

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale "Toso Montanari"

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

SINTESI E STUDIO DELLA REATTIVITA' DI DERIVATI DEGLI ACIDI TIOIDROSSAMICI, POTENZIALI INIBITORI DELLA S- GLUCOSILTRANSFERASE (S-UGT)

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Lorenzo Cassani

RELATORE

Dott.ssa Mariafrancesca Fochi

Sessione II

Anno Accademico 2016-2017

La tesi di seguito riportata è relativa al lavoro svolto durante il periodo di tirocinio presso il laboratorio ICOA dell'università di Orléans.

Un ringraziamento particolare ai responsabili del laboratorio, il professore Arnaud Tatibouet e la professoressa Marie Schuler che mi hanno reso partecipe del loro lavoro e che mi hanno seguito meticolosamente passo dopo passo.

Ringrazio i miei colleghi di laboratorio Justyna, Maria, Laura, Guillerme e, in particolare, Giuliano per l'avermi aiutato e seguito in laboratorio.

ABSTRACT

Lo scopo di questo lavoro è stata la sintesi dei tioidrossimati, composti contenenti la funzione Z-tioidrossimata. Questi sono stati ottenuti partendo da cinque diverse aldeidi che, una volta trasformate in ossime, sono state fatte reagire ciascuna con il metil N-acetil cisteinato, estere della (L)-N-acetilcisteina, a dare la funzione Z-tioidrossimata. Durante la sintesi, sulla base di lavori svolti precedentemente dal gruppo di ricerca presso cui ho svolto il tirocinio, si sono seguite due procedure differenti: la prima che utilizza la N-clorosuccinimide, la seconda che utilizza, invece, una soluzione di ipoclorito. Entrambe hanno portato a delle buone rese anche se la seconda procedura è risultata essere la migliore, soprattutto per quanto riguarda il tempo di reazione. Successivamente i tioidrossimati sono stati sottoposti a processi di solfatazione-eliminazione, eliminazione-acidificazione al fine di ottenere i corrispondenti isotiocianati e acidi tioidrossamici. Poiché questi due processi si sono rivelati poco efficienti, si è cercato di migliorarli apportando diverse modifiche e ripetendoli di seguito più e più volte. Alcuni risultati incoraggianti sono stati ottenuti anche se la metodica messa a punto non è risultata essere applicabile a tutti i substrati impiegati.

The purpose of this work was the synthesis of thiohydroximates compounds containing the Z-thiohydroximate function. They were obtained from five different aldehydes that, once converted into the corresponding oximes, were reacted with the methyl N-acetyl cysteinate, the methyl ester of the (L)-N-acetylcysteine, to form the Z-thiohydroximate function. Throughout the synthesis, on the basis of the works developed previously by the research group in which I did my internship, two different procedures were followed: the first one involved the use of N-chlorosuccinimide, whereas a hypochlorite solution was used in the second one. Both the methodologies employed, allowed to achieve good yields though the second method resulted to be preferable due to the shorted reaction time. Afterwards, the thiohydroximates were employed in sulfation-elimination or elimination-acidification reactions to obtain the corresponding isothiocyanates and thiohydroxamic acids. Due to the fact that this reactions were not so efficient, some changes were done to improve it and the reactions were repeated several times. Some encouraging results were obtained even if the changes were not applicable to all the substrates employed.

INDICE

INTRODUZIONE	1
<i>GLUCOSINOLATI</i>	<i>1</i>
<i>S-GLUCOSILTRANSFERASE (S-UGT)</i>	<i>4</i>
<i>MIROSINASI</i>	<i>6</i>
OBBIETTIVO DEL PROGETTO	8
RISULTATI E DISCUSSIONE	10
<i>FORMAZIONE DELLE OSSIME</i>	<i>10</i>
<i>ESTERIFICAZIONE DELLA (L)-N-ACETILCISTEINA</i>	<i>11</i>
<i>FORMAZIONE DEL TIOIDROSSIMATO</i>	<i>12</i>
<i>SOLFATAZIONE DEI TIOIDROSSIMATI</i>	<i>15</i>
<i>ISOTIOCIANATI DALLA BETA-ELIMINATION SUI TIOIDROSSIMATI SOLFATATI</i>	<i>20</i>
<i>ACIDI TIOIDROSSAMICI DAI TIOIDROSSIMATI</i>	
<i>22</i>	
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE	25
PARTE SPERIMENTALE	27
<i>OSSIME</i>	<i>27</i>
<i>METIL N-ACETIL CISTEINATO</i>	<i>32</i>
<i>TIOIDROSSIMATI</i>	<i>33</i>
<i>TIOIDROSSIMATI O-SOLFATATI</i>	<i>38</i>
<i>ISOTIOCIANATI</i>	<i>43</i>
<i>SALE DELL'ACIDO TIOIDROSSAMICO</i>	<i>44</i>

INTRODUZIONE

GLUCOSINOLATI

I Glucosinolati (GLs) sono dei metaboliti tiosaccaridici secondari¹ che si trovano principalmente in tutte quelle famiglie di piante appartenenti all'ordine delle Brassicales. Le famiglie più importanti sono le Brassicaceae, le Caricaceae, le Euphorbiaceae, le Moringaceae, le Phytolaccaceae, le Resedaceae e le Tropealaceae. Nel 2001 si sono registrati più di 120 GLs naturali anche se recentemente una seconda analisi ha completato il loro numero a 132.² Questi si trovano in verdure quali il cavolo, i broccoli, il cavolfiore, i cavoletti di Bruxelles e sono responsabili del loro sapore amaro e intenso.

Tutti i GLs conosciuti manifestano una notevole omogeneità strutturale costituita da una funzione tioidrossimata O-solfatata di configurazione *Z* legata tramite lo zolfo al carbonio anomero di una unità β -D-glucopiranosile e tramite il carbonio sp^2 ad una catena laterale R che rappresenta l'unica variante strutturale (Figura 1).

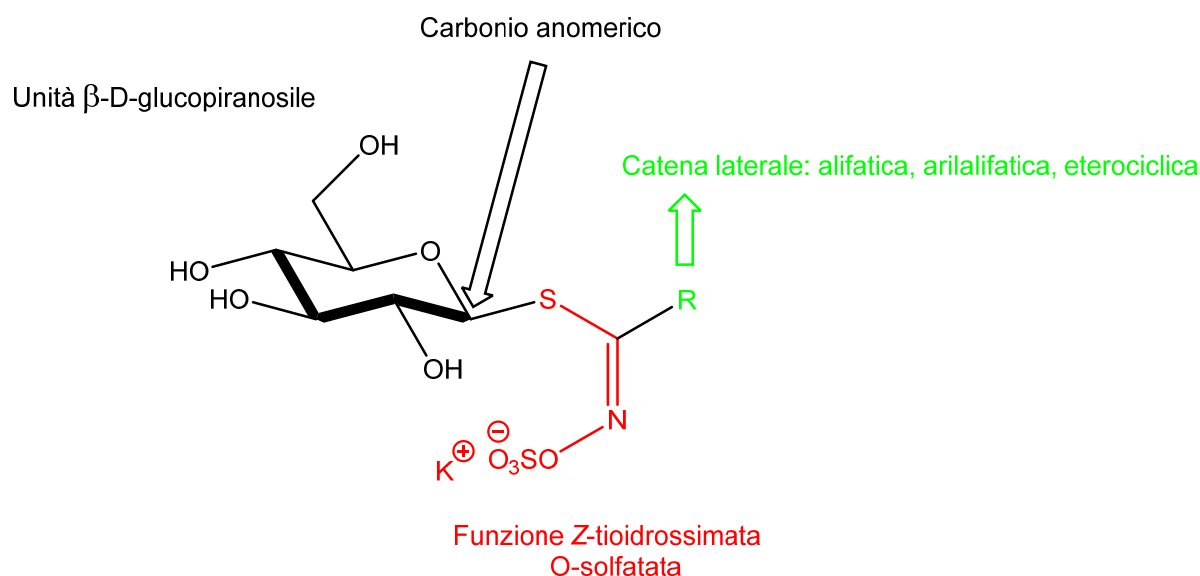


Figura 1. Struttura dei GLs

¹ Fenwick, G. R.; Heaney, R. K.; Mullin, W. J. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1983**, 18, 123-201.

² Fahey, J. W.; Zalcmann, A. T.; Talalay, P. *Phytochemistry* **2001**, 56, 5-51.

I primi glucosinolati furono isolati nel 1830 da semi di senape nera (Sinigrina o 2-propenil glucosinolato) e da semi di senape bianca (Sinalbina o 4-idrossibenzil glucosinolato) (Figura 2).

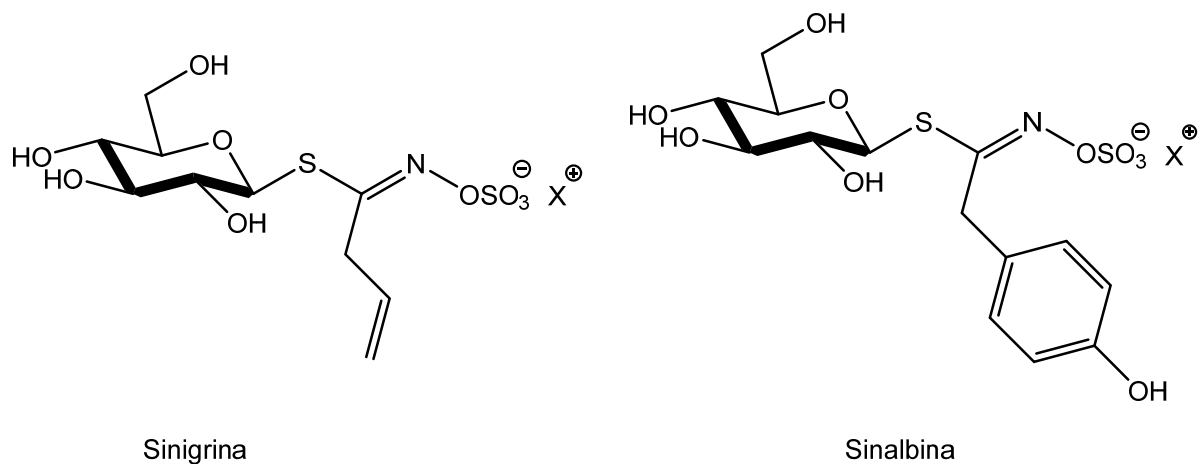


Figura 2. Strutture di Sinigrina e Sinalbina

La prima struttura generale, incorretta, di questi composti fu proposta alla fine del diciannovesimo secolo da Gadamer (1897) e prevedeva che la catena laterale R fosse legata all'atomo di azoto mentre il gruppo solfato al carbonio sp^2 della funzione tioidrossimata. Questa struttura fu ritenuta corretta fino al 1956, quando si rivelò incapace di descrivere determinate proprietà della molecola; quindi nel 1957 Ettliger e Lundeen proposero una struttura nuova e corretta in cui il gruppo solfato è legato all'atomo di azoto (Figura 3).

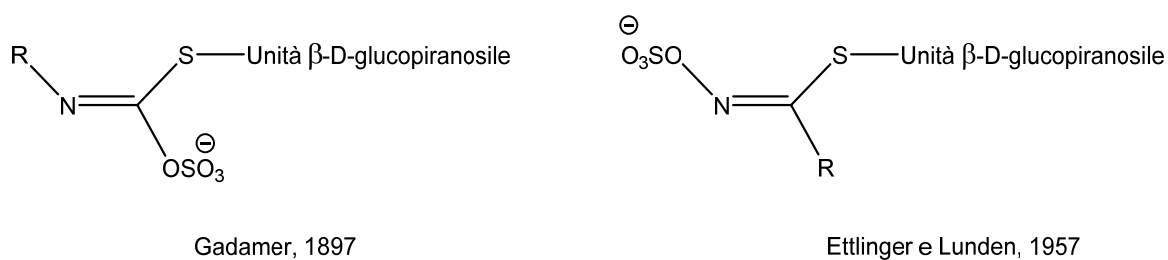


Figura 3. Strutture generali proposte nel corso degli anni

La stereoisomeria al legame C=N fu stabilita essere Z via cristallografia a raggi X.² Ettliger e Lunden furono i primi a descrivere la sintesi chimica di un glucosinolato.

Nelle piante i glucosinolati sono biosintetizzati dagli amminoacidi.³

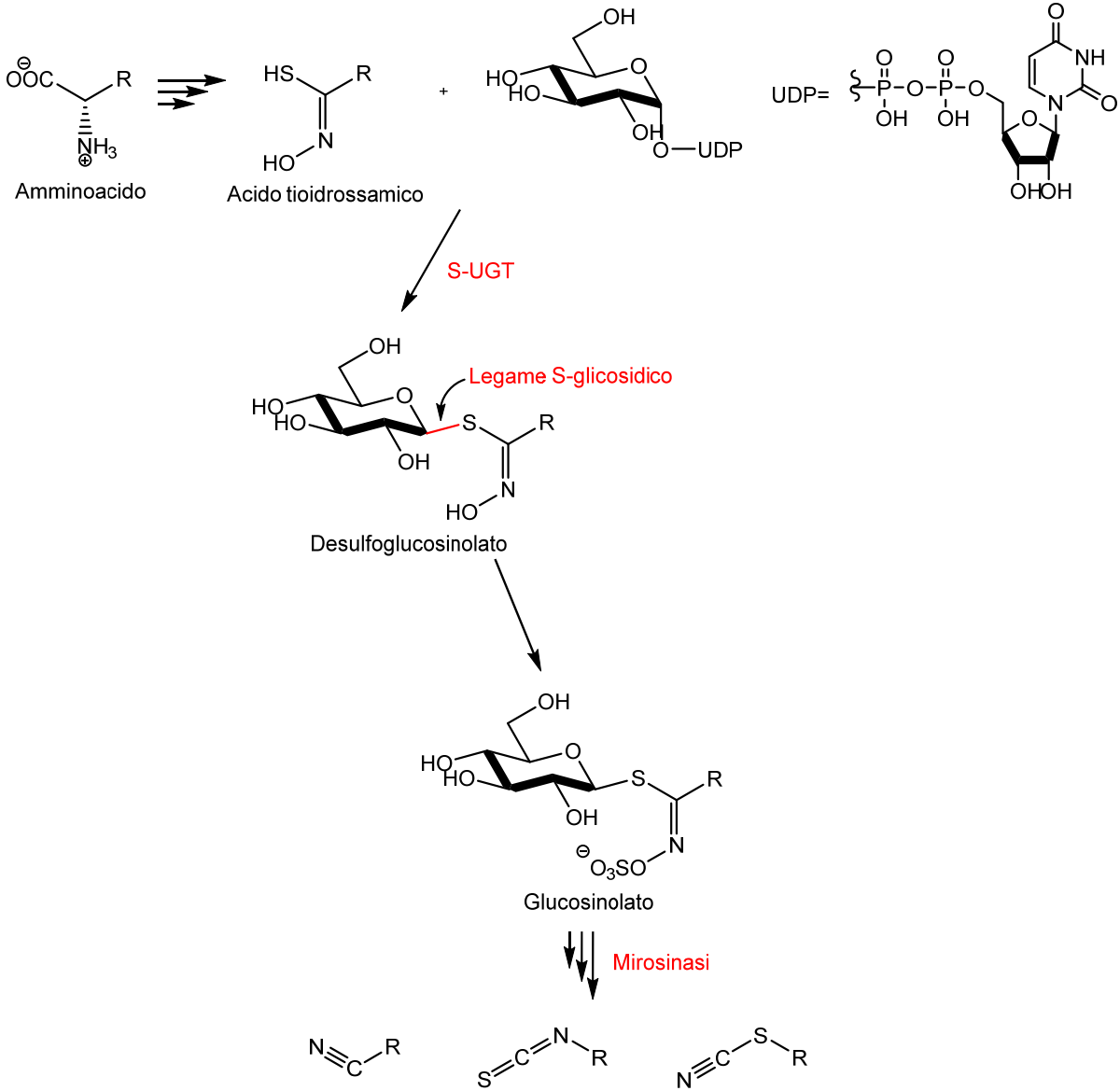


Figura 4. Biosintesi di GLs e azione della Mirosinasi

³ B. A. Halkier and J. Gershenzon, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **2006**, 57, 303-333.

