



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI FARMACIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE MOLECOLARI  
INDIRIZZO IN SCIENZE FARMACEUTICHE  
XX CICLO

SINTESI DI NUOVI INIBITORI DELLA TOPOISOMERASI II E  
DELLA PROTEINCHINASI CK2 CON POTENZIALE ATTIVITÀ  
ANTITUMORALE

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

Supervisore: Ch.mo Prof. Adriano Guiotto

Correlatore: Ch.mo Prof. Adriana Chilin

Dottorando: Samuele Zanatta

31 Gennaio 2008

# INDICE

<b>1.</b>	<b>RIASSUNTO</b>	Pg. 1
<b>2.</b>	<b>ABSTRACT</b>	Pg. 3
<b>3.</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	Pg. 5
<b>3.1</b>	<b>LE TOPOISOMERASI</b>	Pg. 3
3.1.1	INIBITORI DELLE TOPOISOMERASI	Pg. 8
3.1.2	MODELLO DI INTERAZIONE DEL COMPLESSO DNA-ENZIMA	Pg. 9
3.1.3	INIBIZIONE DELLA TOPOISOMERASI E APOPTOSI	Pg. 11
<b>3.2</b>	<b>LA PROTEINCHINASI CK2</b>	Pg. 13
3.2.1	INIBITORI DELLA CK2	Pg. 14
<b>3.3</b>	<b>SINTESI ORGANICA ASSISTITA DA MICROONDE</b>	Pg. 17
3.3.1	AZIONE DELLE MICROONDE	Pg. 18
3.3.2	MICROONDE SINGLE-MODE E MULTIPLE- MODE	Pg. 21
<b>4.</b>	<b>OBIETTIVO</b>	Pg. 23
<b>5.</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	Pg. 27
<b>5.1</b>	<b>SINTESI DI POTENZIALI INIBITORI DELLA TOPOISOMERASI II</b>	Pg. 27
3.1.1	SINTESI DELLE CATENE LATERALI <i>N</i> -(4- AMINOFENIL)-METANSOLFONAMIDICHE	Pg. 28
3.1.2	SINTESI DI <i>N</i> -[4-(BENZOCHINAZOLIN-6- ILAMINO)FENIL]-METANSOLFONAMIDI	Pg. 29
<b>5.2</b>	<b>SINTESI DI POTENZIALI INIBITORI DELLA PROTEINCHINASI CK2</b>	Pg. 32
3.2.1	SINTESI DI POTENZIALI INIBITORI DI CK2 CON NUCLEO CHINOLINONICO	Pg. 32

5.2.2	SINTESI DI POTENZIALI INIBITORI DI CK2 CON NUCLEO CUMARINICO	Pg. 35
5.2.2.1	SOSTITUZIONI NELLE POSIZIONI 6 ED 8 DEL NUCLEO CUMARINICO	Pg. 35
5.2.2.2	SOSTITUZIONI NELLA POSIZIONE 7 DEL NUCLEO CUMARINICO	Pg. 39
5.2.2.3	SOSTITUZIONI NELLA POSIZIONE 4 DEL NUCLEO CUMARINICO	Pg. 43
<b>5.3</b>	<b>DATI BIOLOGICI</b>	Pg. 57
5.3.1	NUOVI INIBITORI DELLA TOPOISOMERASI II	Pg. 57
5.3.2	NUOVI INIBITORI DELLA PROTEINCHINASI CK2	Pg. 58
5.3.3	SAGGI IN ASSOCIAZIONE	Pg. 62
<b>6.</b>	<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	Pg. 67
6.1	MATERIALI	Pg. 67
6.2	STRUMENTAZIONE	Pg. 67
6.3	METODI	Pg. 68
6.3.1	SINTESI DI NUOVI INIBITORI DELLA TOPOISOMERASI II	Pg. 68
6.3.1.1	SINTESI DI <i>N</i> -(4-AMINOFENIL)- METANSOLFONAMIDE	Pg. 68
6.3.1.2	SINTESI DI <i>N</i> -(4-AMINO-3- METOSSIFENIL)-METANSOLFONAMIDE	Pg. 70
6.3.1.3	SINTESI DI <i>N</i> -[4-(BENZO[ <i>h</i> ]CHINAZOLIN-6- ILAMINO)FENIL]METANSOLFONAMIDI	Pg. 72
6.3.1.4	SINTESI DI <i>N</i> -[4-(BENZO[ <i>f</i> ]CHINAZOLIN-6- ILAMINO)FENIL]METANSOLFONAMIDI	Pg. 81
6.3.2	SINTESI DI NUOVI INIBITORI CHINOLINONICI DI CK2	Pg. 88
6.3.2.1	ALOGENAZIONE DI 7-IDROSSI-4- METILCHINOLIN-2-ONE	Pg. 88
6.3.2.2	BROMURAZIONE DI 7-IDROSSI-4,6- DIMETILCHINOLIN-2-ONE	Pg. 102
6.3.3	SINTESI DI NUOVI INIBITORI CUMARINICI DI CK2	Pg. 106
6.3.3.1	SINTESI DI 7-IDROSSI-4-METILCUMARINE SOSTITUITE IN POSIZIONE 6 ED 8	Pg. 106
6.3.3.2	SINTESI DI BROMO-4-METILCUMARINE SOSTITUITE IN POSIZIONE 7	Pg. 135

