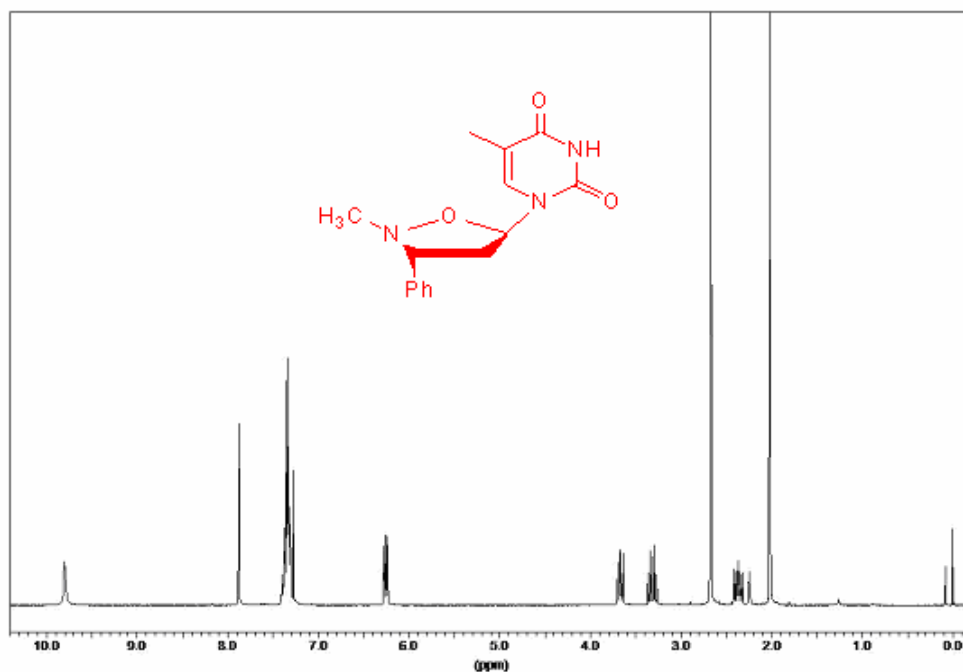
Spettro ESI-MS del cicloaddotto 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2'-3'dideossi-5-fluorocitosina, **9.9**

**9.10 4'-Aza-4'-(N-metil)-3'-fenil-2'-3' dideossiuracile:**



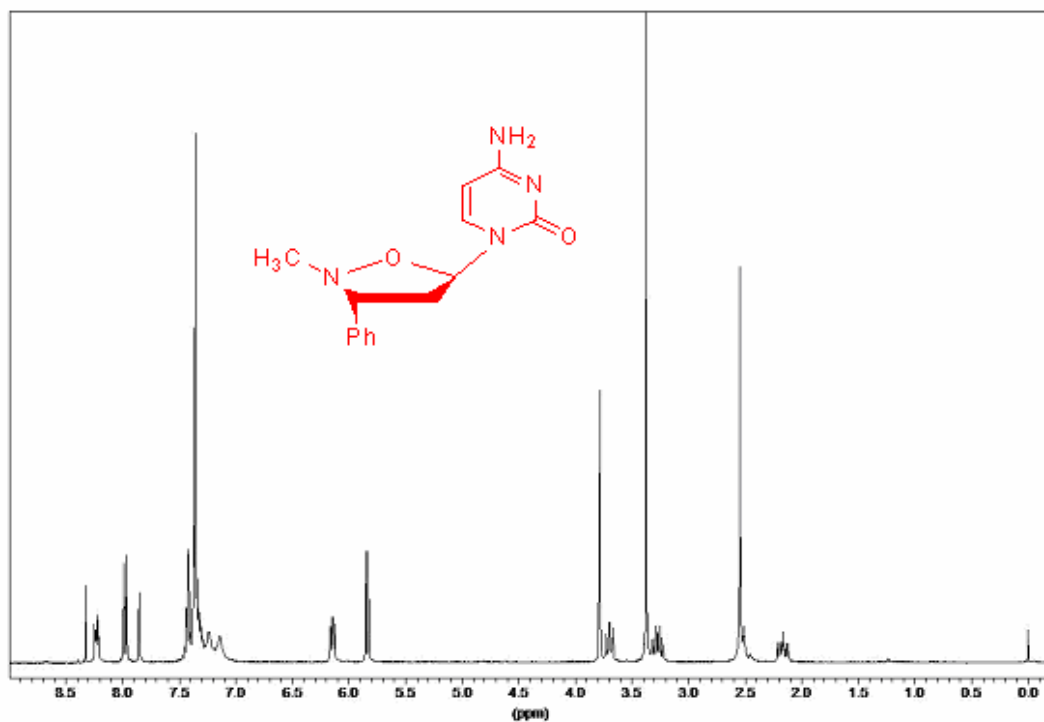
Spettro <sup>1</sup>H-NMR del cicloaddotto 4'-Aza-4'-(N-metil)-3'-fenil-2'-3' dideossiuracile, **9.10**

**9.11 4'-Aza-4'-(N-metil)-3'-fenil-2'-3' dideossitimidina:**



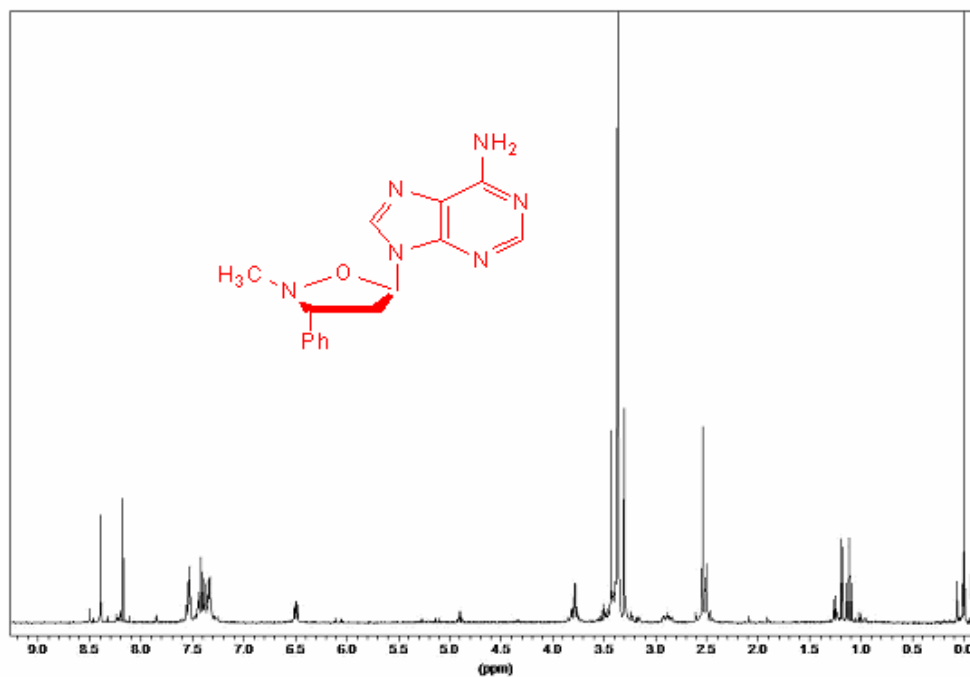
Spettro <sup>1</sup>H-NMR del cicloaddotto 4'-Aza-4'-(N-metil)-3'-fenil-2'-3' dideossitimidina, **9.11**