Uno dei passaggi critici di questa biosintesi è la formazione del legame S-glicosidico, catalizzato dalla S-glucosiltransferase (S-UGT).

La Mirosinasi invece idrolizza tale legame causando la scissione del glucosinolato. Da questa scissione si formano composti che agiscono da difesa naturale della pianta perché tossici per batteri e insetti.⁴ Inoltre l'interesse in questi prodotti di scissione, ben conosciuti da decenni, è cresciuta recentemente grazie alla loro azione chemiopreventiva verso il cancro e malattie cardiovascolari o neurologiche.⁵

S-GLUCOSILTRANSFERASE (S-UGT)

La S-glucosiltransferase appartiene alla famiglia delle glicosiltransferasi (GTs), enzimi responsabili della formazione di legami glicosidici e che catalizzano il trasferimento di uno zucchero attivo ("donatore") verso una molecola accettatrice ("accettore"). Questa reazione equivale a una sostituzione nucleofila.



Figura 5. Azione delle GTs

Lo zucchero donatore può essere uno zucchero-nucleotide mono o difosfato mentre l'accettore può essere anch'esso uno zucchero, o un lipide o una molecola più piccola.⁶

Le glicosiltransferasi sono classificate in due famiglie, A e B a seconda della loro struttura. Ogni famiglia è poi divisa in due sottocategorie che si differenziano a seconda del loro meccanismo di formazione del legame glicosidico. Come già detto, la reazione catalizzata dalle GTs è una sostituzione nucleofila che può avvenire attraverso inversione o ritenzione di configurazione del carbonio anomero dello zucchero donatore.

Se lo zucchero donatore è l'UDP- α -glucosio, il prodotto della reazione sarà, nel caso di inversione, un β -glucoside, mentre nel caso di ritenzione, un α -glucoside.

⁴ F. S. Hanschen, E. Lamy, M. Schreiner, S. Rohn, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2014**, 53, 11430-11450.

⁵ A. T. Dinkova-Kostova and R. V. Kostov, *Trends Mol. Med.*, **2012**, 18, 337-347.

⁶ Coutinho, P. M.; Deleury, E.; Davies, G. J.; Henrissat, B. *J. Mol. Biol.* **2003**, 328, 307-317.

Si riporta il meccanismo di inversione di configurazione.⁷

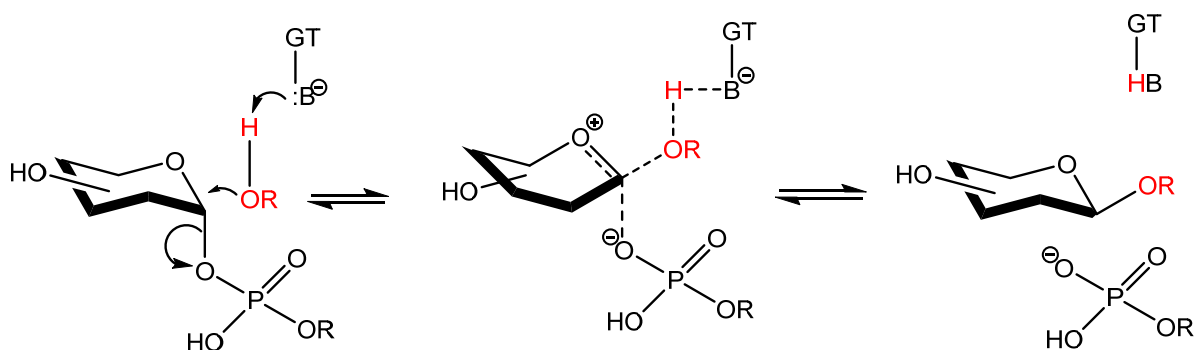


Figura 6. Meccanismo di formazione del legame glicosidico con inversione di configurazione al carbonio anomero.

La S-glucosiltransferase appartiene alla famiglia GT-B e agisce secondo un meccanismo di inversione di configurazione. Ha un ruolo fondamentale nella formazione dei glucosinolati perché permette la formazione del legame S-glicosidico tra il carbonio anomero dell' UDP- α -glucopiranosile (UDP-Glc) e l'atomo di zolfo dell'acido tioidrossamico.

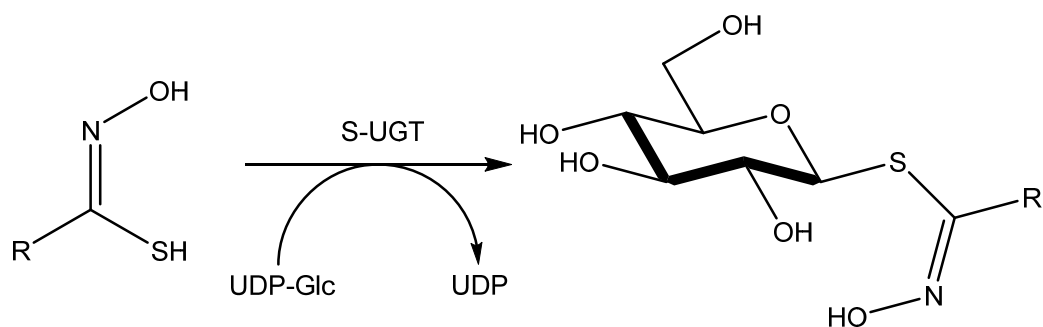


Figura 7.

⁷ Breton, C.; Fournel-Gigleux, S.; Palcic, M. M. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **2012**, 22, 540-549

MIROSINASI

La Mirosinasi è tra i pochi enzimi capaci di idrolizzare i legami tioglicosidici e l'unico in grado di idrolizzare i glucosinolati. La Mirosinasi e i GLs sono immagazzinati in diverse parti della pianta, specialmente nei semi. Quando una pianta è danneggiata o masticata e ingerita avviene quella che è chiamata "mustard oil bomb", ossia l'enzima idrolizza il glucosinolato in una varietà di composti fondamentali per la difesa della pianta e per la salute dell'uomo.⁸ L'enzima è stato isolato e caratterizzato da diverse fonti come il crescione, la senape gialla e quella bianca; esistono diverse strutture di questo enzima, anche nella stessa pianta.²

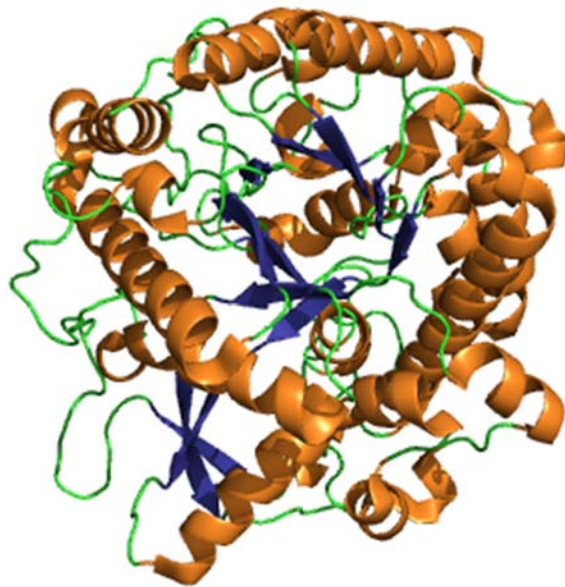


Figura 8. Struttura della Mirosinasi

L'idrolisi causa la scissione del glucosinolato in una molecola di glucosio e una molecola portante la funzione Z-tioidrossimata O-solfatata; quest'ultima subisce quello che è chiamato "Lossen like rearrangement" da cui si generano gli isotiocianati.

⁸ Bones, M.; Rossitier, J. T., *Phytochemistry*, **2006**, 67, 1053-1067.

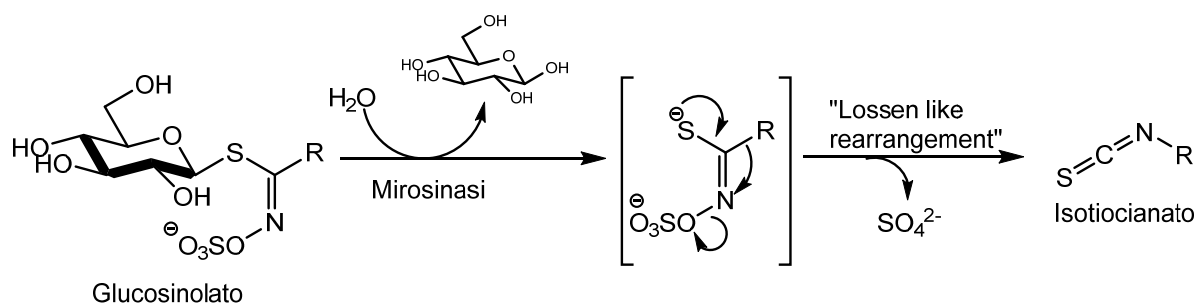


Figura 9. Idrolisi del GLs

Andando a variare la struttura di ogni glucosinolato o le condizioni di reazione è possibile ottenere svariate molecole tra cui i nitrili, i tiocianati, gli epitionitrili, gli ossazolidintioni, oltre ai più comuni isotiocianati.⁹

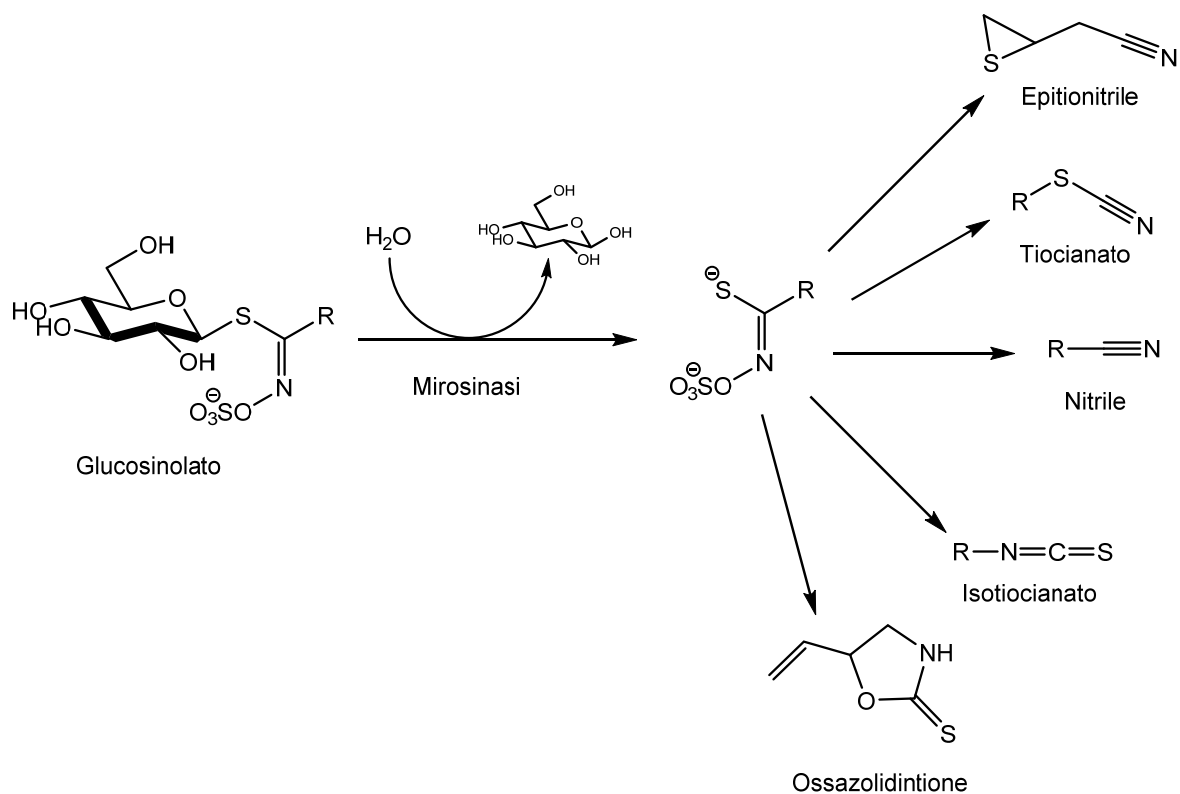


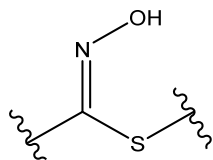
Figura 10. Unità strutturali ottenibili per azione della Myrosinasi

Tutte queste molecole agiscono come difesa della pianta e possiedono proprietà anticancerogene.^{4,5}

⁹ Agerbirk, N.; Olsen, C. E., *Phytochemistry*, **2012**, 77, 16-45

OBIETTIVO DEL PROGETTO

Il gruppo di ricerca presso cui ho svolto il mio lavoro di tesi ha lavorato sulla sintesi dei tioidrossimati, composti contenenti la funzionalità Z-tioidrossimata.



Funzione Z-tioidrossimata

Figura 11. Schema generale di uno Z-tioidrossimato

I tioidrossimati sono degli ottimi inibitori della S-glucosiltransferase e di conseguenza risultano fondamentali nello studio del meccanismo di azione dell'enzima.

L'obiettivo del lavoro quindi è stata la sintesi di diversi tipi di tioidrossimati usati come inibitori e come punto di partenza per la sintesi di isotiocianati, via "Lossen like rearrangement", e di acidi tioidrossamici, via eliminazione e poi acidificazione.

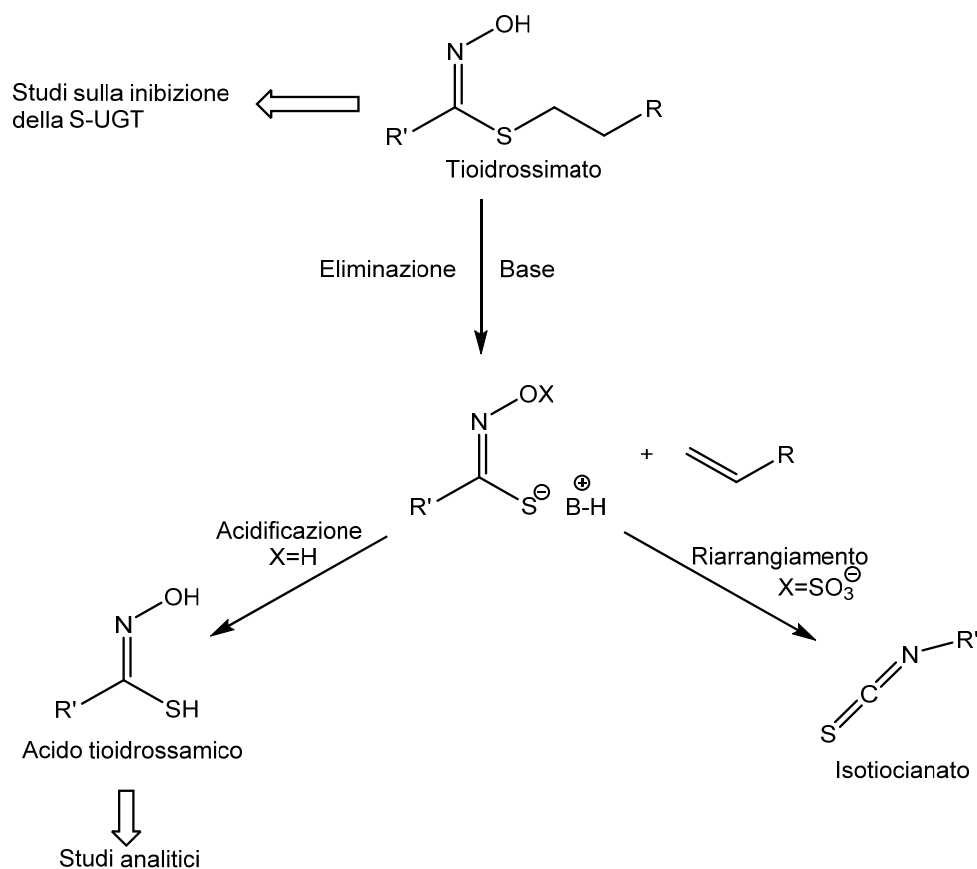


Figura 12. Obiettivo del lavoro di tesi

I tioidrossimati che si trovano in natura sono i glucosinolati (GLs) che, come detto precedentemente, si trovano nelle piante e presentano una unità β -D-glucopiranosile legata all'atomo di zolfo.