**7. BIBLIOGRAFIA** Pg. 217

## INDICE DELLE FIGURE

Figura 1	Struttura dei potenziali inibitori della Topoisomerasi II a struttura benzochinazolinica.	Pg. 1
Figura 2	Struttura dei composti chinolinonici sintetizzati.	Pg. 2
Figura 3	Struttura dei composti cumarinici sintetizzati.	Pg. 2
Figura 4	Ciclo catalitico della Topoisomerasi II.	Pg. 7
Figura 5	Strutture di alcuni farmaci antitopoisomerasici.	Pg. 9
Figura 6	Complesso covalente Top2-DNA e ingrandimento della regione d' interazione.	Pg. 10
Figura 7	Modello di intercalazione della <i>m</i> -Amsacrina nel complesso covalente Top2-DNA.	Pg. 11
Figura 8	Meccanismi di attivazione di apoptosi in seguito a formazione di complesso covalente tra Topoisomerasi e DNA.	Pg. 12
Figura 9	Struttura dell'Emodina.	Pg. 15
Figura 10	Struttura della Quercetina e della Fisetina.	Pg. 15
Figura 11	Struttura di TBB (4,5,6,7-tetrabromo-1 <i>H</i> -benzotriazolo).	Pg. 16
Figura 12	Struttura della DBC (3,8-dibromo-7-idrossi-4-metilcumarina).	Pg. 16
Figura 13	Spettro elettromagnetico.	Pg. 17
Figura 14	Illustrazione schematica del riscaldamento <i>in-situ</i> dovuto alle microonde.	Pg. 18

Figura 15	Andamento dell'onda elettromagnetica dovuta a microonde.	Pg. 19
Figura 16	Effetto del riscaldamento MW sulla costante cinetica di reazione.	Pg. 20
Figura 17	Reattore monomodale self-tuning.	Pg. 21
Figura 18	Schematizzazione del sistema di raffreddamento.	Pg. 22
Figura 19	Struttura di Amsacrina e <i>m</i> -Amsacrina.	Pg. 23
Figura 20	Spettroscopia NMR della miscela di 3,8-dibromo-4-clorometil-7-idrossicumarina e 3,8-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina.	Pg. 48
Figura 21	Spettroscopia HMRS in negativo della miscela di 3,8-dibromo-4-clorometil-7-idrossicumarina e 3,8-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina.	Pg. 49
Figura 22	Spettro NOESY di 7-idrossi-4-metossicumarina: cross-peak tra i segnali del metossile in 4 e del protone in 3.	Pg. 51
Figura 23	Spettro NOESY di 7-idrossi-4-metossicumarina: cross-peak tra il segnale dell'ossidrile in 7 ed i segnali dei protoni in 6 ed 8.	Pg. 51

## INDICE DEGLI SCHEMI

Schema 1	Sintesi di <i>N</i> -(4-aminofenil)-metansolfonamide.	Pg. 28
Schema 2	Sintesi di <i>N</i> -(4-amino-3-metossifenil)-metansolfonamide.	Pg. 29
Schema 3	Sintesi di <i>N</i> -[4-(benzo[ <i>h</i> ]chinazolin-6-ilamino)fenil]-metansolfonamidi.	Pg. 30
Schema 4	Sintesi di <i>N</i> -[4-(benzo[ <i>f</i> ]chinazolin-6-ilamino)fenil]-metansolfonamidi.	Pg. 31
Schema 5	Sintesi di 7-idrossi-4-metilchinolin-2-one.	Pg. 32
Schema 6	Sintesi di bromoderivati 4-metil-7idrossichinolinonici.	Pg. 33

Schema 7	Sintesi di iododerivati 4-metil-7-idrossichinolinonici.	Pg. 34
Schema 8	Sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4,6-dimetilchinolin-2-one.	Pg. 34
Schema 9	Sintesi di derivati cumarinici come inibitori CK2.	Pg. 39
Schema 10	Sintesi di bromoderivati della 6,7-diidrossi-4-metilcumarina.	Pg. 38
Schema 11	Sintesi di bromoderivati 7,8-diidrossicumarinici.	Pg. 39
Schema 12	Sintesi di 7-amino-3,8-dibromo-4-metilcumarina.	Pg. 40
Schema 13	Sintesi di bromocumarine 7-sostituite.	Pg. 41
Schema 14	Sintesi di 3,8-dibromo-4-metil-7-tiocumarina.	Pg. 42
Schema 15	Sintesi di bromoderivati 4,7-diidrossicumarinici.	Pg. 43
Schema 16	Sintesi di bromocumarine non sostituite in posizione 4.	Pg. 44
Schema 17	Sintesi di bromoderivati 4-etil-7-idrossicumarinici.	Pg. 45
Schema 18	Sintesi di bromo-4-bromometilcumarine e bromo-4-idrossimetilcumarine.	Pg. 46
Schema 19	Sintesi di bromo-4-clorometilcumarine e bromo-4-idrossimeticumarine.	Pg. 47
Schema 20	Sintesi di bromo-4-metossicumarine.	Pg. 50
Schema 21	Sintesi di bromo-4-trifluorometilcumarine.	Pg. 52
Schema 22	Tentativo di sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina.	Pg. 53
Schema 23	Sintesi di 2-bromoresorcinolo.	Pg. 53
Schema 24	Tentativo di sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina.	Pg. 54
Schema 25	Tentativo di sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina.	Pg. 55