**9.12 4'-Aza-4'-(N-metil)-3'-fenil-2'-3' dideossicitosina:**



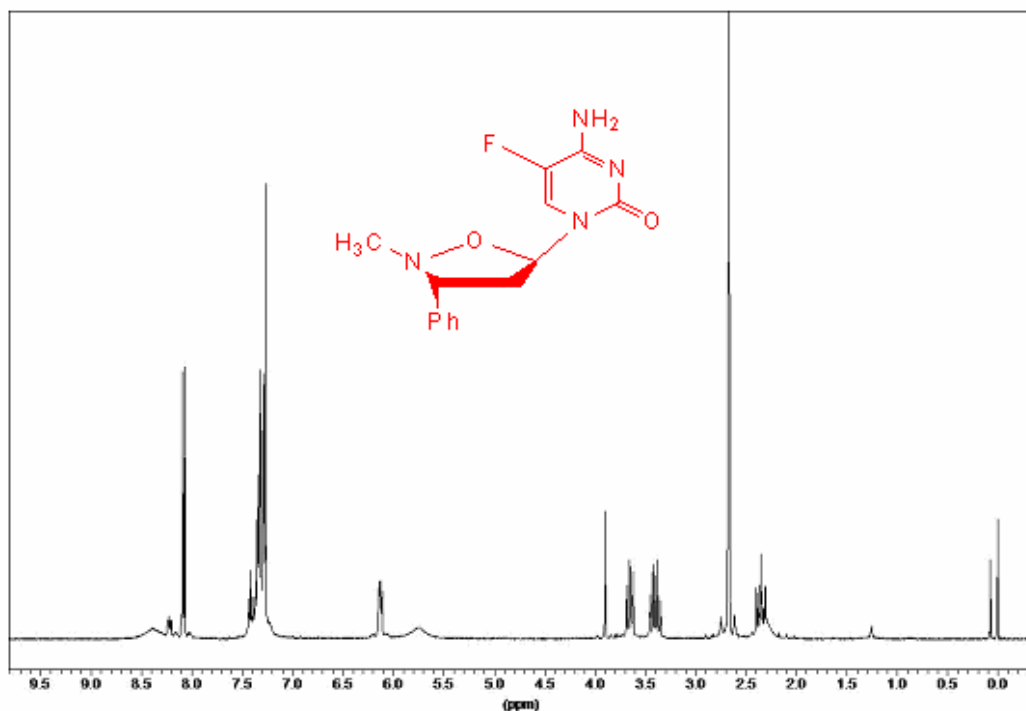
Spettro <sup>1</sup>H-NMR, in DMSO, del cicloaddotto 4'-Aza-4'-(N-metil)-3'-fenil-2'-3' dideossicitosina, **9.12**

**9.13 4'-Aza-4'-(N-metil)-3'-fenil-2'-3' dideossiadenina:**



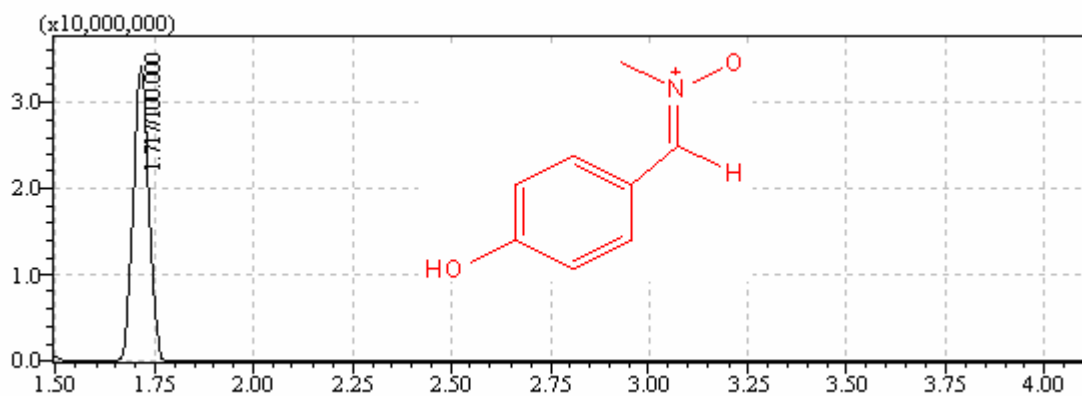
Spettro <sup>1</sup>H-NMR, in DMSO, del cicloaddotto 4'-Aza-4'-(N-metil)-3'-fenil-2'-3' dideossiadenina, **9.13**

**9.14 4'-Aza-4'-(N-metil)-3'-fenil-2'-3' dideoossi-5-fluorocitosina:**



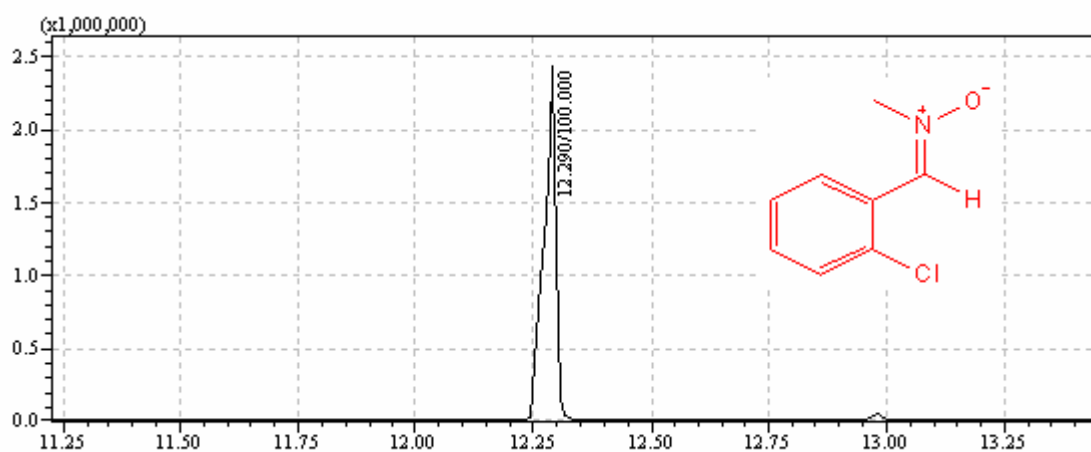
Spettro <sup>1</sup>H-NMR del cicloaddotto 4'-Aza-4'-(N-metil)-3'-fenil-2'-3' dideoossi-5-fluorocitosina, **9.14**