A differenza dei GLs che sono biosintetizzati a partire dagli amminoacidi, i tioidrossimati di cui mi sono occupato sono stati tutti sintetizzati in laboratorio partendo da cinque diverse aldeidi. Queste, attraverso opportuni passaggi, sono state convertite nelle corrispondenti ossime e fatte reagire con il metil *N*-acetil cisteinato, estere della (*L*)-*N*-acetilcisteina, al fine di ottenere la funzione tioidrossimata.

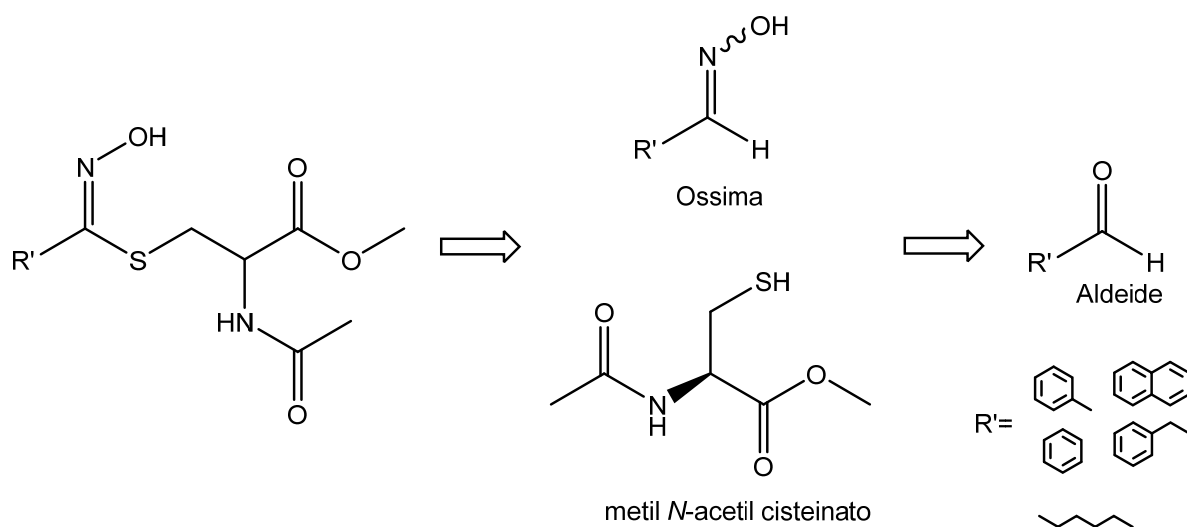


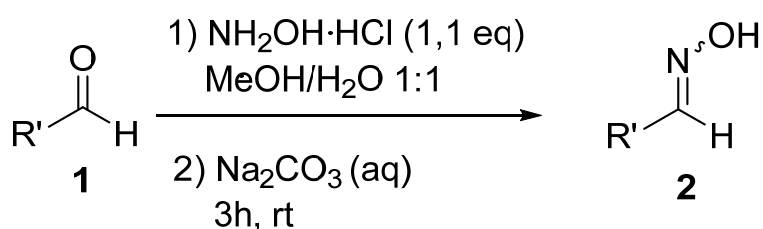
Figura 13. Schema retrosintetico del progetto

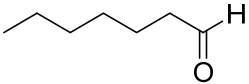
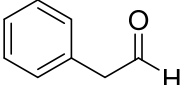
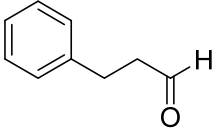
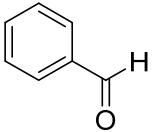
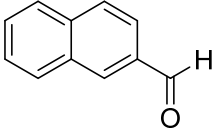
RISULTATI E DISCUSSIONE

FORMAZIONE DELLE OSSIME

Le ossime **2a-e** sono state ottenute dalle corrispondenti aldeidi **1a-e** tramite reazione con cloruro di idrossilammonio in soluzione di acqua e MeOH. A fine reazione il metanolo è stato allontanato e la fase acquosa è stata estratta più volte con etil acetato. Dall'analisi $^1\text{H-NMR}$ del grezzo di reazione, si è osservato che la purificazione mediante colonna cromatografica non era necessaria. Le rese ottenute sono state molto buone (Tabella 1).

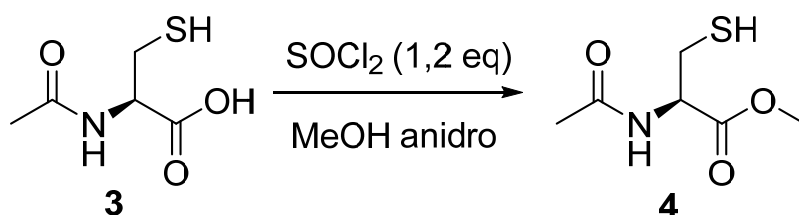
Tabella 1. Sintesi delle ossime **2**



Aldeide	Resa in 2 (%)	<i>E/Z</i>
1a 	2a 76	16/84
1b 	2b 93	53/47
1c 	2c 88	54/46
1d 	2d 90	/
1e 	2e 98	/

Le ossime sono state ottenute come miscela dei due isomeri *E* e *Z* ed il rapporto *E/Z* è stato determinato dall'analisi ¹H-NMR ove possibile. L'isomero *E* presenta il segnale relativo al protone imminico a ppm maggiori poiché in questo isomero questo protone risulta più deschermato dall'ossigeno del gruppo ossidrilico sull'azoto.

ESTERIFICAZIONE DELLA (L)-N-ACETILCISTEINA



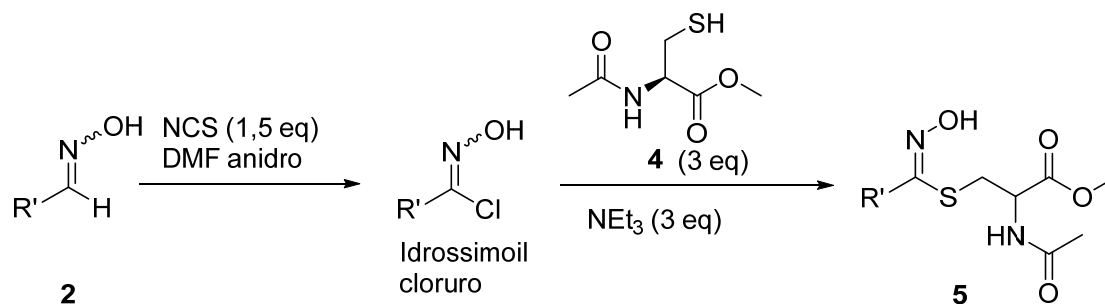
Schema 1. Esterificazione della cisteina

L'acetilcisteina **3** è un derivato acetilato dell'amminoacido cisteina; questa è stata sottoposta a esterificazione al fine di ottenere il metil *N*-acetil cisteinato **4** che successivamente è stato fatto reagire con le ossime per dare i tioidrossimati.

L' (L)-*N*-acetilcisteina è stata solubilizzata in MeOH anidro, che agisce sia da solvente che da reagente, e poi è stato aggiunto il tionil cloruro. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto atmosfera di Argon e il tempo di reazione è stato di tre ore durante le quali si è monitorata la formazione dell'estere desiderato via TLC. Come per le ossime, anche in questo caso è stata fatta l'analisi ¹H-NMR del grezzo di reazione che ha mostrato una buona purezza del prodotto. Perciò la purificazione via colonna cromatografica è stata ritenuta non necessaria. La resa della reazione è stata del 54%.

FORMAZIONE DEL TIOIDROSSIMATO

Per ottenere la funzione *Z*-tioidrossimata si è seguito un procedimento, precedentemente sviluppato dal laboratorio per la sintesi dei glucosinolati,¹⁰ che consiste in una sintesi *one-pot* in cui prima si effettua la clorurazione dell'ossima **2** con *N*-clorosuccinimide (NCS) a dare l'idrossimoil cloruro, poi quest'ultimo è fatto reagire con il metil *N*-acetil cisteinato **4** da cui si genera il tioidrossimato.



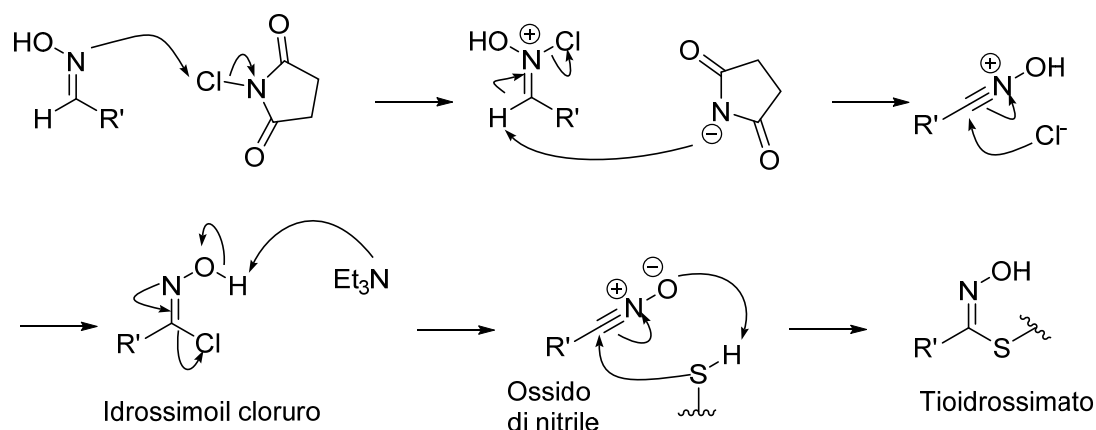
Schema 2. Sintesi degli *Z*-tioidrossimati

L'ossima **2** è solubilizzata in DMF anidro; si aggiunge NCS a 0°C e poi si lascia in agitazione per 7h a temperatura ambiente. La reazione è mantenuta sotto atmosfera di Argon e il pallone avvolto da carta stagnola per proteggere la miscela di reazione dalla luce. Dopo le 7h la miscela è raffreddata di nuovo a 0°C utilizzando un bagno di ghiaccio e viene aggiunto l'estere **4** precedentemente sintetizzato e una base, la NEt₃, lentamente. Si lascia in agitazione per tutta la notte.

Il giorno dopo si verifica la fine della reazione mediante TLC. Per confermare la formazione del prodotto voluto, si è proceduto all'analisi ¹H-NMR del grezzo di reazione. Dall'analisi risulta la presenza sia del prodotto che di impurezze, quindi si esegue la colonna cromatografica. Le rese nei cinque tioidrossimati **5** variano dal 50 all'80%.

Nello schema 4 si riporta l'ipotetico meccanismo della reazione.

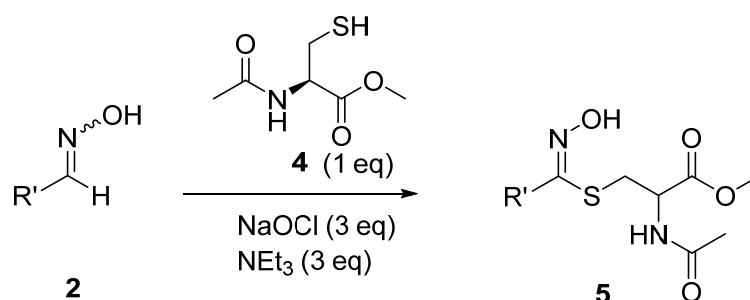
¹⁰ Rollin, P.; Tatibouet, A. *C.R. Chim.* **2011**, 14, 194-210



Schema 3. Meccanismo di reazione ipotizzato per la sintesi degli Z-tioiodrossimati

Inizialmente l'ossima viene clorurata dalla NCS per formare il corrispondente idrossimoil cloruro che successivamente viene deprotonato ed elimina cloruro generando l'ossido di nitrile,¹⁰ il quale reagendo con la funzione tiolica presente sul derivato cisteinico porta al tioiodrossimato. Entrambe le reazioni per ottenere l'idrossimoil cloruro e il tioiodrossimato passano attraverso lo stesso intermedio nitrilico con perdita della configurazione *E* o *Z* dell'ossima/idrossimoil cloruro.

Nonostante le rese ottenute fossero abbastanza buone, i tempi di reazione troppo lunghi, l'alto numero di passaggi e l'eccessiva quantità di estere della cisteina **4** richiesta dal processo hanno portato a prendere in considerazione una via di sintesi alternativa che permettesse un uso più moderato di cisteina e soprattutto tempi di reazione più brevi. Il metodo alternativo scelto, già sviluppato e utilizzato in precedenza dal laboratorio di ricerca nella sintesi dei glucosinolati, è un metodo semplice e comodo basato sulla formazione *in situ* dell'intermedio idrossimoil cloruro utilizzando una semplice ed economica soluzione di ipoclorito.¹¹



Schema 4. Seconda procedura sintetica proposta per gli Z-tioiodrossimati **5**

¹¹ Susan E. Cobb, Kate F. Morgan, Nigel P. Botting. *Tetrahedron Letters*, **2011**, 52, 1605-1607

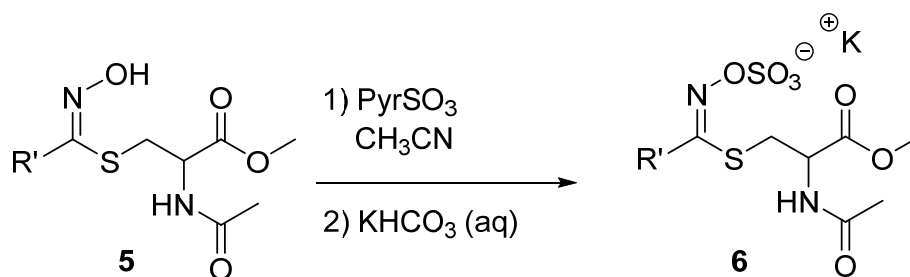
Le ossime **2** sono disciolte in diclorometano e introdotte in un imbuto separatore a cui si aggiunge la soluzione di ipoclorito. La soluzione bifasica viene agitata per qualche minuto e si nota lo sviluppo di un colore blu della soluzione dovuto alla presenza dell'intermedio C-nitroso.¹² La fase organica viene poi fatta gocciolare in una soluzione di un solo equivalente di metil cisteinato **4** in diclorometano a cui viene aggiunta per ultima e lentamente la trietilammina, così da permettere la formazione dell'ossido di nitrile. Il tutto è poi lasciato in agitazione per 3h sotto atmosfera di Argon, monitorando l'avanzamento della reazione via TLC. A fine reazione si esegue l'analisi ¹H-NMR del grezzo di reazione e la purificazione del prodotto via colonna cromatografica; le rese finali vanno dal 50 all'80%.

Confrontando i due processi, l'ultimo si è dimostrato migliore soprattutto per quanto riguarda il tempo di reazione.

I tioidrossimati **5** così preparati sono stati sottoposti a processi di solfatazione e beta-eliminazione, beta-eliminazione e acidificazione al fine di ottenere isotiocianati e acidi tioidrossamici.

¹² Gil, V.; MacLeod, A. J. *Tetrahedron* **1980**, 36, 779-783.