## INDICE DELLE TABELLE

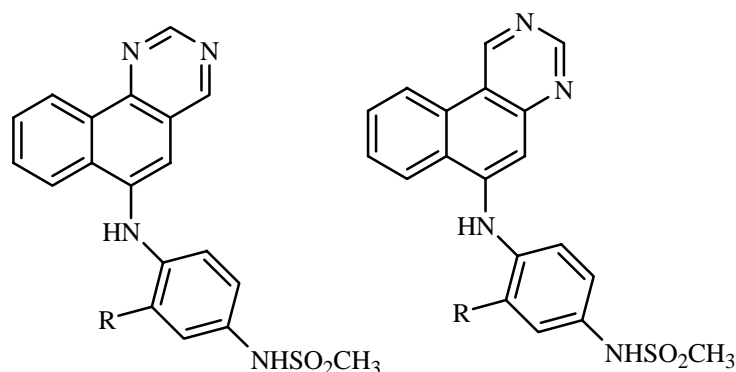
Tabella 1	Confronto sintesi convenzionale <i>vs.</i> sintesi assistita da microonde.	Pg. 36
Tabella 2	Citotossicità <i>in vitro</i> dei nuovi inibitori della Topoisomerasi II.	Pg. 58
Tabella 3	Confronto dell'attività inibitoria su CK2 tra i composti chinolinonici sintetizzati ed alcuni analoghi cumarinici.	Pg. 59
Tabella 4	Confronto dell'attività inibitoria su CK2 tra composti bromocumarinici 4-metil sostituiti e 4-metossi sostituiti.	Pg. 60
Tabella 5	Citotossicità <i>in vitro</i> dei nuovi inibitori di CK2.	Pg. 61

# 1. RIASSUNTO

Nell'ambito della ricerca di nuove molecole da utilizzare in terapia antitumorale, una particolare importanza riveste la classe degli inibitori delle Topoisomerasi, enzimi ubiquitari in grado di controllare lo stato topologico del DNA, mediante un meccanismo di taglio e richiusura della doppia elica. Questi enzimi si classificano in Topoisomerasi I (tagliano un solo filamento di DNA) e Topoisomerasi II (tagliano contemporaneamente entrambi i filamenti), svolgono un ruolo fondamentale per la vita cellulare e sono il bersaglio di molti dei farmaci antitumorali usati oggi nella pratica clinica. Altro bersaglio attualmente molto studiato per nuovi farmaci antitumorali è la proteinchinasi CK2, enzima fosforilante che riveste un ruolo fondamentale nella trasduzione dei segnali di sopravvivenza cellulare. Da recenti studi si sono evidenziate interazioni tra Topoisomerasi II e CK2 che si inseriscono nei percorsi apoptotici che portano alla morte cellulare programmata. E' stato quindi studiato come gli inibitori delle Topoisomerasi e di CK2 possano agire in modo sinergico nei confronti della vitalità delle cellule tumorali, considerando anche che la terapia dei tumori è solitamente multicomponente.

Il programma di ricerca si è quindi sviluppato secondo due linee principali:

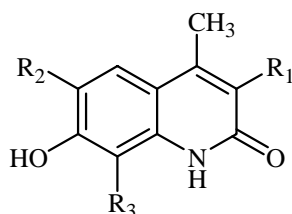
1. Sintesi di nuovi inibitori della Topoisomerasi II (Figura 1) a struttura ibrida, aventi cioè un nucleo policiclico planare benzochinazolinico derivatizzato con il residuo metansolfonamidoanilिनico proprio dell'Amsacrina, noto inibitore della Topoisomerasi II.



**Figura 1.** Struttura dei potenziali inibitori della Topoisomerasi II a struttura benzochinazolinica.  
R= H, OCH<sub>3</sub>.



2. Sintesi di nuovi inibitori di proteinchinasi CK2 a struttura chinolinonica (Figura 2) e cumarinica (Figura 3) progettati sulla base dei requisiti sterici ed elettronici di noti inibitori competitivi del substrato fosfodonnatore (ATP o GTP).

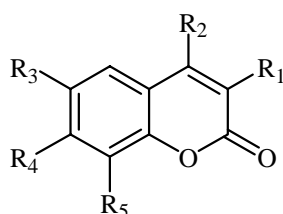


R<sub>1</sub> = H, Br.

R<sub>2</sub> = H, CH<sub>3</sub>, Br.

R<sub>3</sub> = I, Br.

**Figura 2.** Struttura dei composti chinolinonici sintetizzati.



R<sub>1</sub> = H, Br.

R<sub>2</sub> = H, CH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>Cl, CH<sub>2</sub>Br, OH, OCH<sub>3</sub>.

R<sub>3</sub> = H, CH<sub>3</sub>, OH, NO<sub>2</sub>, Br.

R<sub>4</sub> = OH, NH<sub>2</sub>, OCH<sub>3</sub>, OCOCH<sub>3</sub>, SH.

R<sub>5</sub> = H, CH<sub>3</sub>, CHO, CH=NOH, CN, OH, NO<sub>2</sub>, Br.

**Figura 3.** Struttura dei composti cumarinici sintetizzati.

I composti progettati sono stati preparati utilizzando sia metodi di sintesi convenzionali sia metodi di sintesi assistita da microonde e tutti i composti sono stati caratterizzati tramite <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR e HRMS. La purezza dei campioni inviati ai saggi biologici è stata determinata mediante analisi elementare.

I potenziali agenti antitopoisomerasici sintetizzati sono stati saggati sulla Topoisomerasi II. Sulla libreria di potenziali inibitori CK2 sono stati effettuati dei saggi di inibizione sull'enzima isolato e con i dati ottenuti si sono potute fare delle considerazioni struttura-attività tra i nuovi composti preparati e quelli riportati in letteratura. I composti più attivi sui rispettivi enzimi bersaglio sono stati saggati su linee di cellule tumorali per valutarne la citotossicità.