**9.17 C-p-idrossifenil-N-metil nitrone:**

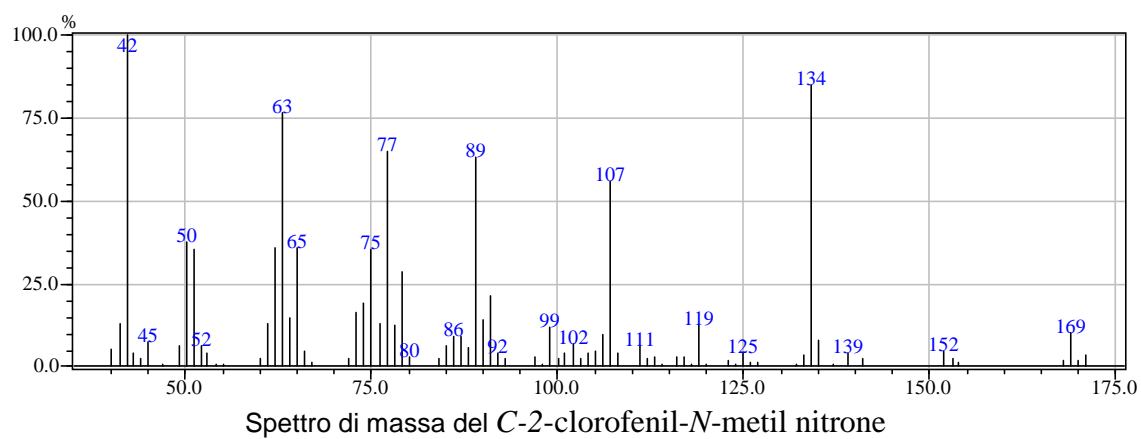


Analisi GC C-p-idrossifenil-N-metil nitrone

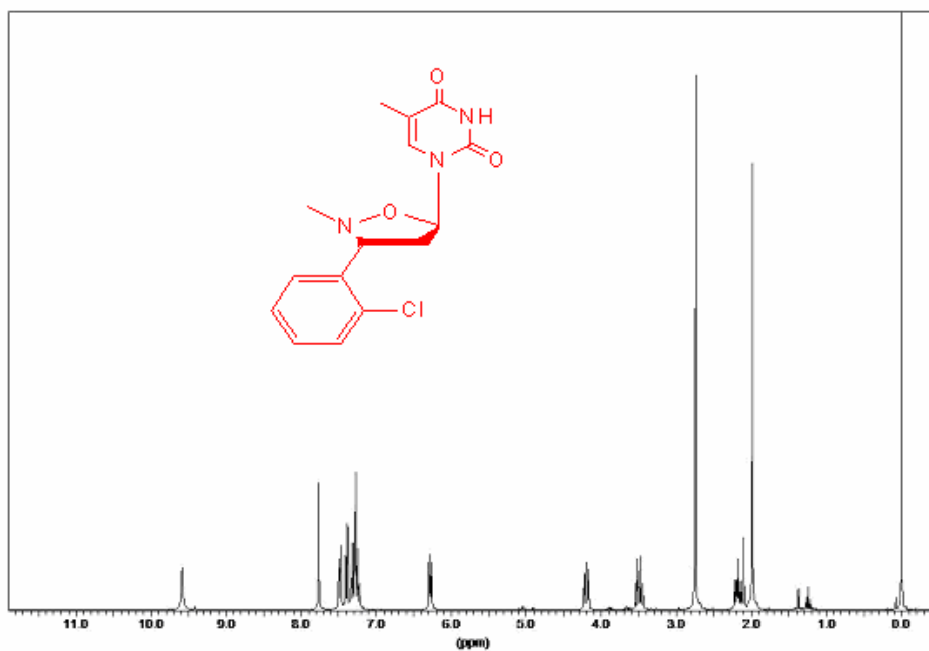
### 9.19 2-clorofenil-*N*-metil nitrone:



Analisi GC *C*-2-clorofenil-*N*-metil nitrone

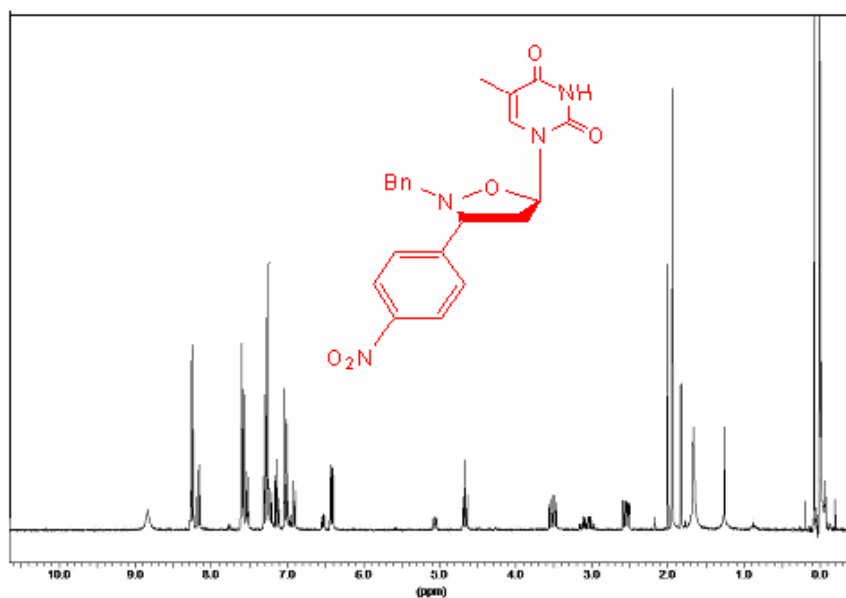


**9.20 4'-aza-4'-(N-metil)-3'-o-clorofenil-2',3'-dideoossitimidina:**



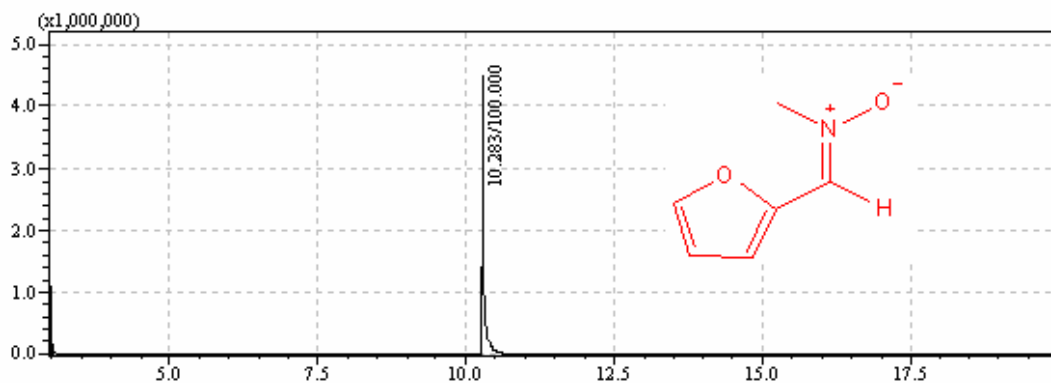
Spettro <sup>1</sup>H-NMR del cicloaddotto 4'-Aza-4'-(N-metil)-3'-o-clorofenil-2'-3' dideoossitimidina, **9.20**

**9.22 4'-aza-4'-(N-benzil)-3'-p-nitrofenil-2',3'-dideoossitimidina:**

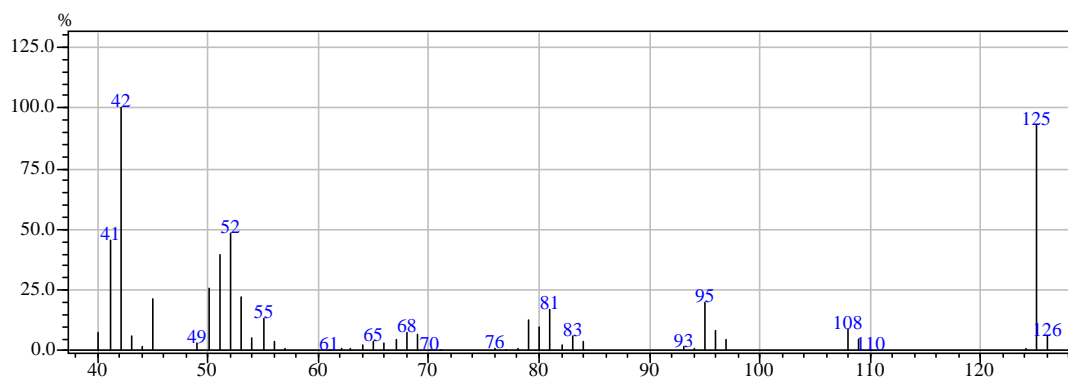


Spettro <sup>1</sup>H-NMR del cicloaddotto 4'-Aza-4'-(N-metil)-3'-p-nitrofenil-2'-3' dideoossitimidina