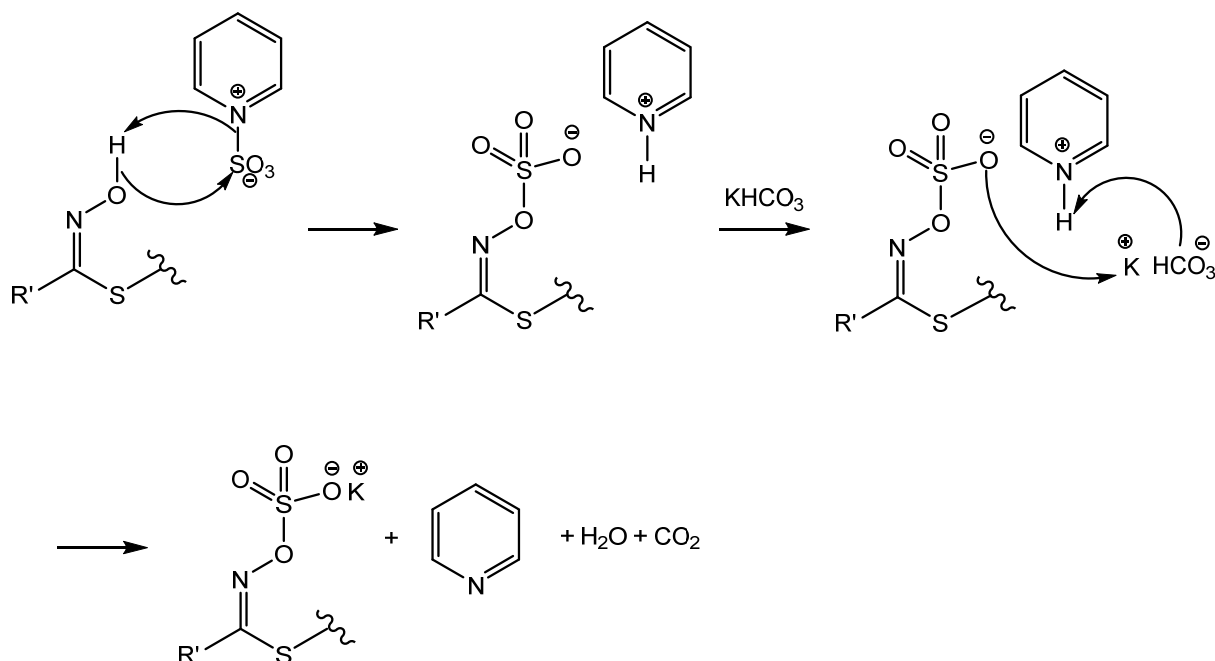
SOLFATAZIONE DEI TIOIDROSSIMATI



Schema 5. Solfatazione dei tioidrossimati

Il tioidrossimato **5** viene solfato sull'ossigeno dell'ossidrilica della funzione tioidrossimata (O-sulfation) per reazione con il complesso zolfo triossido piridina (PyrSO_3) seguito, senza alcuna purificazione intermedia, da uno scambio di catione potassio utilizzando KHCO_3 .¹³

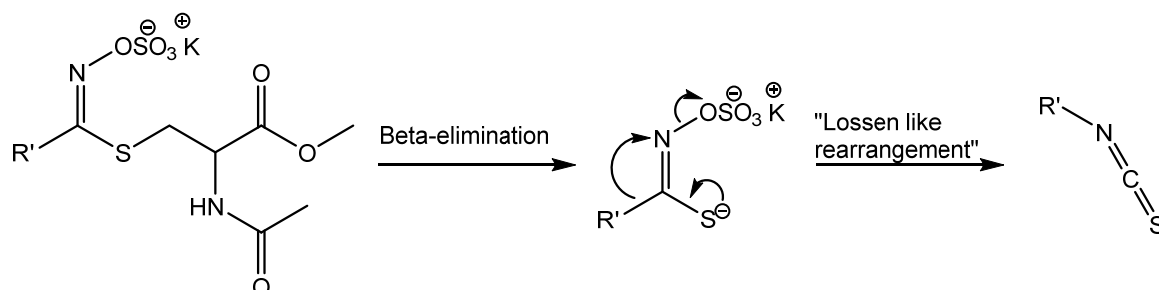
Di seguito si riporta il meccanismo di reazione.



Schema 6. Meccanismo di reazione ipotizzato per la solfatazione

¹³ Bourderieux, A.; Lefoix, M.; Gueyrard, D.; Tatibouet, A.; Cottaz, S.; Artz, S.; Burmeisterd, W. P.; Rollin, P. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1872-1879

Lo scopo della solfatazione è quello di rendere l'ossidrile sull'azoto un miglior gruppo uscente così da permettere, attraverso la Beta-eliminazione, il "Lossen like rearrangement" per formare gli isotiocianati.¹⁰



Schema 7. Processo per l'ottenimento degli isotiocianati

L'intero processo di solfatazione si è dimostrato alquanto complesso per tutti e cinque i tioidrossimati di partenza, in particolare per **5d** derivante dalla benzaldeide e per **5e** derivante dalla naftaldeide.

Il protocollo seguito per la solfatazione è lo stesso utilizzato per i glucosinolati: il tioidrossimato (1 eq) è stato solubilizzato in acetonitrile e poi fatto reagire con PyrSO_3 (5 eq) per 1h a 50°C sotto atmosfera di Argon. Il tutto è poi stato posto in un bagno di ghiaccio, si è aggiunta una soluzione acquosa di KHCO_3 (5 eq) e infine la miscela è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 30/40 minuti.

I primi tre tioidrossimati sottoposti a questo protocollo di reazione sono stati quelli derivanti dall'eptanale **1a**, dalla fenilacetaldeide **1b** e dalla fenilpropanale **1c**.

Prima della purificazione è stata effettuata l'analisi $^1\text{H-NMR}$ del grezzo di reazione e in tutti e tre i casi si è notata la presenza dei medesimi tre segnali collocati nell'intervallo tra 8 e 9 ppm. Si è pensato che si riferissero al complesso di zolfo triossido piridina non reagito o allo ione piridinio rimasto legato alla funzione solfatata a causa del non avvenuto scambio con il catione potassio o alla piridina formatasi dallo scambio del catione potassio.

Dopo questa prima analisi è stata fatta anche una TLC dove sono state osservate tre macchie. Il grezzo è stato poi purificato via colonna cromatografica.

Sui tre composti eluiti dalla colonna si è eseguita l'analisi $^1\text{H-NMR}$. Lo spettro del prodotto solfatato, il secondo ad essere eluito, non presenta alcun segnale tra gli 8 e i 9 ppm e nemmeno quello relativo al protone ossidrilico della funzione tioidrossimata a prova del fatto che la solfatazione è avvenuta, come confermato anche dalla spettrometria di massa. Per quanto riguarda le altre due frazioni eluite dalla colonna, la prima (R_f maggiore) è simile al prodotto, mentre la terza (R_f minore), mostra i 3 segnali tra gli 8 e i 9 ppm e altri relativi ad altre impurezze.

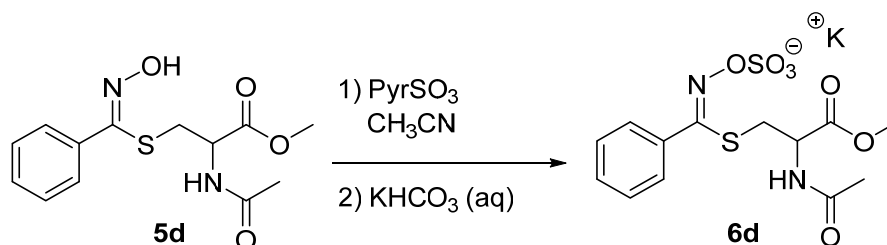
Le rese nei prodotti desiderati non sono state alte, tra il 40 e il 60%. Si è ipotizzato che la causa di ciò fosse un tempo di reazione troppo breve da non permettere alla solfatazione

di giungere a completezza o che il prodotto subisse degradazione durante la reazione e/o quando eluito in colonna. Entrambe le ipotesi spiegherebbero il perchè del composto il cui spettro è simile a quello del prodotto.

Con gli altri due tioidrossimati si è cercato quindi di risolvere il problema andando ad apportare modifiche alla procedura utilizzata.

Partendo dal tioidrossimato **5d** derivante benzaldeide, è stato cambiato il tempo di reazione da 1h a 18h (Tabella 2, prova 2). Dalla TLC è risultata una quarta macchia oltre alle tre già viste nei tre casi precedenti. Il confronto con la TLC della tioidrossima di partenza ha portato alla conclusione che questa sia di reagente non reagito. Tutte queste macchie rimangono anche dopo l'aggiunta della soluzione di KHCO_3 prima della purificazione. La resa nel prodotto desiderato **6d** è stata del 34%.

Tabella 2.



Prova	PyrSO ₃ (eq)	KHCO ₃ (eq)	Tempo ^a		Resa (%)
			1)	2)	
1	5	5	1h	30 min	10
2	5	5	18h	30 min	34
3	10	20	18h	30 min	42
4	10	20 ^b	8h	18h	11
5	5	5	3h	40 min	7

a: il tempo 1 si riferisce alla reazione di solfatazione, il tempo 2 alla reazione di scambio. b: KHCO_3 aggiunto come solido

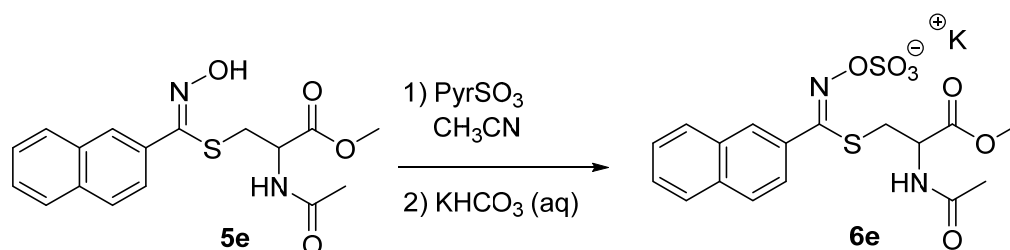
L'aumento del tempo di reazione ha portato ad un peggioramento: il tioidrossimato non ha mostrato elevata reattività ed inoltre il prodotto **6d**, molto probabilmente, si degrada restando troppo tempo nella miscela di reazione. Va inoltre ricordato che l'eluizione in colonna può essere anch'essa causa di degradazione.

Nonostante questo risultato, si è provato a spingere ancora di più la reazione di solfatazione aumentando a 10 il numero di equivalenti di PyrSO_3 e a 20 il numero di

equivalenti di KHCO_3 per forzare lo scambio di catione potassio (Tabella 2, prova 3) portando ad una resa leggermente superiore (42%) anche se non ancora soddisfacente. Le altre variazioni non hanno invece portato ad alcun miglioramento (Tabella 2, prove 4 e 5).

Anche per il tioidrossimato **5e** derivante dalla naftaldeide sono state fatte diverse prove (Tabella 3).

Tabella 3.

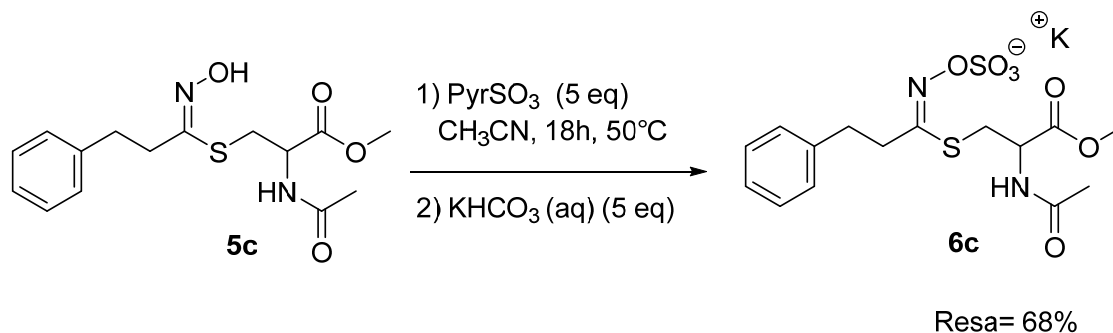


Prova	PyrSO ₃ (eq)	KHCO ₃ (eq)	Tempo ^a		Resa (%)
			1)	2)	
1	5	5.5	1h	30 min	40
2	10	20	18h	30 min	60
3	5	5 ^b	3h 30 min	18h	54
4	5	5	4h 30 min	40 min	27

a: il tempo 1 si riferisce alla reazione di solfatazione, il tempo 2 alla reazione di scambio. b: KHCO₃ aggiunto come solido

Dalla tabella si nota come in questo caso la resa più soddisfacente è stata ottenuta con le condizioni descritte in prova 2.

Alcune di queste modifiche, come l'aumento del tempo di reazione, sono state applicate al tioidrossimato **5c** derivante dalla fenilpropanale e si è notato un miglioramento della resa che è salita al 68%.

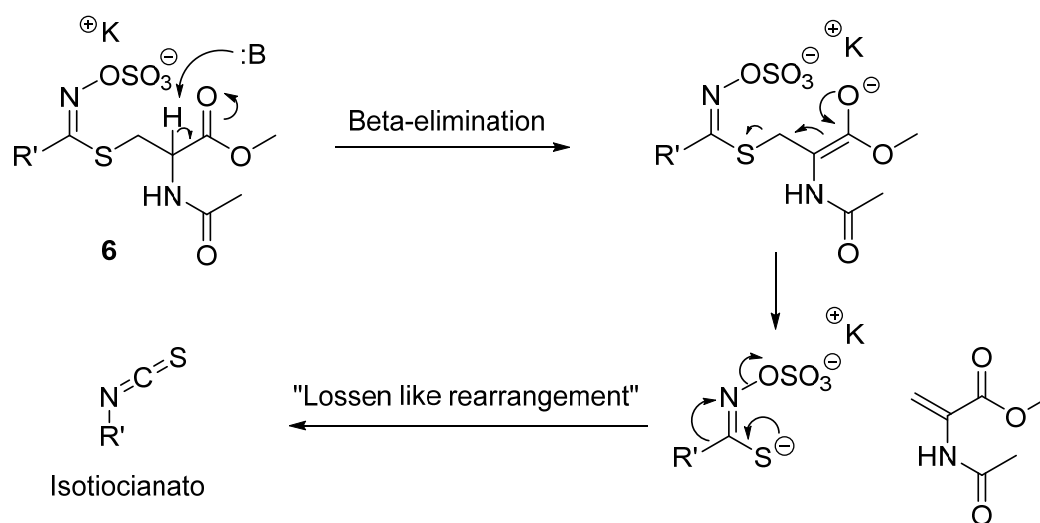


Schema 8.

Per concludere, nonostante le tante prove fatte, non si è ancora compreso quali siano le condizioni di reazione migliori per arrivare a una buona resa nel prodotto solfato e soprattutto non è stato possibile trovare una condizione che fosse generale ed applicabile a tutti i substrati. Altre condizioni (10 equivalenti di PyrSO_3 e 20 di KHCO_3 , ma con tempi di reazione ridotti) devono essere ancora testate.

ISOTIOCIANATI DALLA BETA-ELIMINATION SUI TIOIDROSSIMATI SOLFATATI

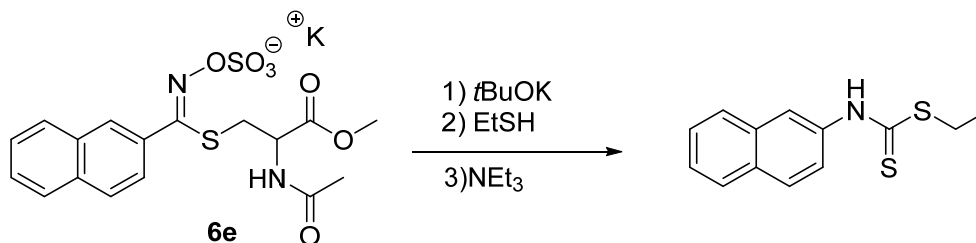
La Beta-elimination non è altro che l'estrazione, per mezzo di una base, del protone che si trova in posizione α al carbonile del gruppo carbossilato. Una base medio forte è in grado di strappare questo protone causando così una scissione del tioidrossimato solfato in due molecole più piccole. Di queste due, quella avente la funzione tioidrossimata O-solfata subisce il "Lossen like rearrangement". Dal riarrangiamento si forma il corrispondente isotiocianato. **Errore. Il segnalibro non è definito.**



Schema 9.

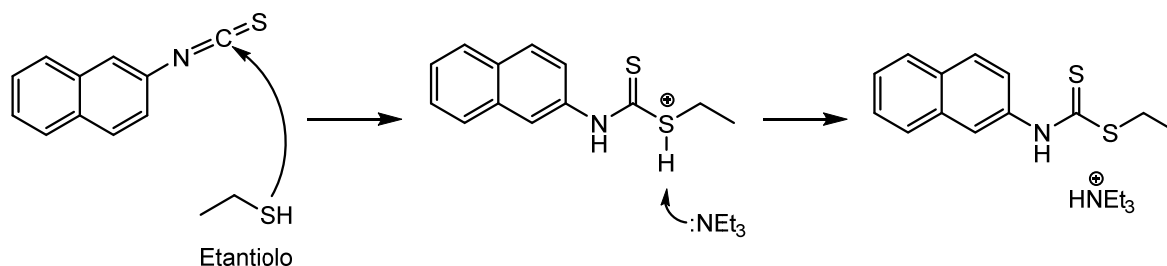
La reazione di eliminazione è stata condotta sul tioidrossimato O-solfato **6e** e la base utilizzata è stata il *tert*-butilato di potassio, abbastanza forte da poter deprotonare il protone in α .