## 2. ABSTRACT

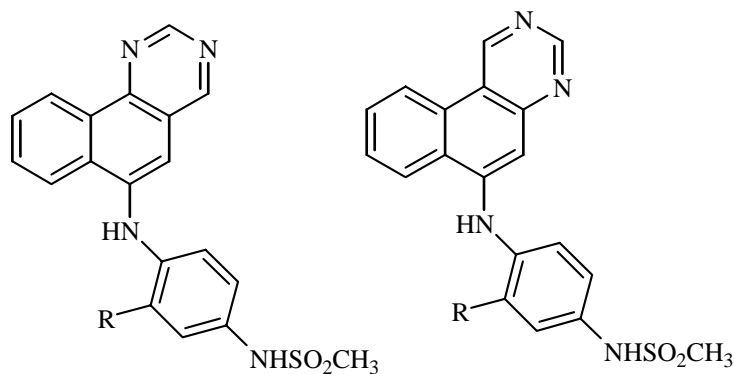
The Topoisomerase inhibitors play an essential role in the research of new molecules useful in the antitumor therapy. Topoisomerases are enzymes that regulate the topology of the DNA macromolecule. There are two type of Topoisomeases: Type I are enzymes that cleave single strand of DNA, type II cleaves both strands of DNA and they play an essential role on the cell life. The Topoisomerases are the targets of many antitumor agents currently used in the clinical practice.

Proteinkinase CK2 is another interesting target for the potential anti-neoplastic drugs. CK2 is a messenger-independent kinase that plays an essential role in cell growth and proliferation.

Some studies underline the interaction between Topoisomerase II and proteinkinase CK2 as CK2 is involved in the control of Topo II activity and programmed cell death (apoptosis). The synergism between Topoisomerase II inhibitors and CK2 inhibitors was studied considering that usually the treatment of cancer is a multicomponent therapy.

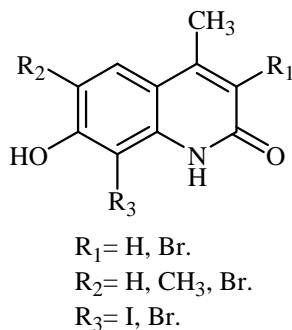
The research was developed with two goals:

1. The synthesis of new Topoisomerase II inhibitors (Figure 1) represented by molecular hybrid obtained by functionalization of planar benzoquinazolinic system substituted by methanesulfonamidoanilinic chain of Amsacrine, known drug Topo II inhibitors.

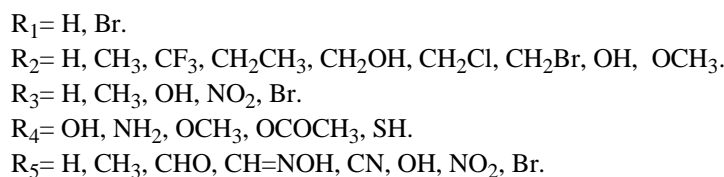
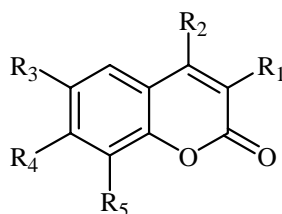


**Figure 1.** Structure of synthesized compounds as Topoisomerase II inhibitors.  
R= H, OCH<sub>3</sub>.

2. The synthesis of new quinolinone proteinkinase CK2 inhibitors (Figure 2) and coumarin proteinkinase CK2 inhibitors (Figure 3).



**Figure 2.** Structure of synthesized quinolinone compounds.



**Figure 3.** Structure of synthesized coumarin compounds.

The compounds were synthesized by conventional synthesis or by microwave assisted methods. All the compounds were characterised by  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  and HRMS.

The production of high purity compounds was determined by elementary analysis.

The potential Topoisomerase II inhibitors were examined on Topoisomerase II enzyme. From the tests performed on isolated CK2 enzyme a structure-activity relationship was made comparing the data obtained with new CK2 inhibitors and those already reported in literature.

The most active compounds were examined for their cytotoxic properties in a panel of human tumor cell lines.

### **3. INTRODUZIONE**

Per il trattamento dei tumori esistono tre diversi possibili tipi di trattamento: l'asportazione chirurgica, la radioterapia e la chemioterapia.

La chemioterapia costituisce il principale metodo di trattamento solamente per alcuni tumori, viene invece sempre più utilizzata in associazione alla chirurgia o alla radioterapia.

Le scarse differenze biochimiche tra le cellule neoplastiche e quelle sane rappresentano un limite importante nell'impiego farmacologico di molte molecole citotossiche.

Poiché numerose sostanze attualmente usate in clinica per la terapia antitumorale sono molecole che interagiscono con il DNA, risulta sempre molto interessante approfondire il loro meccanismo di azione per renderle più selettive nei confronti delle cellule tumorali. Spesso i farmaci non producono un danno alla cellula solo per interazione con il DNA: la loro azione si esplica impedendo o alterando i normali processi biologici mediati da enzimi strettamente connessi con il DNA. È perciò molto importante approfondire le conoscenze sui meccanismi d'azione di farmaci che agiscono secondo queste modalità, in modo da poter ottenere molecole sempre più selettive nei confronti delle cellule tumorali.

Tra i diversi farmaci ad azione antitumorale, particolare importanza rivestono gli inibitori delle Topoisomerasi ed in prospettiva quelli delle CK2 (caseinchinasi).

#### **3.1 LE TOPOISOMERASI**

Le Topoisomerasi sono enzimi ubiquitari, in grado di controllare lo stato topologico del DNA, mediante un meccanismo di taglio e richiusura della doppia elica<sup>1</sup>. Tale loro azione li rende indispensabili nei processi di duplicazione, trascrizione, ricombinazione e riparo, oltre che nella formazione e nella segregazione dei cromosomi durante la divisione cellulare. Il DNA, infatti, non è una struttura statica, ma è libero di muoversi nello spazio fluido della cellula,

assumendo varie conformazioni topologiche. Inoltre, tutti i processi cellulari che comportano uno scorrimento di complessi proteici sul DNA alterano la sua struttura nello spazio torcendolo, srotolandolo o creando delle regioni di superavvolgimento del tutto simili a quelle che può assumere una corda od un elastico. Tutte le transizioni conformazionali che il DNA compie in questi processi sono controllati dalle Topoisomerasi<sup>2</sup>.