### 9.23 C-furil-*N*-metil nitrone:

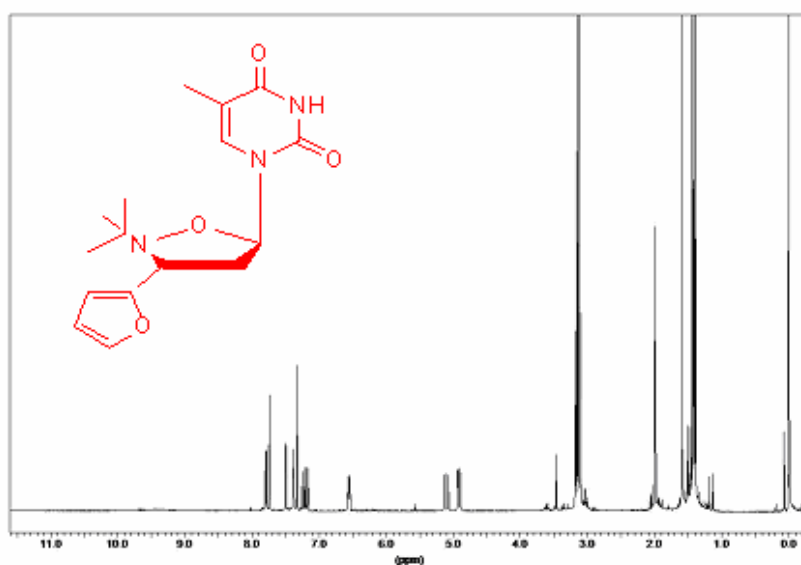


Analisi GC del C-furfuril-*N*-metil nitrone, 9.23



Spettro di massa del C-furfuril-*N*-metil nitrone, 9.23

### 9.26 4'-aza-4'-(*N*-*t*-butil)-3'-furil-2',3'-dideossitimidina:



Spettro <sup>1</sup>H-NMR del cicloaddotto 4'-aza-4'-(*N*-*t*-butil)-3'-furil-2',3'-dideossitimidina, 9.2

**Stato fisico, punto di fusione, analisi ESI-MS, dati spettrali <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub> o DMSO), dati IR e composizione elementare per alcuni dei prodotti di cicloadizione:**

**(endo) 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2',3'-dideossitimina (9.5).**

Solido bianco, m.p. 71-72 °C. ESI-MS [MH]<sup>+</sup> m/z 364; δ<sub>H</sub> (CDCl<sub>3</sub>) 1.81 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H, Thy CH<sub>3</sub>), 2.36 (ddd, *J* = 3.8 Hz, *J* = 9.8 Hz, *J* = 13.9 Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 3.35 (dt, *J* = 7.5 Hz, *J* = 7.6 Hz, *J* = 13.8 Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 3.70 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ph), 3.92 (dd, *J* = 7.5 Hz, *J* = 9.8 Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 4.40 (d, *J*=14.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ph), 6.03 (dd, *J* = 3.8 Hz, *J* = 7.6 Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 7.21-7.43 (m, 10H, Ph), 7.45 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, Thy H<sub>6</sub>), 9.19 (s<sub>b</sub>, 1H, NH); δ<sub>C</sub> (CDCl<sub>3</sub>) 12.5, 48.3, 59.5, 70.5, 83.3, 109.8, 127.6, 127.7, 128.4, 128.6, 128.8, 129.1, 135.8, 136.6, 136.9, 150.4, 164.1; ν<sub>max</sub> (KBr) 3167 (NH), 3031 (C-H<sub>Ar</sub>), 1686 (C=O), 1600-1200 (C=C), 963 (C-H); anal. calcd. (%) for C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> C 69.41, H 5.82, N 11.56, found (%) C 69.46, H 5.78, N 11.61.

**(endo) 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2',3'-dideossiuridina (9.6).**

Pale yellow solid, m.p. 172-173 °C. ESI-MS [MH]<sup>+</sup> m/z 350; δ<sub>H</sub> (CDCl<sub>3</sub>) 2.27 (ddd, *J* = 4.0 Hz, *J* = 10.0 Hz, *J* = 14.0 Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 3.27 (dt, *J* = 7.5 Hz, *J* = 7.6 Hz, *J* = 14.0 Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 3.64 (d, *J*=14.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ph), 3.90 (dd, *J*=7.6 Hz, *J*=10.0 Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 3.98 (d, *J*=14.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ph), 5.57 (d, *J*= 8.1 Hz, 1H, Ura H<sub>5</sub>), 6.03 (dd, *J*=4 Hz, *J*=7.5 Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 7.10-7.45 (m, 10H, Ph), 7.64 (d, *J*=8.1 Hz, 1H, Ura H<sub>6</sub>), 9.18 (s<sub>b</sub>, 1H, NH); δ<sub>C</sub> (CDCl<sub>3</sub>) 44.7, 52.8, 64.4, 77.3, 98.2, 120.6, 121.2, 121.9, 124.2, 124.8, 125.3, 128.1, 132.4, 133.8, 143.8, 156.5; ν<sub>max</sub> (KBr) 3166 (NH), 3031 (C-H<sub>Ar</sub>), 1685 (C=O), 1600-1200 (C=C), 963 (C-H); anal. calcd. (%) for C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> C 68.75, H 5.48, N 12.03, found (%) C 68.71, H 5.51, N 12.03.



**(endo) 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2',3'-dideossicitidina (9.7).**

Pale yellow solid, m.p. 234-235 °C. ESI-MS [MH]<sup>+</sup> m/z 349;  $\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 2.18 (ddd,  $J = 4.4$  Hz,  $J = 9.9$  Hz,  $J = 13.6$  Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 3.31 (dt,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 13.6$  Hz, 1H,

H<sub>b</sub>), 3.72 (d,  $J = 14.5$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ph), 3.92 (d,  $J = 14.5$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.10 (dd,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 9.9$  Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 5.72 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, Cyt H<sub>5</sub>), 6.16 (dd,  $J = 4.4$  Hz,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 7.07-7.52 (m, 12H, Ph + NH<sub>2</sub>), 7.75 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, Cyt H<sub>6</sub>);  $\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 46.5, 58.7, 69.5, 82.0, 93.3, 126.7, 127.1, 127.6, 127.7, 127.8, 128.3, 136.9, 137.1, 139.7, 154.6, 165.1;  $\nu_{\text{max}}$  (KBr) 3333, 3150 (NH<sub>2</sub>), 3066 (C-H<sub>Ar</sub>), 1657 (C=O), 1650-1300 (C=C, C=N); anal. calcd. (%) for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> C 68.95, H 5.79, N 16.08, found (%) C 68.89, H 5.83, N 16.13.

**(endo) 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2',3'-dideossiadenina (9.8).**

White solid, m.p. 244-245 °C. ESI-MS [MH]<sup>+</sup> m/z 373;  $\delta_{\text{H}}$  (DMSO-d<sub>6</sub>) 2.81 (ddd,  $J = 4.2$  Hz,  $J = 9.4$  Hz,  $J = 13.5$  Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 3.46 (dt,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 13.5$  Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 3.77 (d,  $J = 15.0$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ph), 3.98 (d,  $J = 15.0$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.11 (dd,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 9.4$  Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 6.50 (dd,  $J = 4.2$  Hz,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 7.13-7.52 (m, 12H, Ph + NH<sub>2</sub>), 8.14 (s, 1H, Ade H<sub>2</sub>), 8.29 (s, 1H, Ade H<sub>8</sub>);  $\delta_{\text{C}}$  (DMSO-d<sub>6</sub>) 44.5, 69.5, 79.7, 80.6, 118.0, 126.5, 127.3, 127.5, 127.9, 128.2, 128.4, 137.1, 138.1, 139.1, 148.7, 152.3, 155.6;  $\nu_{\text{max}}$  (KBr) 3309, 3144 (NH<sub>2</sub>), 3030 (C-H<sub>Ar</sub>), 1671 (C=N), 1600-1300 (C=C); anal. calcd. (%) for C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O C 67.73, H 5.41, N 22.57, found (%) C 67.80, H 5.44, N 22.52.