La base (1 eq) è stata aggiunta al tioidrossimato O-solfato sciolto in THF anidro, successivamente sono stati aggiunti etantiolo (1 eq) e NEt₃ (3 eq). Il tutto è stato mantenuto in agitazione a temperatura ambiente e sotto atmosfera di argon.



Schema 10.

L'etantiolo agisce da nucleofilo attaccando il carbonio dell'isotiocianato; lo scopo è ottenere un prodotto finale che sia più semplice da identificare all'NMR e da cui si possa risalire alla formazione effettiva dell'isotiocianato.



Schema 11.

La prima volta la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione per 3h circa, monitorando l'avanzamento della reazione via TLC. Nella prima TLC, insieme al prodotto sono state osservate anche tracce di tioidrossimato O-solfatato. Nella seconda TLC, effettuata dopo 1.5h dalla prima, il reagente di partenza è ancora presente.

Nonostante l'eliminazione non sia stata ottimale, si è passati alla separazione mediante colonna cromatografica.

Dallo spettro ¹H-NMR del prodotto isolato è stato possibile identificare i protoni aromatici del naftalene dai segnali presenti tra i 7.5 e gli 8.25 ppm, mentre non sono stati osservati i protoni del gruppo tioammidico e dell'etile.

Probabilmente la reazione di addizione nucleofila non è andata a buon fine e quindi si è isolato l'isotiocianato con una resa del 39%.

Nella seconda prova si è aumentato il numero di aggiunte e di equivalenti di *tert*-butilato di potassio e di etantiolo così da dare una maggiore spinta alla reazione di eliminazione e di addizione; si è tralasciata l'aggiunta di NEt₃. Si è iniziato con 1 equivalente di base e dopo 30 minuti si è fatta una TLC da cui è risultato, oltre al prodotto, il tioidrossimato O-solfatato di partenza.

Sono stati quindi aggiunti altri 3 equivalenti di base e 2 di etantiolo; la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione per la notte.

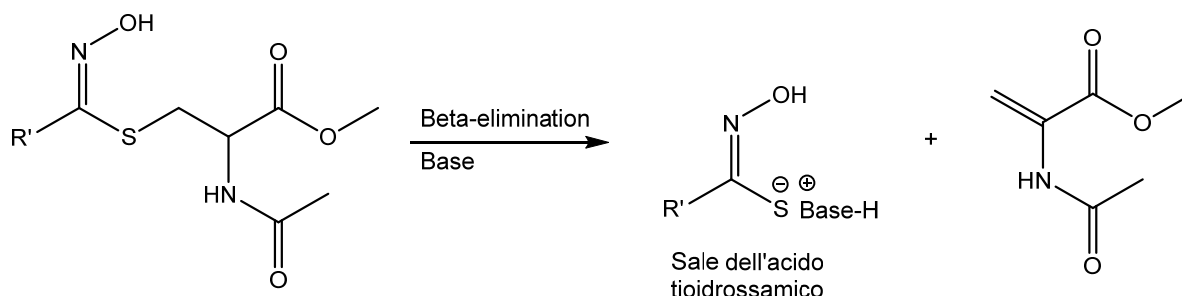
Il successivo controllo TLC ha mostrato la presenza del reagente di partenza e quindi è stata effettuata un'ultima aggiunta di 3 equivalenti di base e 2 di etantiolo. Dopo 30 minuti, la reazione è stata fermata e il grezzo è stato purificato tramite colonna cromatografica. Anche in questo caso è stato però isolato solo l'isotiocianato con una resa del 13%.

In conclusione, la sintesi degli isotiocianati è risultata per il momento insoddisfacente perchè nonostante le modifiche fatte, le rese sono state troppo basse.

Ulteriori prove andranno effettuate per verificare la fattibilità della sintesi proposta.

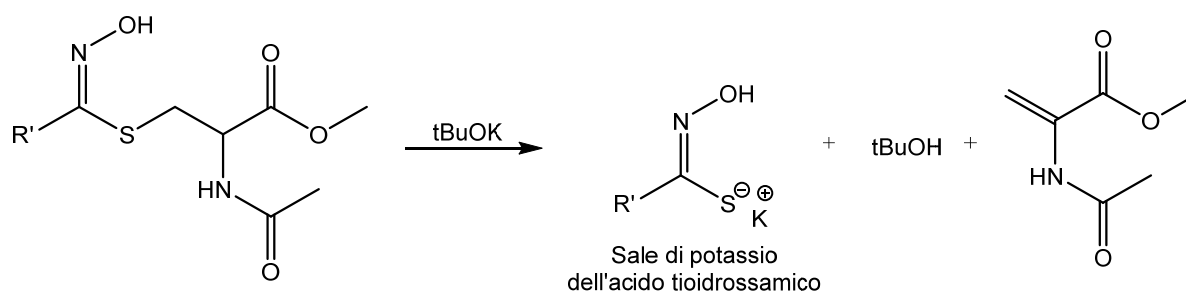
ACIDI TIOIDROSSAMICI DAI TIOIDROSSIMATI

La reazione tra una base e il tioidrossimato promuove la Beta-elimination da cui si generano due molecole. La molecola portante la funzione Z-tioidrossimata non subisce il "Lossen like rearrangement", ma anzi genera il sale dell'acido tioidrossamico.



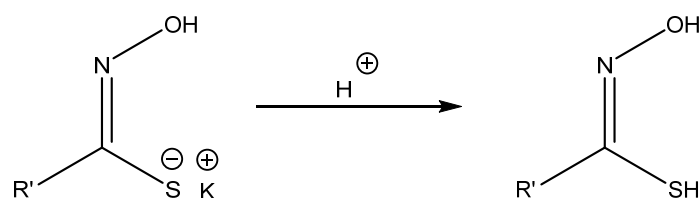
Schema 12.

Come nella sintesi degli isotiocianati, anche qui la base utilizzata è il *tert*-butilato di potassio che reagendo con il tioidrossimato porta alla formazione del sale di potassio dell'acido tioidrossamico.



Schema 13.

Il sale formato viene poi protonato così da dare l'acido tioidrossamico.



Schema 14.

La base è aggiunta da subito in eccesso (3 eq) al tioidrossimato (1 eq), solubilizzato in THF, così da forzare la beta-elimination. La miscela di reazione è poi lasciata in agitazione sotto atmosfera di argon e a temperatura ambiente per tutta la notte; il giorno dopo si è eseguita una TLC che ha mostrato l'assenza del prodotto di partenza. La reazione è stata quindi lavorata ed ha fornito un solido giallo molto umido che è stato liofilizzato: il solido è stato solubilizzato in un opportuno solvente (nel nostro caso acqua), la soluzione è stata congelata in un bagno di acetone e ghiaccio secco e quindi posta sotto alto vuoto per una notte intera così da permettere la sublimazione del solvente.

Successivamente il solido secco è stato purificato utilizzando una colonna cromatografica a fase inversa (Reveleris C-18 reversed phase).

A differenza delle comuni colonne cromatografiche a base di silice, questo tipo di colonna ha come fase stazionaria silice alchilata con catene alchiliche C-18.

La colonna viene eluita in modo automatico dallo strumento mostrato in figura.



Le dimensioni della colonna e delle provette variano a seconda della quantità di grezzo di reazione da purificare.

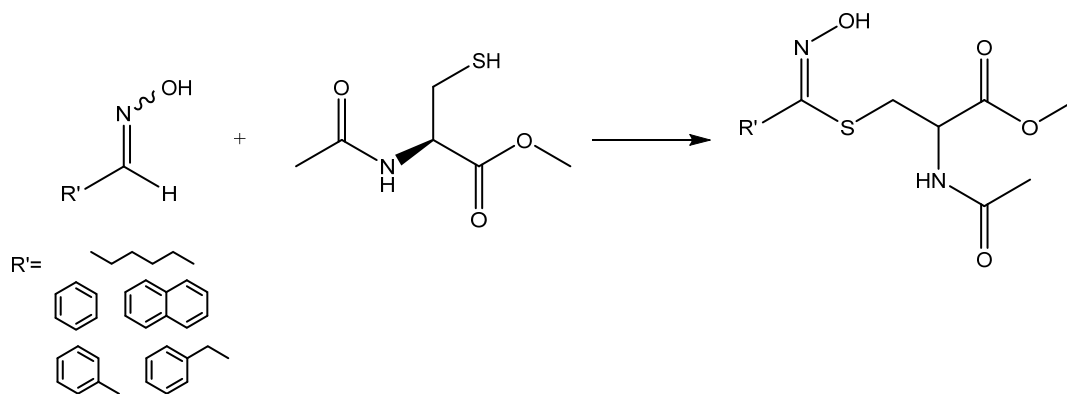
Per il sale dell'acido tioidrossamico, la fase mobile impiegata è stata inizialmente MeOH, successivamente miscele di MeOH e H₂O, aumentando progressivamente la quantità di H₂O fino ad arrivare al 100% di H₂O.

Durante la separazione, tutte le impurezze sono state eluite per prime mentre il sale dell'acido è stato eluito per ultimo.

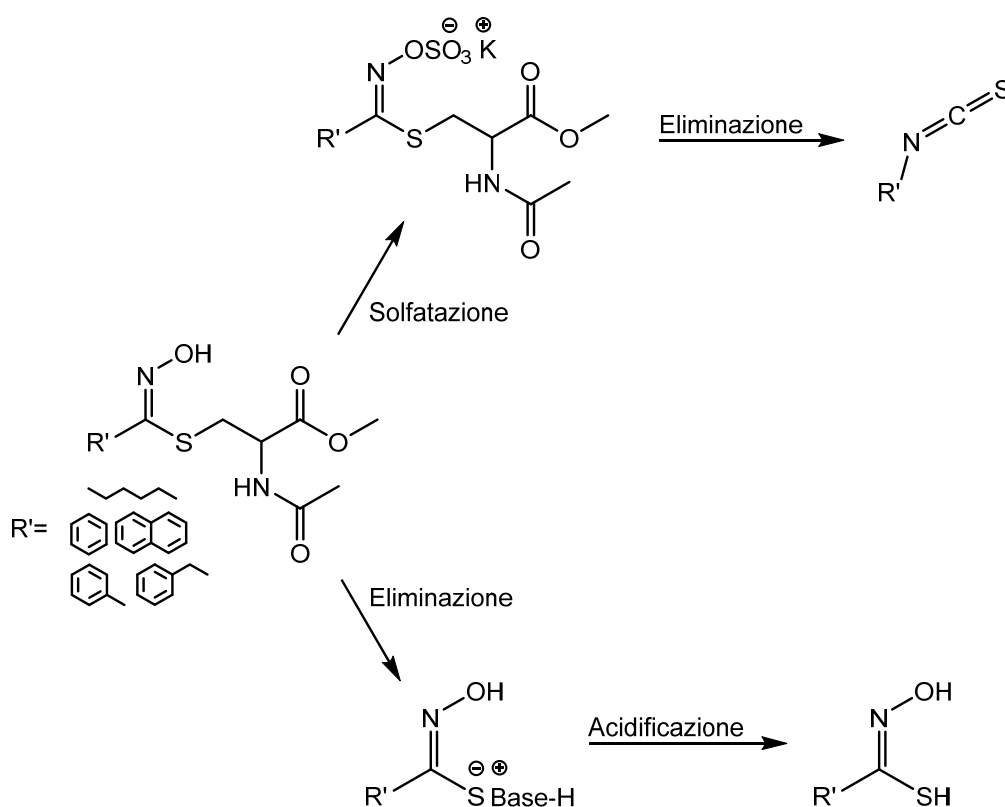
La reazione è stata inizialmente testata sui derivati **5b** e **5c** (Schema 15). L'analisi ¹H-NMR e la spettroscopia di massa effettuate hanno confermato la loro formazione e la

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Il fulcro del lavoro è stata la sintesi di cinque diversi tioidrossimati. Questi sono stati ottenuti facendo reagire cinque ossime ciascuna con il metil *N*-acetil cisteinato, forma esterificata dell'(*L*)-*N*-acetilcisteina.



I tioidrossimati sono stati poi utilizzati come punto di partenza per ottenere gli isotiocianati e gli acidi tioidrossamici attraverso processi di solfatazione-eliminazione, eliminazione-acidificazione.



- La sintesi dei tioidrossimati è stata eseguita inizialmente utilizzando la *N*-clorosuccinimide. Le rese ottenute sono state buone, ma l'alto numero di passaggi, l'eccessiva quantità di metil *N*-acetil cisteinato richiesta e, soprattutto, tempi di reazione troppo lunghi hanno portato a cercare una via di sintesi migliore. Si è deciso quindi di provare con una procedura, già impiegata dal laboratorio di ricerca nella sintesi dei glucosinolati, che utilizza la candeggina. Tale procedura si è rivelata più semplice, ha permesso di ridurre drasticamente il tempo di reazione così come la quantità di metil *N*-acetil cisteinato e ha portato a delle buone rese.
- Per la solfatazione dei tioidrossimati, si è seguita la stessa procedura utilizzata per i glucosinolati, ma le rese sono risultate troppo basse. Si è deciso quindi di apportare modifiche al processo al fine di arrivare ad un miglioramento nelle rese. Qualche miglioramento è stato raggiunto, anche se il processo è ancora da ottimizzare.
- La reazione di eliminazione per fornire isotiocianati eseguita su un solo tioidrossimato *O*-solfatato è risultata insoddisfacente. Dall'analisi NMR risulta la formazione del prodotto, ma le rese sono troppo basse. Sono state fatte modifiche al processo di sintesi, ma queste hanno portato a un peggioramento piuttosto che a un miglioramento della resa.
- Dalla reazione di eliminazione sui tioidrossimati si sono ottenuti i corrispettivi sali con elevata purezza, ma purtroppo le rese non sono state soddisfacenti. Il processo di sintesi richiede modifiche.
- L'acidificazione dei sali dei tioidrossimati ad acidi tioidrossamici non ha portato ai prodotti desiderati. Anche in questo caso si sono apportate modifiche al processo che per ora non hanno portato al miglioramento sperato.

In futuro sarà necessario

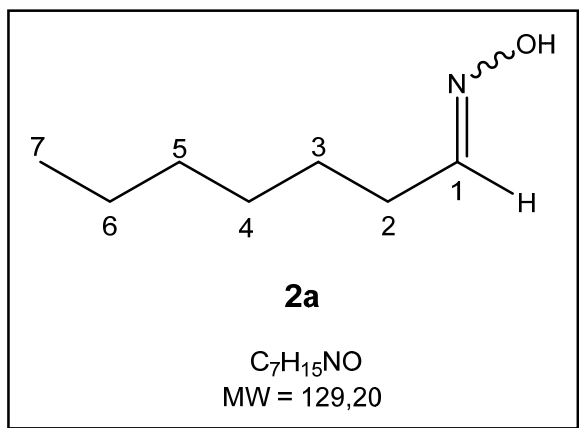
- Migliorare ulteriormente il processo di solfatazione dei tioidrossimati;
- Provare condizioni differenti per intrappolare gli isotiocianati;
- Riguardare il processo di sintesi dei sali dei tioidrossimati;
- Riguardare completamente il metodo di sintesi degli acidi tioidrossamici.