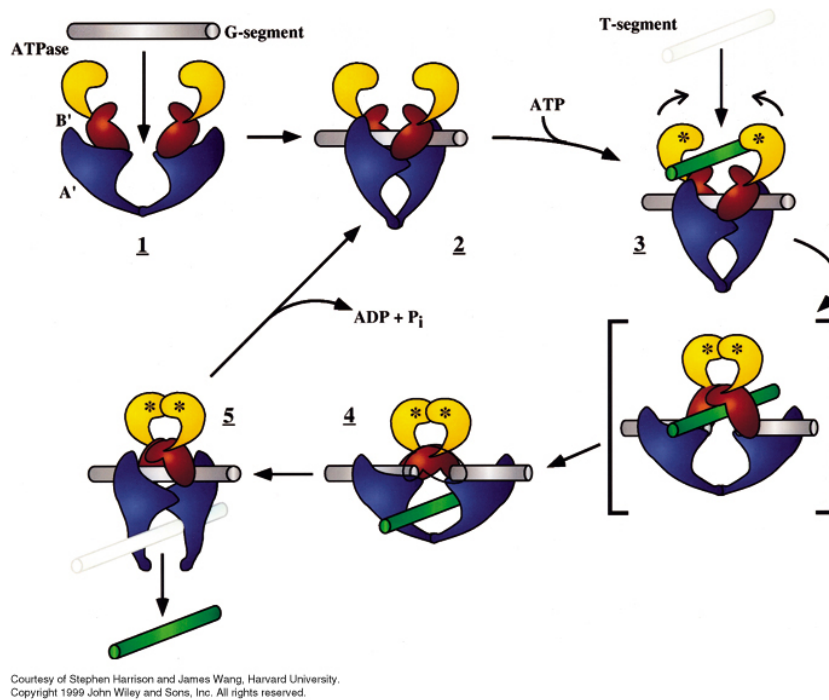
Questi enzimi sono divisi in due classi, a seconda del loro meccanismo d'azione:

- ✓ **Topoisomerasi I:** sono enzimi monomerici che tagliano un solo filamento di DNA, senza utilizzo di ATP, rilassando il DNA di un giro alla volta<sup>3</sup>;
- ✓ **Topoisomerasi II:** sono enzimi costituiti da due o più subunità e sono in grado di tagliare entrambi i filamenti di DNA, mediante l'utilizzo di ATP<sup>4</sup>.

Gli inibitori delle Topoisomerasi II sono in grado di interferire con il ciclo cellulare in diversi punti<sup>5</sup>, e per comprendere le basi su cui poggia il meccanismo di inibizione operato da questi farmaci, è opportuno conoscere il ciclo catalitico di rottura e rinsaldamento operato dagli enzimi.

L'azione delle Topoisomerasi II si esplica in più passaggi (Figura 4):

1. riconoscimento da parte dell'enzima di specifiche zone del DNA;
2. formazione di un legame covalente tra un residuo tirosinico dell'enzima e un 5'-fosfato del DNA, in presenza di ioni  $Mg^{2+}$ , che consente la rottura del filamento;
3. passaggio attraverso l'apertura di un secondo filamento del DNA;
4. rinsaldamento del filamento interrotto;
5. ripristino della forma attiva dell'enzima.



**Figura 4.** Ciclo catalitico della Topoisomerasi II.

L'energia necessaria a ricostruire la catena polinucleotidica è conservata nel legame tra l'enzima ed il filamento interrotto. L'ATP, inoltre, viene utilizzata dall'enzima per indurre grossi cambi conformazionali.

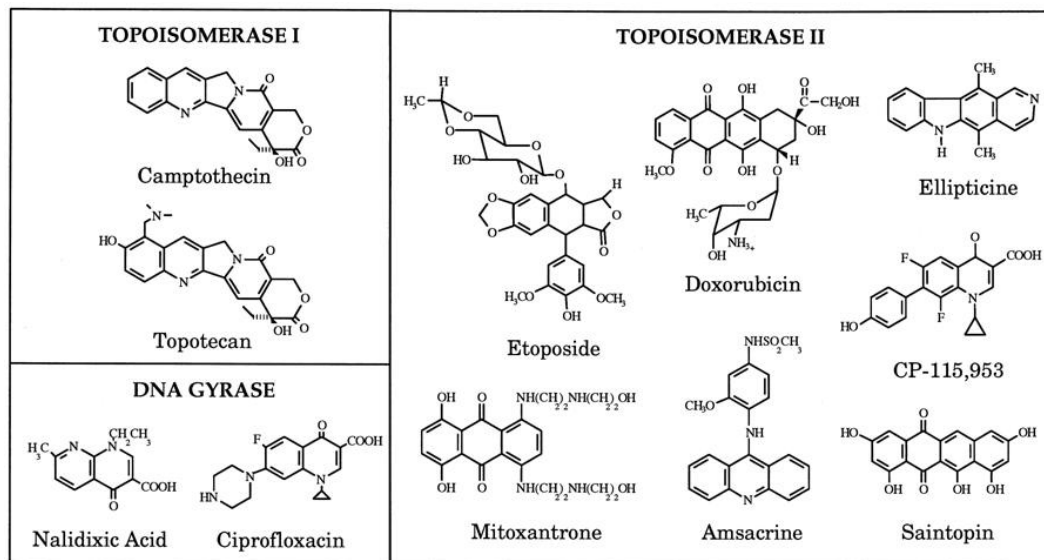
Negli ultimi anni la ricerca sulle Topoisomerasi ha avuto grande sviluppo, grazie a studi di cristallografia che hanno contribuito in maniera essenziale alla verifica dei modelli proposti per il loro meccanismo di azione. Tuttavia, a causa delle elevate dimensioni e della flessibilità degli enzimi di tipo II, è attualmente disponibile la struttura cristallografica solo di un loro frammento, rappresentante il sito attivo della proteina.