**(endo) 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2',3'-dideossi- 5-fluorocitidina (9.9).**

White solid, m.p. 213-214 °C. ESI-MS [MH]<sup>+</sup> m/z 367;  $\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 2.36 (ddd,  $J = 3.6$  Hz,  $J = 9.8$  Hz,  $J = 13.9$  Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 3.40 (dt,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 13.9$  Hz, 1H,

H<sub>b</sub>), 3.70 (d,  $J=14.0$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ph), 3.91 (dd,  $J=7.5$  Hz,  $J=9.8$  Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 4.04 (d,  $J=14.0$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ph), 5.73 (s<sub>b</sub>, 1H, NH<sub>2</sub>), 5.99 (dd,  $J=3.6$  Hz,  $J=7.4$  Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 7.14-7.39 (m, 10H, Ph) 7.62 (d,  $J=6.5$  Hz, 1H, FCyt H<sub>6</sub>), 8.21 (s<sub>b</sub>, 1H, NH<sub>2</sub>);  $\delta_C$  (CDCl<sub>3</sub>) 22.6, 29.7, 48.5, 59.8, 70.7, 84.3, 125.2, 125.7, 127.7, 128.4, 128.5, 128.8, 129.0, 136.8, 154.0, 157.9;  $\nu_{\max}$  (KBr) 3332, 3149 (NH<sub>2</sub>), 3066 (C-H<sub>Ar</sub>), 1657 (C=O), 1650-1300 (C=C, C=N); anal. calcd. (%) for C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> C 65.56, H 5.23, N 15.29, found (%) C 65.62, H 5.26, N 15.24.

**(endo) 4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-fenil-2',3'-dideossi-2-(N-tritil) guanina.**

Pale yellow solid, m.p. 217-218 °C.  $\delta_H$  (DMSO-d<sub>6</sub>) 2.08 (ddd,  $J = 3.1$  Hz,  $J = 9.2$  Hz,  $J = 12.9$  Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 2.77 (dt,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 13.0$  Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 3.63 (d,  $J=14.4$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ph), 3.76 (dd,  $J=7.8$  Hz,  $J=9.2$  Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 4.03 (d,  $J=14.4$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ph), 5.46-5.63 (dd,  $J=3.1$  Hz,  $J=8.0$  Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 6.91-7.39 (m, 26H, Ph + Gua H<sub>8</sub>), 7.49 (s<sub>b</sub>, 1H, NHTr), 10.82 (s<sub>b</sub>, 1H, NH);  $\delta_C$  (DMSO-d<sub>6</sub>) 45.8, 59.2, 69.3, 70.2, 78.9, 116.1, 126.4, 126.8, 127.2, 127.5, 127.9, 128.1, 128.4, 129.2, 129.5, 135.4, 139.2, 143.1, 143.6, 150.9, 155.1, 163.2;  $\nu_{\max}$  (KBr) 3160 (NH), 3060 (C-H<sub>Ar</sub>), 1680 (C=O), 1650-1300 (C=C, C=N); anal. calcd. (%) for C<sub>40</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> C 76.17, H 5.43, N 13.32, found (%) C 76.22, H 5.39, N 13.29.

**(endo) 4'-Aza-4'-(N-metil) -3'-fenil-2',3'-dideossi uridina (9.10).**

Pale yellow solid, m.p. 164-165 °C. ESI-MS [MH]<sup>+</sup> m/z 274;  $\delta_H$  (CDCl<sub>3</sub>) 2.35 (ddd,  $J = 4.2$  Hz,  $J = 10.2$  Hz,  $J = 14.1$  Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 2.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.34 (dt,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 14.1$  Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 3.65 (dd,  $J=7.5$  Hz,  $J=10.2$  Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 5.90 (d,  $J= 8.2$  Hz, 1H, Ura H<sub>5</sub>), 6.21 (dd,  $J=4.2$  Hz,  $J=7.6$  Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 7.21-7.44 (m, 5H, Ph), 8.18 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H, Ura H<sub>6</sub>), 9.94 (s<sub>b</sub>, 1H, NH);  $\delta_C$  (CDCl<sub>3</sub>) 35.6, 41.2, 65.9, 76.0, 95.1, 120.3, 121.4, 121.8, 129.2, 133.1, 143.5, 156.7;  $\nu_{\max}$  (KBr) 3165 (NH), 3034 (C-H<sub>Ar</sub>), 1689 (C=O), 1600-1200 (C=C), 965 (C-H); anal. calcd. (%) for C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> C 61.53, H 5.53, N 15.38, found (%) C 61.58, H 5.58, N 15.34.

**(endo) 4'-Aza-4'-(N-metil) -3'-fenil-2',3'-dideossi timidina (9.11).**

White solid, m.p. 74-75 °C. ESI-MS [MH]<sup>+</sup> m/z 288;  $\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 2.02 (d,  $J=1.2$  Hz, 3H, Thy CH<sub>3</sub>), 2.36 (ddd,  $J = 4.3$  Hz,  $J = 10.2$  Hz,  $J = 13.9$  Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 2.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.31 (dt,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 13.9$  Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 3.67 (dd,  $J=7.4$  Hz,  $J=10.2$  Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 6.25 (dd,  $J=4.3$  Hz,  $J=7.5$  Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 7.19-7.42 (m, 10H, Ph), 7.87 (d,  $J=1.2$  Hz, 1H, Thy H<sub>6</sub>), 9.79 (s<sub>b</sub>, 1H, NH);  $\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 12.8, 42.9, 47.9, 73.1, 82.9, 110.7, 127.4, 128.5, 128.9,

135.8, 136.4, 150.6, 164.3;  $\nu_{\text{max}}$  (KBr) 3167 (NH), 3031 (C-H<sub>Ar</sub>), 1686 (C=O), 1600-1200 (C=C), 963 (C-H); anal. calcd. (%) for C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> C 62.71, H 5.96, N 14.62, found (%) C 62.80, H 5.92, N 14.59.

**(endo) 4'-Aza-4'-(N-metil) -3'-fenil-2',3'-dideossicitidina (9.12).**

Pale yellow solid, m.p. 252-253 °C. ESI-MS [MH]<sup>+</sup> m/z 273;  $\delta_{\text{H}}$  (DMSO-d<sub>6</sub>) 2.17 (ddd,  $J = 4.3$  Hz,  $J = 9.9$  Hz,  $J = 13.6$  Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 2.56 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.27 (dt,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 7.7$  Hz,  $J = 13.6$  Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 3.71 (dd,  $J=7.7$  Hz,  $J=9.9$  Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 5.83 (d,  $J= 7.5$  Hz, 1H, Cyt H<sub>5</sub>), 6.14 (dd,  $J=4.3$  Hz,  $J=7.6$  Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 7.19 (s<sub>b</sub>, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.26-7.45 (m, 5H, Ph), 7.97 (d,  $J=7.5$  Hz, 1H, Cyt H<sub>6</sub>);  $\delta_{\text{C}}$  (DMSO-d<sub>6</sub>) 43.9, 54.7, 68.2, 82.5, 93.8, 127.6, 127.9, 128.5, 137.3, 139.5, 153.9, 165.4;  $\nu_{\text{max}}$  (KBr) 3332, 3150 (NH<sub>2</sub>), 3066 (C-H<sub>Ar</sub>), 1657 (C=O), 1650-1300 (C=C, C=N); anal. calcd. (%) for C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> C 61.75, H 5.92, N 20.57, found (%) C 61.81, H 5.89, N 20.53.