PARTE SPERIMENTALE

- OSSIME

Eptanal ossima (2a)

L'eptanale **1a** (1 eq, 5.00 g, 6 ml, 44 mmol) è disciolta in una miscela 1:1 di H₂O/MeOH (60 ml). A questa soluzione viene aggiunto il cloruro di idrossilammonio (1.1 eq, 3.36 g, 48.4 mmol). Successivamente si versa una soluzione acquosa di Na₂CO₃ (0.5 eq, 2.33 g, 22 mmol, 30 ml) nella miscela di reazione e poi si lascia in agitazione per 3 ore a temperatura ambiente. Si allontana il MeOH al rotavapor e si estrae la fase acquosa con EtOAc (3 × 45 ml). Si raccoglie tutta la fase organica che viene lavata con una soluzione acquosa satura di NaCl (2 × 45 ml), anidrificata con MgSO₄ e infine concentrata al rotavapor a dare l'ossima sotto forma di solido cristallino incolore con una resa del 75% (4,27 g). Questa si presenta come miscela dei due diastereoisomeri *E* e *Z* con un rapporto *E/Z* di 16/84.



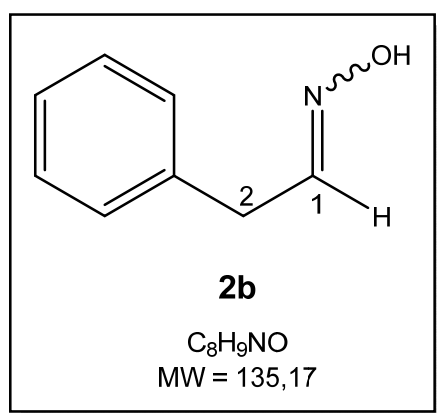
¹H NMR (250 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 9.05 (s, 1H, OH), 7.42 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, H_{1E}), 6.72 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, H_{1Z}), 2.44 – 2.32 (m, 2H, CH_{2 2Z}), 2.20 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH_{2 2E}), 1.47 (q, *J* = 7.4, 6.9 Hz, 2H, CH_{2 3Z}), 1.30 (s, 6H, CH_{2 4,5,6}), 0.88 (t, *J* = 6.1 Hz, 3H, CH_{3 7Z})

HRMS (ESI⁺): *m/z* calculated for C₇H₁₆NO ([M+H]⁺) = 130,122490, found: 130,122641

HRMS (ESI⁻): *m/z* calculated for C₇H₁₄NO ([M]⁻) = 128,108102, found: 128,108088

2-fenilacetaldeide ossima (2b)

La 2-fenilacetaldeide **1b** (1 eq, 4 g, 33.3 mmol) è disciolta in una miscela 1:1 di H₂O/MeOH (44 ml). A questa soluzione viene aggiunto il cloruro di idrossilammonio (1.1 eq, 2.54 g, 36.63 mmol). Successivamente si versa una soluzione acquosa di Na₂CO₃ (0.5 eq, 1.76 g, 16.65 mmol, 22ml) nella miscela di reazione e si lascia in agitazione per 3 ore a temperatura ambiente. Si allontana quindi il MeOH al rotavapor e si estrae la fase acquosa con EtOAc (3 × 34 ml). Si raccoglie tutta la fase organica che viene lavata con una soluzione acquosa satura di NaCl (2 × 34 ml), anidrificata con MgSO₄ e infine concentrata al rotavapor a dare l'ossima sotto forma di solido giallo con una resa del 93% (4.21 g). Questa si presenta come miscela dei due diastereoisomeri *E* e *Z* con un rapporto *E/Z* di 53/47.



¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 8.86 (s, 1H, OH_{E+Z}), 7.53 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, H_{1E}), 7.31 (m, 5H, H_{Ar}), 7.22 (m, 5H, H_{Ar}), 6.89 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, H_{1Z}), 3.74 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, H_{2Z}), 3.53 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, H_{2E}).

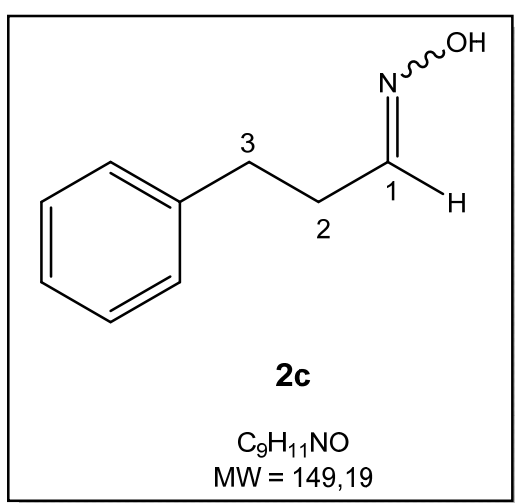
¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 150.81 (C-1_Z), 150.63 (C-1_E), 136.68 (CqAr_E or Z), 136.11 (CqAr_Z or E), 128.86 (C_{Ar}), 128.83 (C_{Ar}), 128.78 (C_{Ar}), 128.77 (C_{Ar}), 126.91 (C_{Ar}), 126.70 (C_{Ar}), 35.95 (C-2_E), 31.75 (C-2_Z).

HRMS (ESI⁺): *m/z* calculated for C₈H₁₀NO ([M+H]⁺) = 136,075446, found: 136,075690

HRMS (ESI⁻): *m/z* calculated for C₈H₈NO ([M]⁻) = 134,061165, found: 134,061137

3-fenilpropanale ossima (2c)

Il 3-fenilpropanale **1c** (1 eq, 4.01 g, 30 mmol) è disciolta in una miscela 1:1 di H₂O/MeOH (40 ml). A questa soluzione viene aggiunto il cloruro di idrossilammonio (1.1 eq, 2.30 g, 33 mmol). Successivamente si versa una soluzione acquosa di Na₂CO₃ (0.5 eq, 1.60 g, 15 mmol, 20 ml) nella miscela di reazione e si lascia in agitazione per 3 ore a temperatura ambiente. Si allontana il MeOH al rotavapor e si estrae la fase acquosa con EtOAc (3 × 30 ml). Si raccoglie tutta la fase organica che viene lavata con una soluzione acquosa satura di NaCl (2 × 30 ml), anidrificata con MgSO₄ e infine concentrata al rotavapor a dare l'ossima sotto forma di cristalli bianchi con una resa dell'88% (3.94 g). Questa si presenta come miscela dei due diastereoisomeri *E* e *Z* con un rapporto *E/Z* di 54/46.



¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 8.88 (s, 1H, OH_{E+Z}), 7.44 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, H_{1E}), 7.27 (m, 5H, H_{Ar}), 7.18 (m, 5H, H_{Ar}), 6.74 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, H_{1Z}), 2.79 (m, 4H, H_{3Z+E}), 2.74 – 2.65 (m, 2H, H_{2Z}), 2.54 – 2.46 (m, 2H, H_{2E}).

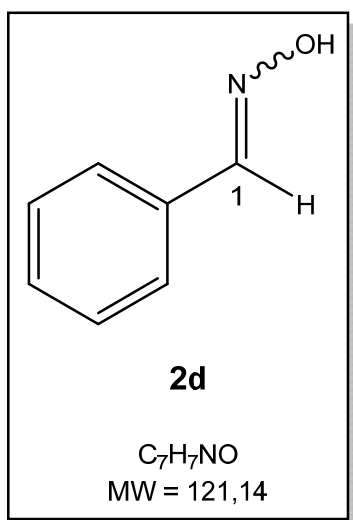
¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 151.70 (C-1_Z), 151.39 (C-1_E), 140.71 (CqAr_E or Z), 140.54 (CqAr_Z or E), 128.60 (C_{Ar}), 128.47 (C_{Ar}), 128.42 (C_{Ar}), 128.35 (C_{Ar}), 126.31 (C_{Ar}), 125.96 (C_{Ar}), 32.92 (C-3_Z or E), 31.99 (C-3_E or Z), 31.26 (C-2_E), 26.54 (C-2_Z).

HRMS (ESI⁺): *m/z* calculated for C₉H₁₂NO ([M+H]⁺) = 150,091155, found: 150,091340

HRMS (ESI⁻): *m/z* calculated for C₉H₁₀NO ([M]⁻) = 148,076587, found: 148,076788

Benzaldeide ossima (2d)

La benzaldeide **1d** (1 eq, 4.00 g, 37.7 mmol) è disciolta in una miscela 1:1 di H₂O/MeOH (50 ml). A questa soluzione viene aggiunto il cloruro di idrossilammonio (1.1 eq, 2.91 g, 41.5 mmol). Successivamente si versa una soluzione acquosa di Na₂CO₃ (0.5 eq, 2.00 g, 18.85 mmol, 25 ml) nella miscela di reazione e si lascia in agitazione per 3 ore a temperatura ambiente. Si allontana quindi il MeOH al rotavapor e si estrae la fase acquosa con EtOAc (3 × 38 ml). Si raccoglie tutta la fase organica che viene lavata con una soluzione acquosa satura di NaCl (2 × 38 ml), anidrificata con MgSO₄ e infine concentrata al rotavapor a dare l'ossima sotto forma di liquido incolore con una resa dell'90% (4.11 g).



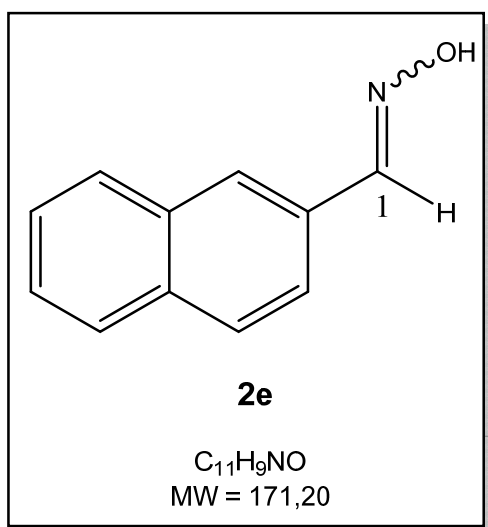
¹H NMR (250 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 10.21 (s, 1H, OH), 8.18 (s, 1H, H₁), 7.59 – 7.50 (m, 2H, H_{Ar}), 7.33 (m, 3H, H_{Ar}).

HRMS (ESI⁺): m/z calculated for C₇H₈NO ([M+H]⁺) = 122,060223, found: 122,060040

HRMS (ESI⁻): m/z calculated for C₇H₆NO ([M]⁻) = 120,045400, found: 120,045487

2-naftaldeide ossima (2e)

La 2-naftaldeide **1e** (1 eq, 4.01 g, 25.6 mmol) è disciolta in una miscela 1:1 di H₂O/MeOH (34 ml). A questa soluzione viene aggiunto il cloruro di idrossilammonio (1.1 eq, 2.02 g, 28.2 mmol). Successivamente si versa una soluzione acquosa di Na₂CO₃ (0.5 eq, 1.36 g, 12.80 mmol, 18 ml) nella miscela di reazione e poi lascia in agitazione per 3 ore a temperatura ambiente. Si allontana quindi il MeOH al rotavapor e si estrae la fase acquosa con EtOAc (3 × 26 ml). Si raccoglie tutta la fase organica che viene lavata con una soluzione acquosa saturata di NaCl (2 × 26 ml), anidrificata con MgSO₄ e infine concentrata al rotavapor a dare l'ossima sotto forma di solido bianco con una resa dell'96% (4.22 g).



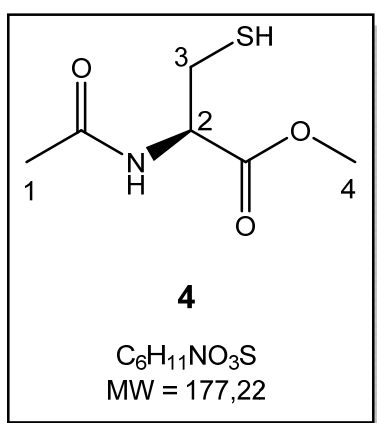
¹H NMR (250 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 10.17 (s, 1H, OH), 8.32 (s, 1H, H₁), 7.92 – 7.79 (m, 5H, H_{Ar}), 7.55 – 7.46 (m, 2H, H_{Ar}).

HRMS (ESI⁺): m/z calculated for C₁₁H₁₀NO ([M+H]⁺) = 172,075731 found: 172,075690

HRMS (ESI⁻): m/z calculated for C₁₁H₈NO ([M]⁻) = 170,061073, found: 170,061137

- METIL N-ACETIL CISTEINATO (4)

L' (L)-N-acetilcisteina **3** (1 eq, 3.1 g, 19 mmol) è solubilizzata in 67 ml di MeOH anidro. Si aggiunge quindi lentamente goccia a goccia nella soluzione SOCl₂ (1.16 eq, 22.1 mmol, 1.61 ml). Questa è poi lasciata in agitazione per tre ore a temperature ambiente sotto atmosfera di Argon. Successivamente si allontana il solvente e il residuo risultante è disciolto in AcOEt (52 ml). La fase organica viene lavata con una soluzione acquosa satura di NaCl (3× 26 ml), anidrificata con MgSO₄ e infine concentrata a dare il prodotto finale sotto forma di solido bianco opaco con una resa del 54% (1.86 g).

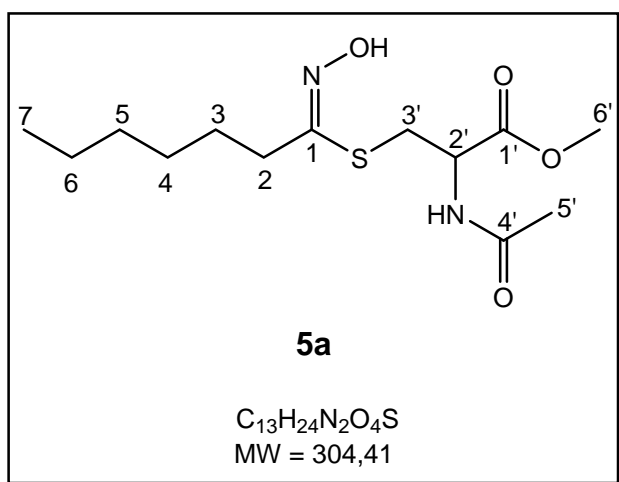


¹H NMR (250 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 6.65-6.34 (m, 1H, NH), 4.88 (dt, *J* = 7.8, 4.2 Hz, 1H, H₂), 3.78 (s, 3H, H₄), 3.07 – 2.92 (m, 2H, H₃), 2.06 (s, 3H, H₁), 1.34 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H, SH)

- TIOIDROSSIMATI

metil (Z)-N-acetil-S-(1-(idrossimmino)eptil)cisteinato (5a)

In un imbuto separatore è aggiunta una soluzione di eptanal ossima **2a** (1.8 eq, 1.0 g, 7.7 mmol) in DCM anidro (38 ml) e una soluzione acquosa di NaOCl 14% (3 eq, 5.3 ml, 12.9 mmol). La miscela bifasica è agitata per 10 minuti e poi la fase organica è versata, attraverso un filtro di MgSO₄, in un pallone raffreddato a 0°C contenente una soluzione di metil N-acetil cisteinato **4** (1 eq, 0.77 g, 4.3 mmol) in DCM anidro (70 ml). Si aggiunge poi la trietilammina (3 eq, 1.81 ml, 12.9 mmol) e si lascia la miscela di reazione in agitazione per 3h sotto atmosfera di Argon. Passate le tre ore, si allontana il DCM al rotavapor e il grezzo di reazione è purificato mediante colonna cromatografica (etere di petrolio/ etil acetato 3/7). Il prodotto finale è ottenuto sotto forma di solido bianco con una resa del 59% (0.77 g).