### 3.1.1 INIBITORI DELLE TOPOISOMERASI

L'azione di inibizione delle Topoisomerasi può svolgersi secondo due meccanismi<sup>6</sup>:

1. stabilizzazione del complesso covalente Topoisomerasi/DNA. I farmaci che agiscono con questa modalità vengono detti “veleni delle Topoisomerasi”, in quanto trasformano l'enzima in una potente tossina cellulare. In questa classe si inseriscono acridine, antracicline, ellipticine e chinoloni;
2. inibizione del ciclo catalitico, senza diretto intervento nel complesso covalente. I farmaci che agiscono con questa modalità vengono detti “inibitori delle Topoisomerasi”. In questa classe si inseriscono gli antibiotici cumarinici.

La classificazione più comunemente usata, comunque, si basa sull'enzima bersaglio (Figura 5); pertanto di norma si parla di inibitori delle Topoisomerasi I, inibitori delle Topoisomerasi II e inibitori delle Girasi (Topoisomerasi batteriche). Fra gli inibitori della Topoisomerasi II ricordiamo la *m*-Amsacrina, che è stata qui presa a modello per la sintesi di nuovi potenziali farmaci. Questa molecola agisce come intercalante del solco minore del DNA, con cui è in grado di formare un complesso sufficientemente stabile da resistere fino all'entrata del DNA nella tasca enzimatica della Topoisomerasi II. Qui, la *m*-Amsacrina consente il taglio del DNA, ma non la sua rinsaldatura, interrompendo così il ciclo catalitico.