**(endo) 4'-Aza-4'-(N-metil) -3'fenil-2',3'-dideossiadenina (9.13).**

White solid, m.p. 213-214 °C. ESI-MS [MH]<sup>+</sup> m/z 297;  $\delta_{\text{H}}$  (DMSO-d<sub>6</sub>) 2.53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.88 (ddd,  $J = 4.3$  Hz,  $J = 9.8$  Hz,  $J = 13.9$  Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 3.41 (dt,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 13.9$  Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 3.79 (dd,  $J=7.6$  Hz,  $J=9.8$  Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 6.49 (dd,  $J=4.2$  Hz,  $J=7.4$  Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 7.22-7.61 (m, 7H, Ph + NH<sub>2</sub>), 8.17 (s, 1H, Ade H<sub>2</sub>), 8.39 (s, 1H, Ade H<sub>8</sub>);  $\delta_{\text{C}}$  (DMSO-d<sub>6</sub>) 43.4, 45.6, 78.6, 81.7, 119.8, 126.7, 128.4, 128.8, 137.2, 140.5,

149.2, 152.1, 156.6;  $\nu_{\max}$  (KBr) 3309, 3144 (NH<sub>2</sub>), 3030 (C-H<sub>Ar</sub>), 1671 (C=N), 1600-1300 (C=C); anal. calcd. (%) for C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O C 60.80, H 5.44, N 28.36, found (%) C 60.74, H 5.41, N 28.41.

**(endo) 4'-Aza-4'-(N-metil) -3'-fenil-2',3'-dideoossy-5-fluorocitidina (9.14).**

White solid, m.p. 234-235 °C. ESI-MS [MH]<sup>+</sup> m/z 291;  $\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 2.36 (ddd,  $J = 3.9$  Hz,  $J = 9.9$  Hz,  $J = 13.9$  Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 2.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.41 (dt,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 7.7$  Hz,  $J = 13.9$  Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 3.65 (dd,  $J = 7.7$  Hz,  $J = 9.9$  Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 5.78 (s<sub>b</sub>, 1H, NH<sub>2</sub>), 6.13 (ddd,  $J = 1.2$  Hz,  $J = 3.9$  Hz,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 7.24-7.38 (m, 5H, Ph), 8.07 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H, FCyt H<sub>6</sub>), 8.40 (s<sub>b</sub>, 1H, NH<sub>2</sub>);  $\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 21.5, 28.8, 47.2, 57.3, 68.9, 82.5, 125.3, 127.8, 128.8, 136.1, 153.2, 157.8;  $\nu_{\max}$  (KBr) 3331, 3148 (NH<sub>2</sub>), 3068 (C-H<sub>Ar</sub>), 1658 (C=O), 1650-1300 (C=C, C=N); anal. calcd. (%) for C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> C 57.92, H 5.21, N 19.30, found (%) C 57.87, H 5.18, N 19.34.

**4'-Aza-4'-(N-metil)-3'-o-cloro-fenil-2',3'-dideoossitimina (9.20).**

Yellow solid;  $\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 1.99 (d,  $J = 1.18$  Hz, 3H, Thy CH<sub>3</sub>), 2.18 (ddd,  $J = 4.25$  Hz,  $J = 9.83$  Hz,  $J = 13.94$  Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 2.74 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.48 (ddd,  $J = 7.77$  Hz,  $J = 7.78$  Hz,  $J = 13.94$  Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 4.21 (dd,  $J = 7.77$  Hz,  $J = 9.83$  Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 6.28 (dd,  $J = 4.25$  Hz,  $J = 7.78$  Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 7.18-7.55 (m, 4H, Ar), 7.76 (d,  $J = 1.18$  Hz, 1H, Thy H<sub>6</sub>), 9.58 (s<sub>b</sub>, 1H, NH);

**4'-Aza-4'-(N-benzil)-3'-p-NO<sub>2</sub>-fenil-2',3'-dideoossitimina (9.21).**

Yellow solid;  $\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 1.94 (d,  $J = 1.18$  Hz, 3H, Thy CH<sub>3</sub>), 2.01 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 2.48-2.61 (m, 1H, 1H<sub>c</sub>), 3.45-3.57 (m, 1H, H<sub>b</sub>), 4.66 (t,  $J = 8.07$  Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 6.42 (dd,  $J = 4.10$  Hz,  $J = 7.48$  Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 6.90-7.70 (m, 9H, Ar), 8.25 (d,  $J = 1.18$  Hz, 1H, Thy H<sub>6</sub>), 8.83 (s<sub>b</sub>, 1H, NH);

**4'-Aza-4'-(*N*-*t*-butyl)-3'-furyl-2',3'-dideoximitina (9.26).**

White solid;  $\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 1.98 (d,  $J=1.32$  Hz, 3H, Thy CH<sub>3</sub>), 2.10 (s, 9H, *t*-butyl), 2.24-2.37 (m, 1H, 1H<sub>c</sub>), 2.74-2.95 (m, 1H, H<sub>b</sub>), 3.13 (t,  $J=7.47$  Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 6.07 (dd,  $J=3.66$  Hz,  $J=7.17$  Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 7.10-7.32 (m, 3H, Ar), 7.73 (d,  $J=1.32$  Hz, 1H, Thy H<sub>6</sub>), 9.32 (s<sub>b</sub>, 1H, NH);



## Bibliografia

<sup>1</sup> a) Richman, D. D. *Nature* **2001**, *410*, 995; b) De Clercq, E. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1587*, 258; c) De Clercq, E. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 531; d) Macchi, B.; Balestrieri, E.; Mastino A. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 1327; e) Chiacchio, U.; Balestrieri, E.; Macchi, B.; Iannazzo, D.; Piperno, A.; Rescifina, A.; Romeo, R.; Saglimbeni, M.; Sciortino, M. T.; Valveri, V.; Mastino A.; Romeo, G. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1389.

<sup>2</sup> a) Chiacchio, U.; Corsaro, A.; Iannazzo, D.; Piperno, A.; Pistara, V.; Rescifina, A.; Romeo, R.; Valveri, V.; Mastino, A.; Romeo, G. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3696; (b) Coutouli-Argropoulou, E.; Pilanidou, P. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3755; (c) Merino, P.; Tejero, T.; Laguna, M.; Cerrada, E.; Moreno, A.; Lopez, J. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2336; (d) Merino, P. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 539.

<sup>3</sup> Jones, R. C. F.; Martin, J. N. in *The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Volume 59: Synthetic and Applications of 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry Toward Heterocycles and Natural Products*. Edited by A. Padwa and W. H. Pearson. J. Wiley & Sons **2002**, Ch. 1, p.1

<sup>4</sup> a) Colacino, E.; Converso, A.; De Nino, A.; Leggio, A.; Liguori, A.; Maiuolo, L.; Napoli, A.; Procopio, A.; Siciliano, C.; Sindona, G. *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 581; (b) Leggio, A.; Liguori, A.; Maiuolo, L.; Napoli, A.; Procopio, A.; Siciliano, C.; Sindona, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 3097; (c) Leggio, A.; Liguori, A.; Procopio, A.; Siciliano, C.; Sindona, G. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1277; (d) Dalpozzo, R.; De Nino, A.; Maiuolo, L.; Procopio, A.; De Munno, G.; Sindona G. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4035; (e) Procopio, A.; Alcaro, S.; De Nino, A.; Maiuolo, L.; Ortuso, F.; Sindona, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 545.