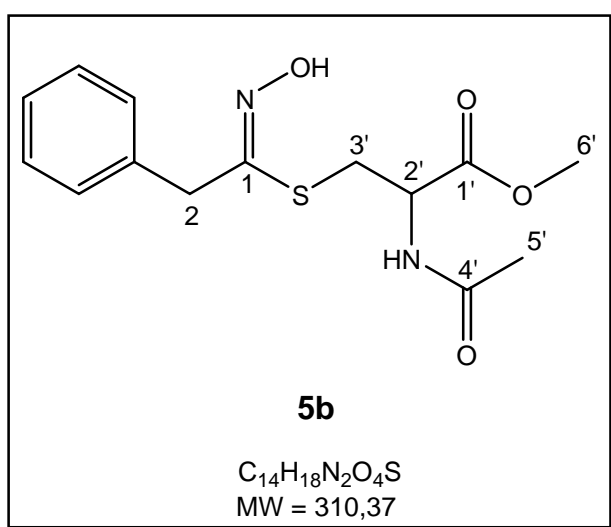


¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 9.02 (s, 1H, OH), 6.51 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, NH), 4.91 (m, 1H, H_{2'}), 3.79 (s, 3H, H_{6'}), 3.48 (dd, $J = 13.5, 4.7$ Hz, 1H, H_{3'a}), 3.38 (dd, $J = 13.5, 4.7$ Hz, 1H, H_{3'b}), 2.43 – 2.37 (m, 2H, H₂), 2.05 (s, 3H, H_{5'}), 1.56 (m, 2H, H₃), 1.32 (m, 6H, H_{4,5,6}), 0.89 (m, 3H, H₇).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ : 170.4 (C=O), 170.2 (C=O), 153.7 (C-1), 52.9 (C-6'), 52.3 (C-2'), 33.1 (C-2), 31.5, 31.4 (C-3'), 28.6, 27.2 (C-3), 23.0 (C-5'), 22.5, 14.0 (C-7).

metil (Z)-N-acetil-S-(1-(idrossimino)-2-fenilettil)cisteinato (5b)

In un imbuto separatore è aggiunta una soluzione di 2-fenilacetaldeide ossima **2b** (1.8 eq, 1.0 g, 7.4 mmol) in DCM anidro (40 ml) e una soluzione acquosa di NaOCl 14% (3 eq, 5 ml, 12.3 mmol). La miscela bifasica è agitata per 10 minuti e poi la fase organica è versata, attraverso un filtro di MgSO₄, in un pallone raffreddato a 0°C contenente una soluzione di metil N-acetil cisteinato **4** (1 eq, 0.73 g, 4.1 mmol) in DCM anidro (75 ml). Si aggiunge poi la trietilammina (3 eq, 1.73 ml, 12.3 mmol) e si lascia la miscela di reazione in agitazione per 3h sotto atmosfera di Argon. Passate le tre ore, si allontana il DCM al rotavapor e il grezzo di reazione è purificato mediante colonna cromatografica (etere di petrolio/ etil acetato 2/8). Il prodotto finale è ottenuto sotto forma di solido giallo con una resa del 78% (1.0 g).

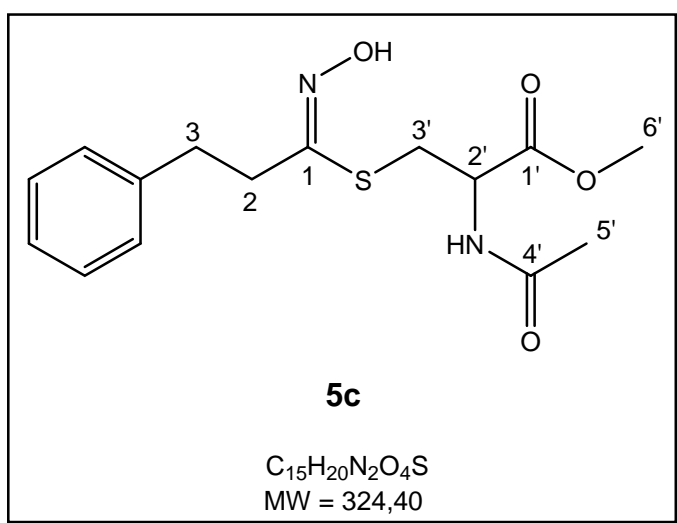


¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 8.13 (s, 1H, OH), 7.39 – 7.23 (m, 5H, H_{Ar}), 6.18 (d, J = 6.8 Hz, 1H, NH), 4.76 (m, 1H, H_{2'}), 3.87 – 3.71 (m, 2H, H₂), 3.72 (s, 3H, H_{6'}), 3.39 (dd, J = 13.3, 4.7 Hz, 1H, H_{3' a or b}), 3.21 (dd, J = 13.3, 5.0 Hz, 1H, H_{3' b or a}), 1.98 (s, 3H, H_{5'})

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ : 170.34 (C=O), 170.03 (C=O), 152.73 (C-1), 135.71 (C_{qAr}), 128.80 (C_{Ar}), 128.44 (C_{Ar}), 127.18 (C_{Ar}), 52.89 (C-6'), 52.20 (C-2'), 39.34 (C-2), 31.52 (C-3'), 23.02 (C-5').

metil (Z)-N-acetil-S-(1-(idrossimmino)-3-fenilpropil)cisteinato (5c)

In un imbuto separatore è aggiunta una soluzione di 3-fenilpropanale ossima **2c** (1.8 eq, 1.01 g, 6.7 mmol) in DCM anidro (34 ml) e una soluzione acquosa di NaOCl 14% (3 eq, 4.6 ml, 11.1 mmol). La miscela bifasica è agitata per 10 minuti e poi la fase organica è versata, attraverso un filtro di MgSO₄, in un pallone raffreddato a 0°C contenente una soluzione di metil N-acetil cisteinato **4** (1 eq, 0.66 g, 3.7 mmol) in DCM anidro (68 ml). Si aggiunge poi la trietilammina (3 eq, 1.56 ml, 11.1 mmol) e si lascia la miscela di reazione in agitazione per 3h sotto atmosfera di Argon. Passate le tre ore, si allontana il DCM al rotavapor e il grezzo di reazione è purificato mediante colonna cromatografica (etere di petrolio/ etil acetato 2/8). Il prodotto finale è ottenuto sotto forma di solido bianco con una resa del 80% (0.97 g).

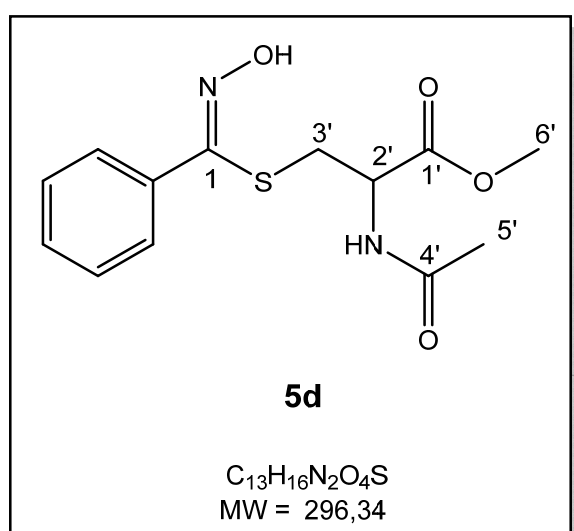


¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 8.68 (s, 1H, OH), 7.35 – 7.16 (m, 5H, H_{Ar}), 6.42 (d, J = 7.2 Hz, 1H, NH), 4.90 (m, 1H, H_{2'}), 3.77 (s, 3H, H_{6'}), 3.51 (dd, J = 13.5, 4.7 Hz, 1H, H_{3'}_a or b), 3.37 (dd, J = 13.5, 4.8 Hz, 1H, H_{3'}_b or a), 2.89 (m, 2H, H₂), 2.73 – 2.66 (m, 2H, H₃), 2.01 (s, 3H, H_{5'}).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 170.41 (C=O), 170.23 (C=O), 152.63 (C-1), 140.28 (C_{qAr}), 128.57 (C_{Ar}), 128.39 (C_{Ar}), 126.40 (C_{Ar}), 52.97 (C-6'), 52.29 (C-2'), 35.12 (C-3), 33.46 (C-2), 31.71 (C-3'), 23.01 (C-5').

metil (Z)-N-acetil-S-((idrossimmino)(fenil)metil)cisteinato (5d)

In un imbuto separatore è aggiunta una soluzione di benzaldeide ossima **2d** (1.8 eq, 0.6 g, 5.0 mmol) in DCM anidro (25 ml) e una soluzione acquosa di NaOCl 14% (3 eq, 3.4 ml, 8.4 mmol). La miscela bifasica è agitata per 10 minuti e poi la fase organica è versata, attraverso un filtro di MgSO₄, in un pallone raffreddato a 0°C contenente una soluzione di metil N-acetil cisteinato **4** (1 eq, 0.5 g, 2.8 mmol) in DCM anidro (50 ml). Si aggiunge poi la trietilammina (3 eq, 1.16 ml, 8.4 mmol) e si lascia la miscela di reazione in agitazione per 3h sotto atmosfera di Argon. Passate le tre ore, si allontana il DCM al rotavapor e il grezzo di reazione è purificato mediante colonna cromatografica (etere di petrolio/ etil acetato 2/8). Il prodotto finale è ottenuto sotto forma di liquido giallo con una resa del 74% (0.62 g).

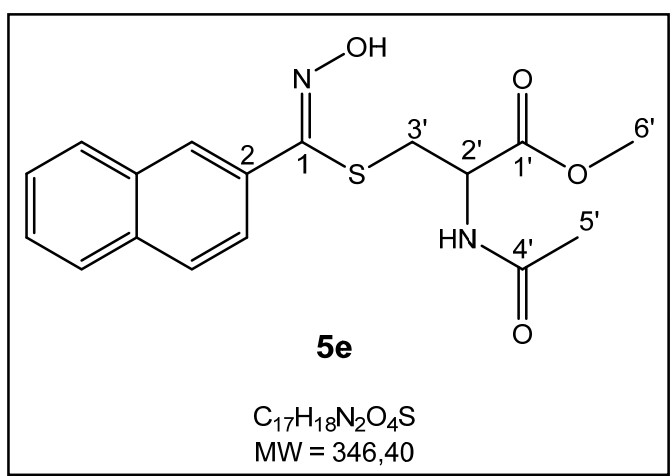


¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 11.06 (s, 1H, OH), 7.47 – 7.37 (m, 2H, H_{Ar}), 7.30 – 7.20 (m, 3H, H_{Ar}), 7.05 (d, J = 7.7 Hz, 1H, NH), 4.58 (m, 1H, H_{2'}), 3.52 (s, 3H, H_{6'}), 3.11 (dd, J = 13.9, 4.6 Hz, 1H, H_{3'a}), 3.05 (dd, J = 13.9, 5.8 Hz, 1H, H_{3'b}), 1.82 (s, 3H, H_{5'}).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ : 170.78 (C=O), 170.63 (C=O), 151.64 (C-1), 133.57 (C_{qAr}), 129.58 (C_{Ar}), 128.49 (C_{Ar}), 128.46 (C_{Ar}), 52.58 (C-6'), 52.47 (C-2'), 33.38 (C-3'), 22.62 (C-5').

metil (Z)-N-acetil-S-((idrossimmino)(naftalen-2-il)metil)cisteinato (5e)

In un imbuto separatore è aggiunta una soluzione di 2-naftaldeide ossima **2e** (1.8 eq, 1.0 g, 5.8 mmol) in DCM anidro (42 ml) e una soluzione acquosa di NaOCl 14% (3 eq, 4.0 ml, 9.7 mmol). La miscela bifasica è agitata per 10 minuti e poi la fase organica è versata, attraverso un filtro di MgSO₄, in un pallone raffreddato a 0°C contenente una soluzione di metil N-acetil cisteinato **4** (1 eq, 0.57 g, 3.2 mmol) in DCM anidro (59 ml). Si aggiunge poi la trietilammina (3 eq, 1.41 ml, 9.64 mmol) e si lascia la miscela di reazione in agitazione per 3h sotto atmosfera di Argon. Passate le tre ore, si allontana il DCM al rotavapor e il grezzo di reazione è purificato mediante colonna cromatografica (etere di petrolio/ etil acetato 3/7). Il prodotto finale è ottenuto sotto forma di solido bianco con una resa del 54% (0.61 g).



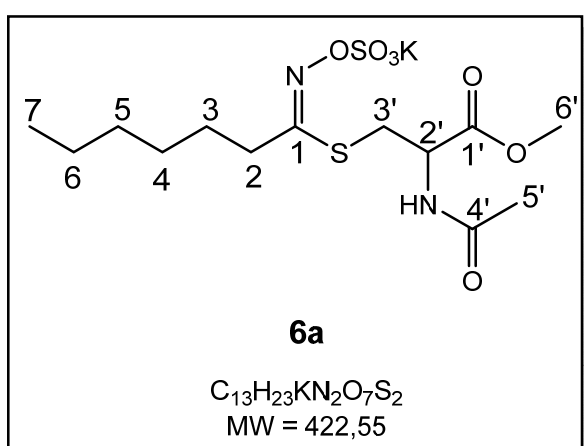
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 9.47 (s, 1H, OH), 8.13 (s, 1H, H_{Ar}), 7.87 (m, 3H, H_{Ar}), 7.70 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.58 – 7.47 (m, 2H, H_{Ar}), 6.42 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH), 4.83 – 4.75 (m, 1H, H_{2'}), 3.69 (s, 3H, H_{6'}), 3.50 (dd, *J* = 14.1, 4.5 Hz, 1H, H_{3'a}), 3.25 (dd, *J* = 14.1, 4.9 Hz, 1H, H_{3'b}), 1.92 (s, 3H, H_{5'}).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ: 170.62 (C=O), 170.20 (C=O), 152.50 (C-1), 133.91 (C_q), 132.99 (C_q), 130.88 (C_q), 128.66 (C_{Ar}), 128.59 (C_{Ar}), 128.52 (C_{Ar}), 127.75 (C_{Ar}), 127.23 (C_{Ar}), 126.73 (C_{Ar}), 125.04 (C_{Ar}), 52.85 (C-6'), 52.64 (C-2'), 34.01 (C-3'), 22.95 (C-5').

- TIOIDROSSIMATI O-SOLFATATI

potassio (Z)-(1-((2-acetammide-3-metossi-3-ossopropil)tio)eptilidene)ammino solfato (6a)

Il metil (Z)-N-acetil-S-(1-(idrossimmino)eptil)cisteinato **5a** (1 eq, 0.11 g, 0.36 mmol) viene disciolto in CH₃CN (3.3 ml) sotto atmosfera di Argon e poi fatto reagire con un eccesso di PyrSO₃ (5 eq, 0.28 g, 1.80 mmol) mantenendo il tutto in agitazione a 50°C. Dopo 1h la miscela di reazione è stata raffreddata a 0°C in un bagno di ghiaccio e si è aggiunta una soluzione acquosa di KHCO₃ (5 eq, 0.18 g, 1.80 mmol). Terminata l'aggiunta, si è tolto il bagno di ghiaccio, si è lasciata la miscela in agitazione per 30 minuti. Il solvente viene quindi rimosso al rotavapor e il grezzo di reazione così ottenuto viene purificato tramite colonna cromatografica (metanolo/etil acetato 1/9). La resa è stata del 42% (0.064 g).

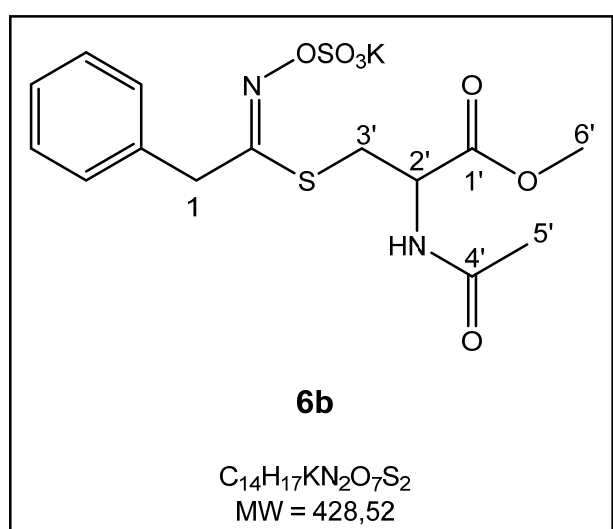


¹H NMR (250 MHz, Acetone-d₆) δ (ppm): 7.90 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH), 4.75 (m, 1H, H_{2'}), 3.73 (s, 3H, H_{6'}), 3.46 (dd, *J* = 13.7, 5.0 Hz, 1H, H_{3'} a or b), 3.31 (dd, *J* = 13.7, 7.8 Hz, 1H, H_{3'} b or a), 2.59 (m, 2H, H₂), 2.01 (s, 3H, H_{5'}), 1.60 (m, 2H, H₃), 1.44 - 1.24 (m, 6H, H_{4,5,6}), 0.94 - 0.81 (m, 3H, H₇).