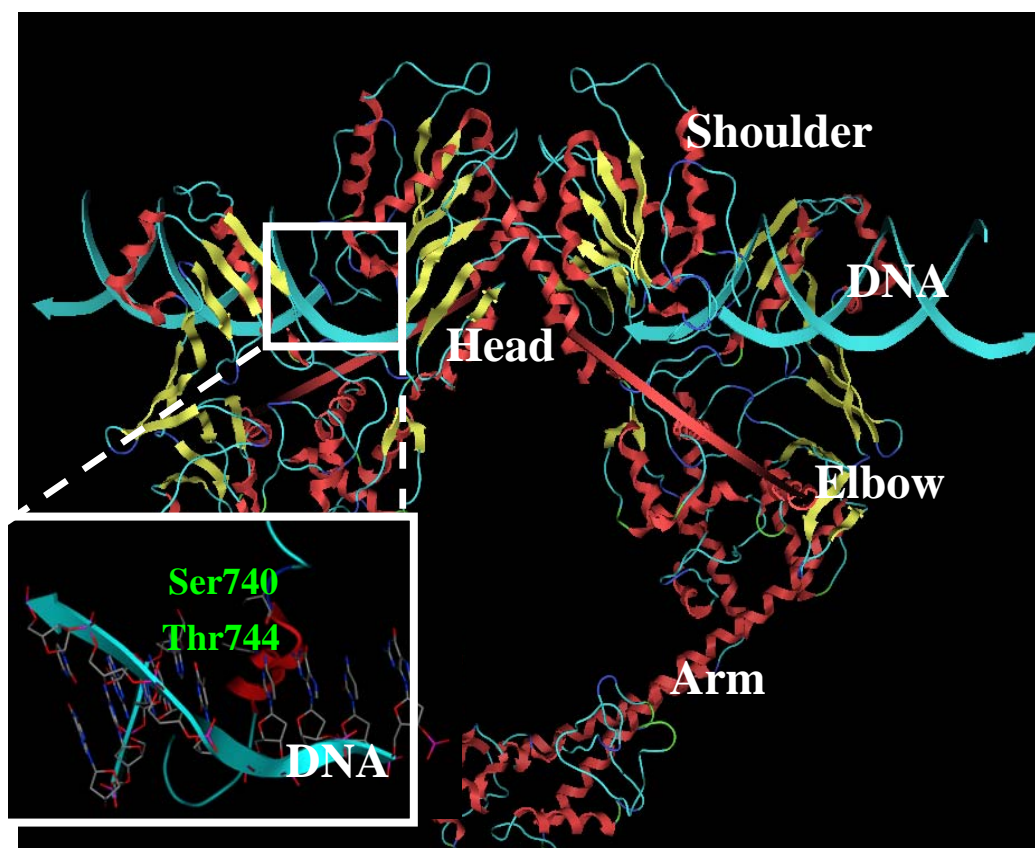


**Figura 5.** Strutture di alcuni farmaci antitopoisomerasi.

### 3.1.2 MODELLO DI INTERAZIONE DEL COMPLESSO DNA-ENZIMA

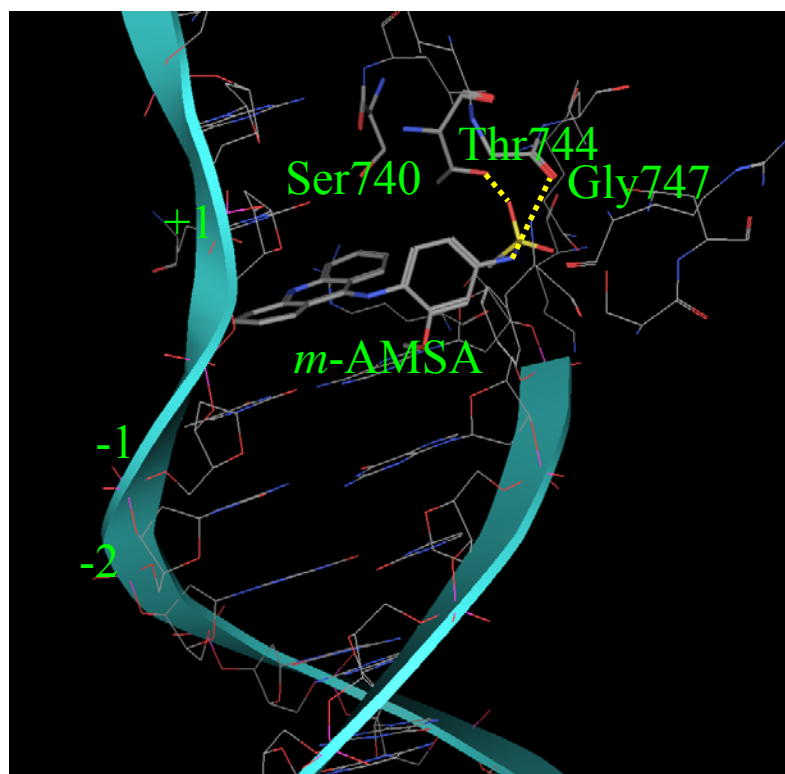
Da recenti applicazioni di modelling<sup>7</sup> è stata proposta un'ipotetica topologia del complesso covalente Top2-DNA (Figura 6), dove sono chiaramente riconoscibili i domini contrassegnati con le denominazioni di testa, spalla, braccio e gomito. Due gruppi di aminoacidi sembrano coinvolti direttamente nell'interazione con la doppia elica del DNA: da Tyr734 a Thr744 e da Lys775 a Tyr782. In particolare nella regione tra Tyr734 e Thr744 è localizzato lo strand di DNA tagliato (tra le posizioni +1 e -1).





**Figura 6.** Complesso covalente Top2-DNA e ingrandimento della regione d' interazione.

Partendo dalle coordinate del modello del complesso covalente Top2-DNA, uno studio di docking molecolare ha permesso di stabilire le probabili interazioni tra il complesso enzima-DNA nel sito di taglio e diversi antitopoisomerasici, tra cui la *m*-Amsacrina, presa come riferimento per la sintesi di nuove strutture (Figura 7). L'asse dell'elica del DNA passa direttamente al centro dell'anello acridinico, quindi il cromoforo tricyclico si trova circondato da basi su entrambi i lati. Come risultato dell'intercalazione della *m*-amsa, si nota uno spostamento delle paia di basi GC e CG di  $9^\circ$  e  $15^\circ$  rispettivamente in modo da compensare l'eccesso di forze di Van der Waals dovuto proprio all'intercalazione. Oltre alla zona del tricyclo planare, sono state notate due forti interazioni tra la molecola e il target: il gruppo ossidrilico di Thr744 interagisce con la funzione solfonamidica dell'anilina, e l'ossigeno carbonilico di Gly747 interagisce con l'NH della stessa solfonamide.

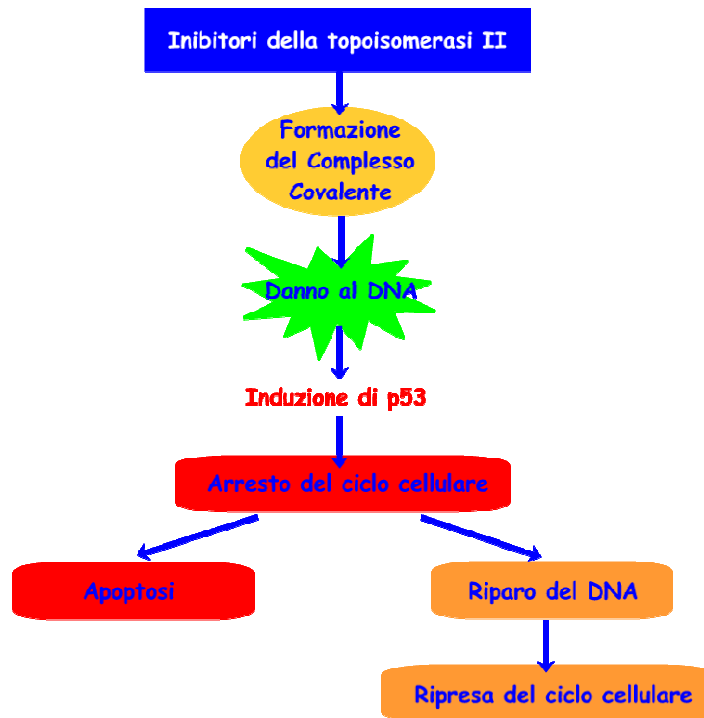


**Figura 7.** Modello di intercalazione della *m*-Amsacrina nel complesso covalente Top2-DNA, in cui si evidenzia la posizione della molecola rispetto a Ser740, Thr744 e Gly747. L'elica del DNA è indicata in azzurro, i ponti idrogeno sono indicati in giallo.

### 3.1.3 INIBIZIONE DELLA TOPOISOMERASI E APOPTOSI

Gli agenti antitopoisomerasici di utilità clinica sono in grado di aumentare la quantità di enzima covalentemente legato al DNA, facendo quindi diventare l'enzima un veleno cellulare, in quanto lascia i filamenti di DNA non saldati. Alcuni farmaci bloccano il rinsaldamento del DNA rotto, come l'Amsacrina e l'Etoposide, mentre altri aumentano la velocità di rottura del DNA senza inibire il rinsaldamento.