- <sup>5</sup> Dalpozzo, R.; De Nino, A.; Maiuolo, L.; Procopio, A.; Romeo, R.; Sindona, G. *Synthesis* . **2002**, 172
- <sup>6</sup> Bortolini, O.; De Nino, A.; Maiuolo, L.; Russo, B.; Sindona, G.; Tocci, A. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 7125.
- <sup>7</sup> Lidström, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J. *Tetrahedron* **2001**, 57, 9225.
- <sup>8</sup> Huisgen, R.; Seidl, H.; Bruning, I. *Chem. Ber.* **1969**, 102, 1102.
- <sup>9</sup> Black, D. C.; Crozier, R. F.; Rae, I. D. *Aust. J. Chem.* **1978**, 31, 2239.
- <sup>10</sup> a) Huisgen, R. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 403. b) Geittner, J.; Huisgen, R. *Tetrahedron Lett.* **1977**, 881. c) Geittner, J.; Huisgen, R. *Heterocycles* **1978**, 105. d) Benjamin, B. M.; Collins, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 6145.
- <sup>11</sup> Firestone, R. A. *Tetrahedron* **1977**, 33, 3009.
- <sup>12</sup> Salem, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 543.
- <sup>13</sup> Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 8953.
- <sup>14</sup> Houk, K. N.; Sims, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 5798.
- <sup>15</sup> Ess, D. H.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10646.
- <sup>16</sup> Ess, D. H.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 10187-10198.
- <sup>17</sup> Stutmann, R. *Pure Appl. Chem.* **1974**, 40, 569.
- <sup>18</sup> Houk, K. N.; Sims, J.; Watts, C. R.; Luskus, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 7301.
- <sup>19</sup> Bimanand, A. Z.; Houk, K. N. *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 435.
- <sup>20</sup> Sustmann, R. *Tetrahedron Lett.* **1974**, 963.
- <sup>21</sup> Houk, K. N.; Sims, J.; Duke, R. E.; Strozier, R. W.; George, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 7287
- <sup>22</sup> Ali, S. A.; Senaratner, P.; Illig, C.; Meckler, H.; Tufariello, J. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 4167.
- <sup>23</sup> Bianchi, G.; De Micheli, C.; Gandolfi, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1976**, 1518.
- <sup>24</sup> Jovela, M.; Jammolin, C. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1973**, 3116.
- <sup>25</sup> Huisgen, R.; Hauck, H.; Grashey, R.; Seidl, H. *Chem. Ber.* **1968**, 101, 2568.
- <sup>26</sup> Gree, R.; Tonnard, F.; Carriè, R. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1975**, 1325.
- <sup>27</sup> Tufariello, J. J.; Ali, S. A. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 4647.
- <sup>28</sup> Joucla, M.; Hamelin, J. *J. Chem. Res.(M)* **1978**, 352.
- <sup>29</sup> Cristina, D.; De Micheli, C.; Gandolfi, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1979**, 2891.
- <sup>30</sup> Cristina, D.; De Micheli, C.; De Amici, L. *Tetrahedron* **1981**, 37, 1349.



- <sup>31</sup> Gandolfi, R.; Ratti, M.; Toma, L.; De Micheli, C. *Heterocycles* **1979**, *12*, 897.
- <sup>32</sup> De Micleli, C.; Gandolfi, R.; Scevola, L. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1976**, 246.
- <sup>33</sup> David, D. M.; Bakavoli, M.; Pyne, S. G.; Skelton, B. W.; White, A. H. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12393.
- <sup>34</sup> Dong, Z.; Pyne, S. G.; Skelton, B. W.; White, A. H. *Aust. J. Chem.* **1993**, *46*, 143.
- <sup>35</sup> Welch, J. T.; Eswarakrishnan, K. *Fluorine in Bioorganic Chemistry*, Wiley, New York, **1991**.
- <sup>36</sup> Tanaka, K.; Sugimoto, Y.; Okafuji, K.; Tachikawa, M.; Mitsuhashi, K. *J. Heterocycl. Chem.* **1989**, *26*, 381.
- <sup>37</sup> Tanaka, K.; Suzuki, T.; Maeno, S.; Mitsuhashi, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 4484.
- <sup>38</sup> Tanaka, K.; Honda, O.; Minoguchi, K.; Mitsuhashi, K. *J. Heterocycl. Chem.* **1987**, *24*, 1391.
- <sup>39</sup> Tanaka, K.; Mori, T.; Mitsuhashi, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, *66*, 263.
- <sup>40</sup> Tsuge, H.; Okano, T.; Eguchi, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 2761.
- <sup>41</sup> Tufariello, J. J. *Acc. Chem. Res.* **1979**, 396.
- <sup>42</sup> Collins, I.; Nadin, A.; Holmes, A. B.; Long, M. E.; Man, J.; Baker, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 2205.
- <sup>43</sup> Chiacchio, U.; Rescifina, A.; Casuscelli, F.; Piperno, A.; Pisani, V.; Romeo, R. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 963.
- <sup>44</sup> Cordero, F. M.; Anichini, B.; Goti, A.; Brandi, A. *Tetrahedron* **1993**, *61*, 963.
- <sup>45</sup> Goti, A.; Anichini, B.; Brandi, A. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1665.
- <sup>46</sup> Gleiter, R.; Haider, R.; Conia, J.; Barnier, J.; Weberw, N. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 130.
- <sup>47</sup> Katagiri, N.; Sato, H.; Kurimoto, A.; Okada, M.; Yamada, A.; Kaneko, C. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 8101.
- <sup>48</sup> a) Vasella, A. *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 426. b) Vasella, A. *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 1273.
- <sup>49</sup> Belzecki, C.; Panfil, I. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1212.
- <sup>50</sup> Carruthers, W. *Cycloaddition Reactions in Organic Synthesis*, Pergamon Press, **1991**.
- <sup>51</sup> Aurich, H. G.; Biesemeier, F. *Synthesis* **1995**, 1171.
- <sup>52</sup> Jung, M. E.; Vu, B. T. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4427.