HRMS (ESI⁻): m/z calculated for C₁₃H₂₃N₂O₇S₂ ([M]⁻) = 383.095979, found: 383.095217

potassio(*Z*)-(1-((2-acetammide-3-metossi-3-ossopropil)tio)-2-feniletidene)ammino solfato (**6b**)

Il metil (*Z*)-*N*-acetil-S-(1-(idrossimmino)-2-feniletil)cisteinato **5b** (1 eq, 0.10 g, 0.32 mmol) viene disciolto in CH₃CN (3.2 ml) sotto atmosfera di Argon e poi fatto reagire con un eccesso di PyrSO₃ (5 eq, 0.25 g, 1.60 mmol) mantenendo il tutto in agitazione a 50°C. Dopo 1h la miscela di reazione è stata raffreddata a 0°C in un bagno di ghiaccio e nel mentre si è aggiunta una soluzione acquosa di KHCO₃ (5 eq, 0.16 g, 1.60 mmol). Terminata l'aggiunta, si è tolto il bagno di ghiaccio, si è lasciata la miscela in agitazione per 30 minuti. Il solvente viene quindi rimosso al rotavapor e il grezzo di reazione cos' ottenuto viene purificato tramite colonna cromatografica (metanolo/etil acetato 1/9). La resa è stata del 52% (0.072 g).

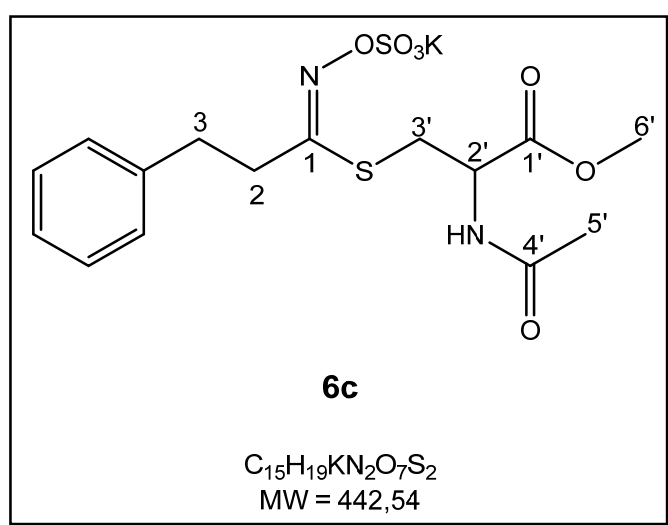


¹H NMR (250 MHz, Acetone-d₆) δ: 7.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH), 7.41 – 7.18 (m, 5H, H_{Ar}), 4.61 (td, *J* = 7.9, 5.0 Hz, 1H, H_{2'}), 4.05 (dd, 2H, H₁) 3.65 (s, 3H, H_{6'}), 3.25 (dd, *J* = 13.7, 5.1 Hz, 1H, H_{3'a or b}), 3.14 – 3.05 (m, 1H, H_{3'b or a}), 1.97 (s, 3H, H₅).

HRMS (ESI⁻): *m/z* calculated for ([M]⁻): 389.04772, found: 389.0491

potassio(Z)-(1-((2-acetammide-3-metossi-3-ossopropil)tio)-3-fenilpropilidene)ammino solfato (6c)

Il metil (Z)-N-acetil-S-(1-(idrossimmino)-3-fenilpropil)cisteinato **5c** (1 eq, 0.11 g, 0.34 mmol) viene disciolto in CH₃CN (3.1 ml) sotto atmosfera di Argon e poi fatto reagire con un eccesso di PyrSO₃ (5 eq, 0.27 g, 1.70 mmol) mantenendo il tutto in agitazione a 50°C. Dopo 1h la miscela di reazione è stata raffreddata a 0°C in un bagno di ghiaccio e nel mentre si è aggiunta una soluzione acquosa di KHCO₃ (5 eq, 0.17 g, 1.70 mmol). Terminata l'aggiunta, si è tolto il bagno di ghiaccio, si è lasciata la miscela in agitazione per 30 minuti. Il solvente viene quindi rimosso al rotavapor e il grezzo di reazione così ottenuto viene purificato tramite colonna cromatografica (metanolo/etil acetato 1/9). La resa è stata del 53% (0.08 g).

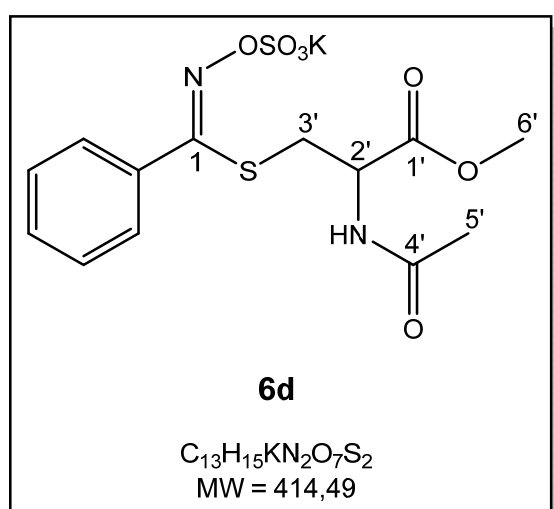


¹H NMR (250 MHz, Acetone-d₆) δ: 7.86 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH), 7.38 – 7.14 (m, 5H, H_{Ar}), 4.76 (td, *J* = 7.9, 4.8 Hz, 1H, H_{2'}), 3.69 (s, 3H, H_{6'}), 3.55 – 3.44 (m, 1H, H_{3' a or b}), 3.34 (dd, *J* = 13.6, 7.8 Hz, 1H, H_{3' b or a}), 2.99 – 2.77 (m, 4H, H_{2,3}), 1.99 (s, 3H, H_{5'}).

HRMS (ESI⁻): *m/z* calculated for C₁₅H₁₉N₂O₇S₂ ([M]⁻) = 403.064560, found: 403.063917

potassio (Z)-(((2-acetammide-3-metossi-3-ossopropil)tio)(fenil)metilene)ammino solfato (6d)

Il metil (Z)-N-acetil-S-((idrossimmينو)(fenil)metil)cisteinato **5d** (1 eq, 0.11 g, 0.37 mmol) viene disciolto in CH₃CN (3.5 ml) sotto atmosfera di Argon e poi fatto reagire con un eccesso di PyrSO₃ (5 eq, 0.29 g, 1.85 mmol) mantenendo il tutto in agitazione a 50°C. Dopo 18h la miscela di reazione è stata raffreddata a 0°C in un bagno di ghiaccio e nel mentre si è aggiunta una soluzione acquosa di KHCO₃ (5 eq, 0.18 g, 1.85 mmol). Terminata l'aggiunta, si è tolto il bagno di ghiaccio, si è lasciata la miscela in agitazione per 30 minuti. Il solvente viene quindi rimosso al rotavapor e il grezzo di reazione così ottenuto viene purificato tramite colonna cromatografica (metanolo/etil acetato 1/9). La resa è stata del 34% (0.053 g).

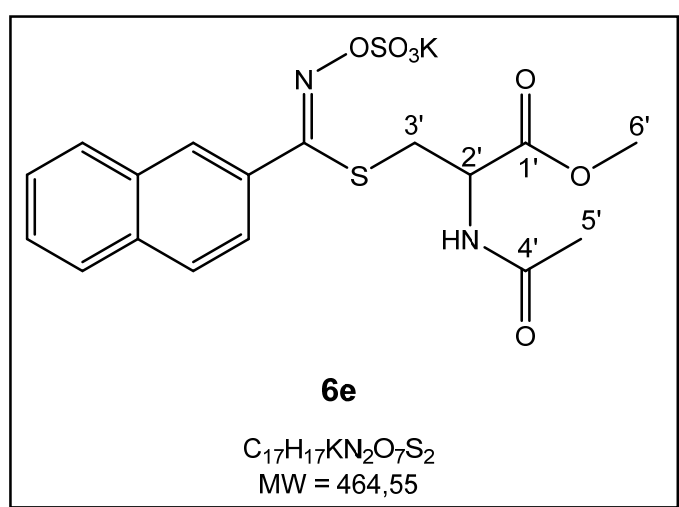


¹H NMR (250 MHz, Acetone-d₆) δ: 7.75 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 7.67 – 7.60 (m, 2H, H_{Ar}), 7.51 – 7.41 (m, 3H, H_{Ar}), 4.68 – 4.55 (m, 1H, H_{2'}), 3.63 (d, *J* = 1.7 Hz, 3H, H_{6'}), 3.22 (dd, *J* = 6.0, 2.5 Hz, 2H, H_{3'}), 1.93 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H, H_{5'}).

HRMS (ESI⁻): *m/z* calculated for C₁₃H₁₅N₂O₇S₂ ([M]⁻) = 375.033045, found: 375.032616

potassio (Z)-(((2-acetammide-3-metossi-3-ossopropil)tio)(naftalen-2-il)metilene)ammino solfato (6e)

Il metil (Z)-N-acetil-S-((idrossimmينو)(naftalen-2-il)metil)cisteinato **5e** (1 eq, 0.10 g, 0.29 mmol) viene disciolto in CH₃CN (3 ml) sotto atmosfera di Argon e poi fatto reagire con un eccesso di PyrSO₃ (5 eq, 0.23 g, 1.45 mmol) mantenendo il tutto in agitazione a 50°C. Dopo 1h la miscela di reazione è stata raffreddata a 0°C in un bagno di ghiaccio e nel mentre si è aggiunta una soluzione acquosa di KHCO₃ (5 eq, 0.14 g, 1.45 mmol). Terminata l'aggiunta, si è tolto il bagno di ghiaccio, si è lasciata la miscela in agitazione per 30 minuti. Il solvente viene quindi rimosso al rotavapor e il grezzo di reazione così ottenuto viene purificato tramite colonna cromatografica (metanolo/etil acetato 2/8). La resa è stata del 40% (0.055 g).



¹H NMR (250 MHz, Acetone-d₆) δ: 8.16 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.04 – 7.90 (m, 3H, H_{Ar}), 7.71 (dd, *J* = 8.6, 1.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.60 – 7.52 (m, 2H, H_{Ar}), 4.68 – 4.55 (m, 1H, H_{2'}), 3.57 (s, 3H, H_{6'}), 3.35 (dd, *J* = 13.7, 5.1 Hz, 1H, H_{3' a or b}), 3.19 (dd, *J* = 13.7, 7.4 Hz, 1H, H_{2 b or a}), 1.94 (s, 3H, H_{5'}).

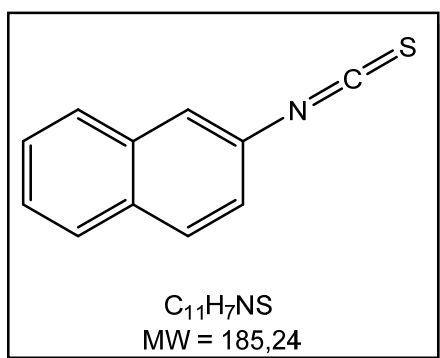
Il segnale del protone ammidico non è riportato perchè non chiaramente visibile in quanto nascosto dai protoni aromatici.

Il prodotto è stato caratterizzato solo all'¹H-NMR, sono necessarie ulteriori analisi per confermare la struttura.

- ISOTIOCIANATI

2-isotiocianatonaftalene

Il metil (*Z*)-*N*-acetil-*S*-((idrossimmino)(naftalen-2-il)metil)cisteinato (1 eq, 0.18 g, 0.39 mmol) è sciolto in 2 ml di THF anidro. Sono quindi aggiunti il tBuOK (1 eq, 0.044 g, 0.39 mmol), l'etantiolo (1 eq, 0.39 mmol, 0.03 ml) e per ultima la NEt₃ (3 eq, 1.17 mmol, 0.17 ml). La miscela di reazione è lasciata in agitazione per 3h a temperatura ambiente, sotto atmosfera di Argon; il grezzo di reazione è stato purificato tramite colonna cromatografica (etere di petrolio/etil acetato 2/8).



¹H NMR (250 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 8.27 – 8.21 (m, 1H, H_{Ar}), 7.96 – 7.86 (m, 3H, H_{Ar}), 7.71 – 7.56 (m, 3H, H_{Ar})

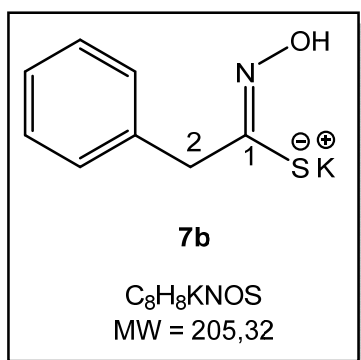
Dall'analisi 1H-NMR risultano solo i segnali dei protoni aromatici e non quelli dell'etile derivante dall'etantiolo. Si è arrivati a concludere che quanto ottenuto non fosse il prodotto della addizione nucleofila, ma l'isotiocianato.

La resa finale è stata quindi calcolata sull'isotiocianato ed è risultata essere del 39% (0.028 g).

- SALE DELL'ACIDO TIOIDROSSAMICO

potassio (Z)-N-idrossi-2-feniletanimmidetiolato (7b)

Il tBuOK (3 eq, 1.00 g, 8.7 mmol) è aggiunto ad una soluzione di metil (Z)-N-acetil-S-(1-(idrossimmino)-2-feniletil)cisteinato **5b** (1 eq, 0.9 g, 2.9 mmol) in THF (15 ml). La miscela di reazione è lasciata in agitazione per 18h a temperatura ambiente e sotto atmosfera di Argon. Si è poi allontanato il solvente al rotavapor e il grezzo di reazione è stato purificato mediante colonna cromatografica a fase inversa C-18 (eluente metanolo/acqua) ottenendo il sale del tioidrossimato come solido giallo con una resa del 20% (0.12 g).



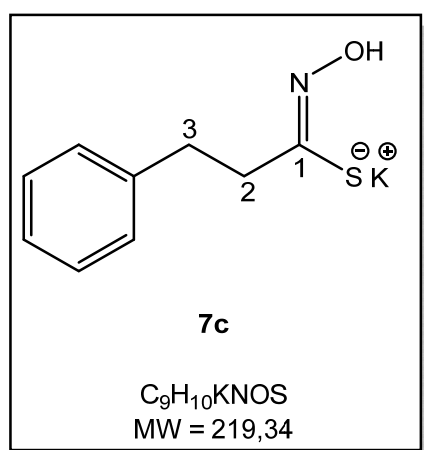
1H NMR (250 MHz, Methanol- d_4) δ (ppm): 7.41 – 7.11 (m, 5H, H_{Ar}), 3.76 (s, 2H, H_2).

HRMS (ESI⁺): m/z calculated for $C_8H_{10}NOS$ ($[M+H]^+$) = 168,047801, found: 168,047761

HRMS (ESI⁻): m/z calculated for C_8H_8NOS ($[M]^-$) = 166,033691, found: 166,033208

potassio (Z)-N-idrossi-3-fenilpropanimmidetioloato (7c)

Il tBuOK (3 eq, 1.05 g, 9.3 mmol) è aggiunto ad una soluzione di metil (Z)-N-acetil-S-(1-(idrossimmino)-3-fenilpropil)cisteinato **5c** (1 eq, 1.05 g, 3.1 mmol) in THF (16 ml). La miscela di reazione è lasciata in agitazione per 18h a temperatura ambiente e sotto atmosfera di Argon. Si è poi allontanato il solvente al rotavapor e il grezzo di reazione è stato purificato mediante colonna cromatografica a fase inversa C-18 (eluente metanolo/acqua) ottenendo il sale del tioidrossimato come solido giallo con una resa del 54% (0.37 g).



¹H NMR (400 MHz, Deuterium Oxide) δ (ppm): 7.35 (m, 5H, H_{Ar}), 3.01 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H₂), 2.73 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H₃).

¹³C NMR (101 MHz, Deuterium Oxide) δ 171.17 (C-1), 141.73 (C_{qAr}), 128.65 (C_{Ar}), 128.54 (C_{Ar}), 126.12 (C_{Ar}), 41.77 (C-3), 33.76 (C-2).

HMRS (ESI⁺): m/z calculated for C₉H₁₂NOS ([M+H]⁺) = 182.063047, found: 182.063411

HRMS (ESI⁻): m/z calculated for C₉H₁₀NO₄S ([M]⁻) = 228,033675, found: 228,033602