- <sup>53</sup> Katagiri, N.; Okada, M.; Kaneko, C. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 1801.
- <sup>54</sup> Lavanchy, R. Purcell, F. B. Hollinger, C. Howard, *Journal of Viral Hepatitis*, 6, 35, **1999**.
- <sup>55a,b</sup> a) J. Beneditt, *Scienze*, 260, 1253, **1992**; b) C. Chia, T. Bader, J.E. Baldwin, *AIDS Research and human Retrovirus*, 17, 1125, **2001**.
- <sup>56a,b</sup> a) K. Burgess, D. Cook, *Chem. Rev.*, 100, 2047, **2000**; b) M. Ferrero, V. Gotor, *Chem. Rev.*, 100, 4319, **2000**.
- <sup>57a,b</sup> a) J.M. Gallo, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 14, 199, **1994**; b) L. Fiume, C. Busi, G. Distefano, A. Mattioli, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 14, 51, **1994**.
- <sup>58a,b</sup> a) X. Tan, C. K. Chun, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 39, 117, **1999**; b) H.H. Dalziel, D. P. Westfall, *Pharmacol. Rev.*, 46, 449, **1994**.
- <sup>59</sup> P. Merino, *Curr. Med. Chem. Anti-Infective Agents*, 1, 4, **2002**.
- <sup>60a,b</sup> a) D. Bergatrom, X. Lin, G. Wang, D. Rotstein, P. Beal, K. Norrix, J. Ruth, *Synlett.*, 179, **1992**; b) D. S. Stein, K.H.P. Moore, *Pharmacotherapy*, 21, 11, **2001**.
- <sup>61a,b</sup> a) D. Zhang, M. J. Miller, *Curr. Pharm. Des.*, 5, 73, **1999**; b) S. Knapp, *Chem. Rev.* 95, 1859, **1995**.
- <sup>62a,b</sup> a) M.A.E. Shaban, A.Z. Nasr, *Adv. Heterocycl. Chem.*, 68, 223, **1997**; b) N.C. Chiadhuri, R.X.F. Ren, E.T. Kool, *Synlett.*, 341, **1997**.
- <sup>63a,b</sup> a) K.L. Duhelholm, E.B. Pedersen, *Synthesis*, 1, **1992**; b) P. Herdewijn, J. Balzarini, *Index, E.D.C. 2',3'-deosynucleoside analogues as antiviral agents in advances in antiviral drugs design* De Clercq, Ed. JAI Press, Greenwich, **1993**.
- <sup>64</sup> K.W. Pankiewicz, K.A. Watanabe, *J. Fluorite Chem.*, 64, 15, **1993**.
- <sup>65</sup> A. Eschenmsher, E. Lowenthal, *Chem. Soc. Rev.*, 21, 1, **1992**.
- <sup>66</sup> a) S. Nitsuma, Y. Ichikawa, T. Tacita, *Synthesis of oxetanocin, a novel nucleoside containing an oxetane ring and its carbocyclic analogues in studies in natural products chemistry*, vol. 10, Attaur-Rahman (Ed.), Elsevier, Amsterdam, 585, **1992**.
- <sup>67</sup> P. Merino, *Curr. Med. Chem. Anti-Infective Agents*, 1, 4, **2002**.
- <sup>68 a,b</sup> a) P.A. Bonnet, R.K. Robins, *J. Med. Chem.*, 36, 635, **1995**; b) V. Nair, T.S. Jahnke, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 1017, **1995**.
- <sup>69</sup> Y Xiang, Q. Teng, C. K. Chu, *Tetrahedron Lett.*, 36, 3781, **1995**.
- <sup>70</sup> U. Chiacchio, G. Gumina, A. Rescifina, R. Romeo, N. Uccella, F. Casascelli, A. Piperno, G. Romeo, *Tetrahedron*, 52, 8889, **1996**.

- <sup>71</sup> A. Leggio, A. Liguori, A. Procopio, C. Siciliano, G. Sindona, *Tetrahedron Lett.*, **37**, 1277, **1996**.
- <sup>72</sup> A. Leggio, A. Liguori, L. Mariuolo, A. Napoli, A. Procopio, C. Siciliano, G. Sindona, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 3097, **1997**.
- <sup>73</sup> Wasserscheid P., Welton T. *Ionic Liquids in Synthesis*, Wiley-VCH, **2003**.
- <sup>74</sup> a) Seddon, K. R. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1997**, *68*, 351–356. b) Seddon, K. R. *Kinet. Catal. Engl. Transl.* **1996**, *37*, 693–697.
- <sup>75</sup> Wasserscheid, P.; Keim, W. *Angew. Chem.* **2000**, *39*, 3772–3789.
- <sup>76</sup> Sheldon, R. *Chem. Commun.* **2001**, 2339–2407.
- <sup>77</sup> V. Santagada, E. Perissutti, F. Fiorino, B. Vivencio, G. Caliendo, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, (12), 2397-2400.
- <sup>78</sup> V. Santagada, F. Fiorino, E. Perissutti, B. Severino, V. De Filippis, B. Vivencio, G. Caliendo, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5171- 5173.
- <sup>79</sup> 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.
- <sup>80</sup> 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.
- <sup>81</sup> Frederickson, M. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 403-425.
- <sup>82</sup> a) Tufariello, J. J. *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*; Padwa, A., Ed. Wiley: New York, **1984**. b) Torssell, K. B. G. *Nitrile Oxides, Nitrones and Nitronates in Organic Synthesis*; VCH: New York, **1988**.
- <sup>83</sup> a) Seerden, J.-P. G.; Boeren, M. M. M.; Scheeren, H. W. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 11843-11852. b) Gothelf, K. V.; Jørgensen, K. A. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 863-910.
- <sup>84</sup> Leggio, A.; Liguori, A.; Procopio, A.; Siciliano, C.; Sindona, G. *Tetrahedron. Lett.* **1996**, *37*, 1277.

- <sup>85</sup> Dalpozzo, R.; De Nino, A.; Maiuolo, L.; Procopio, A.; De Munno, G.; Sindona G. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4035-4038.
- <sup>86</sup> Leggio, A.; Liguori, A.; Maiuolo, L.; Napoli, A.; Procopio, A.; Siciliano, C.; Sindona, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 3097-3099.
- <sup>87</sup> a) Dalpozzo, R.; De Nino, A.; Maiuolo, L.; Procopio, A.; Romeo, R.; Sindona G. *Synthesis* **2002**, *2*, 172-174. b) Procopio, A.; Alcaro, S.; De Nino, A.; Maiuolo, L.; Ortuso, F.; Sindona G. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 545-550.
- <sup>88</sup> Gothelf, K. V.; Jørgensen, K. A. *Chem. Commun.* **2000**, 1449-1458.
- <sup>89</sup> Silvero, G.; Arèvalo, M. J.; Bravo, J. L.; Ávalos, M.; Jimènez, J. L.; Lòpez, I. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7105-7111.
- <sup>90</sup> Bortolini O., De Nino A., Maiuolo L., Russo B., Sindona G., Tocci A. *Tetrahedron Letters*, **2007**, *48*, 7125-7128.
- <sup>91</sup> Dìaz-Ortiz A., Dìez-Barra E., de la Hoz A., Preto P., Moreno A. *J. Chem.Soc., Perkin Trans. I*, **1994**, *57*, 3595-3598.
- <sup>92</sup> Singh, R.; Singh Bhella, S.; Texana, A. K.; Shanmugavel, M.; Faruka, A.; Ishara, M.P.S. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2283.
- <sup>93</sup> Burkitt D.; A sarcoma involving the Jaws in African children. *Br. J. Surg.* **1958** ; *46* :218-223.
- <sup>94</sup> Burkitt D.; Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *Br. Med. J.* **1962**; *2*:1019-1023.
- <sup>95</sup> Epstein M.A.; Achong B.G.; Barr Y.M.; virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* **1964** ; *1*:702-703.
- <sup>96</sup> Epstein M.A.; Barr Y.M.; cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *Lancet* **1964**; *1*:252-253.
- <sup>97</sup> Henle G.; Henle W.; Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J. Bacteriol* **1966**; *91*:1248-1256.





*Sono passati tre anni, o forse qualcosa in più, ricordo ancora quel giorno in cui ho provato l'esame d'ammissione al corso di dottorato, come passa il tempo, forse non sarò molto originale, ma è la realtà!*

*Sì, Il tempo passa però permettetemi di ringraziare con affetto e stima tutte le persone che qui ho conosciuto. . . mi sono sentito a casa e questo il tempo che passa non può cancellarlo!*

*Un ringraziamento particolare va a Loredana per l'affetto e la stima che mi ha sempre dimostrato, grazie Lori! Un altrettanto gran ringraziamento alla prof. Bertolini per il grande aiuto che non mi ha mai negato e non posso certo dimenticare il prof. De Nino e Tagarelli che sono sempre stati così gentili con me.*

*Ovviamente un gran ringraziamento a tutti i miei amici, non colleghi, sia stranieri sia italiani che qui a Cosenza ho avuto la fortuna di conoscere.*

*Un grazie alla mia famiglia e ai miei amici di sempre, a quelli che ci sono ancora e su cui posso sempre contare, a quelli che magari non vedo più così spesso ma che porto sempre nel cuore e a chi non vedrò più ma che sarà sempre qui con me, per ultimo, ma certamente non ultimo al prof. Giovanni Sindona per avermi dato la possibilità di far parte del suo gruppo di ricerca.*