La formazione del complesso covalente tra enzima e DNA comporta drammatiche modificazioni dei meccanismi vitali con conseguente morte cellulare. Alcuni autori<sup>6</sup> ritengono che l'inibizione della Topoisomerasi sia un fattore in grado di innescare morte cellulare programmata (PCD, Programmed Cell Death) o apoptosi (Figura 8).



**Figura 8.** Meccanismi di attivazione di apoptosi in seguito a formazione di complesso covalente tra Topoisomerasi e DNA.

Infatti la formazione del complesso enzima-DNA (CCF, Covalent Complex Formation) interferisce con il metabolismo degli acidi nucleici e porta a lesioni irreversibili del DNA, che costituiscono un segnale di attivazione per la produzione di p53: questo gene è un oncosoppressore in grado di bloccare la crescita nelle cellule in cui si sono verificati danni al DNA, favorendone la riparazione. Se la correzione del DNA è produttiva il ciclo può riprendere, altrimenti si avvia il processo di morte programmata o apoptosi.

## 3.2 LA PROTEINCHINASI CK2

La CK2 (caseinchinasi 2) è una Ser-Thr proteina chinasi con centinaia di substrati endogeni che sono proteine con ruoli fondamentali nell'espressione genica, nella traduzione del segnale, nella biosintesi e degradazione delle proteine<sup>8</sup>.

La CK2 possiede una struttura eterotetramericata costituita da due unità secondarie catalitiche ( $\alpha$  e  $\alpha_1$ ) e due unità secondarie regolatrici ( $\beta$ )<sup>9</sup>. L'unità secondaria non catalitica ha la funzione di stabilizzare la molecola, proteggere la chinasi da denaturanti, modulare la specificità del substrato e regolare l'attività dell'enzima. Le unità secondarie sono coinvolte sia nel formare l'enzima tetramericato CK2 sia nel legare e regolare altre proteine chinasi.

In genere le proteinchinasi sono enzimi strettamente regolati che diventano attivi solo in risposta a determinati stimoli, mentre la CK2 è costitutivamente attiva e viene definita come una chinasi messaggero-indipendente perché l'attività non dipende da tutte quelle piccole molecole quali nucleotidi ciclici, lipidi e calcio, che sono generalmente coinvolti nell'attivazione delle chinasi messaggero-dipendenti<sup>8</sup>. Questo, però, non esclude la possibilità che piccole molecole partecipino ad alcune funzioni di regolazione della CK2. La CK2 ha una specificità ridotta per il co-substrato, cioè ha la possibilità di usare sia adenosin trifosfato (ATP) che guanosin trifosfato (GTP) come donatori di  $\gamma$  fosfato che vengono trasferiti ai residui aminoacidici di serina e treonina di substrati proteici<sup>9</sup>. Come tutte le chinasi la CK2 è coinvolta nei meccanismi regolatori che controllano i vari stadi del ciclo cellulare attraverso la catalisi della fosforilazione e regolazione delle proteine che hanno funzioni importanti associate alla progressione del ciclo cellulare. La CK2, infatti, è coinvolta nei meccanismi che controllano la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule come in quelli che innescano il processo di apoptosi<sup>8</sup>.

L'attività di CK2 aumenta nelle cellule mutate, nelle leucemie, in vari tipi di tumori solidi, come per esempio nella neoplasia alla ghiandola mammaria, alla prostata, alla testa, al collo, al polmone e al rene, nei tessuti in rapida proliferazione e durante l'embriogenesi<sup>10</sup>.

Per questa sua elevata presenza nei tumori e per la capacità di indurre neoplasie in modelli sperimentali in caso di sua sovraespressione si suppone che la sua caratteristica di essere costitutivamente attiva sia responsabile del suo potenziale oncogenico<sup>11</sup>.

Recenti studi<sup>12</sup> hanno inoltre dimostrato che alcuni virus sono in grado di utilizzare CK2 per il proprio ciclo replicativo.

La proteina chinasi CK2 è attualmente oggetto di numerosi studi per comprenderne i diversi ruoli fisiologici nella cellula ed il meccanismo di azione con il quale è coinvolta in essi; lo scopo di questi studi è quello di poter poi sviluppare inibitori specifici per questo enzima da introdurre nella terapia del cancro e nella terapia antivirale.

Alcuni studi<sup>13</sup> hanno confermato che la proteinchinasi CK2 fosforila selettivamente due residui serinici (Ser 1524 e Ser 1376) della subunità  $\alpha$  della Topoisomerasi II con conseguente attivazione di quest'ultimo enzima fondamentale nella proliferazione cellulare.

### **3.2.1 INIBITORI DELLA CK2**

Gli inibitori della CK2 possono essere di due tipi:

- ✓ analoghi del substrato fosfoaccettore (proteina-substrato)
- ✓ analoghi del substrato fosfodonaore (ATP o GTP).

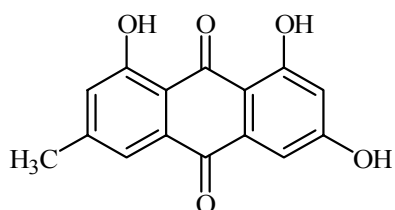
Sono noti inibitori di entrambi i tipi, cioè sia sostanze in grado di competere con il substrato nel sito attivo dell'enzima, sia sostanze capaci di legarsi al sito di legame per l'ATP.

Tra gli inibitori di tipo competitivo del substrato fosfoaccettore sono risultati efficaci molti composti polianionici come l'eparina, l'acido poliglutammico ed alcuni polimeri di acido glutammico e tirosina<sup>14</sup>.

Gli inibitori competitivi ATP-mimetici sono risultati, da studi *in vitro*, più efficaci e maggiormente selettivi. Questi possono essere suddivisi in diverse classi chimiche:

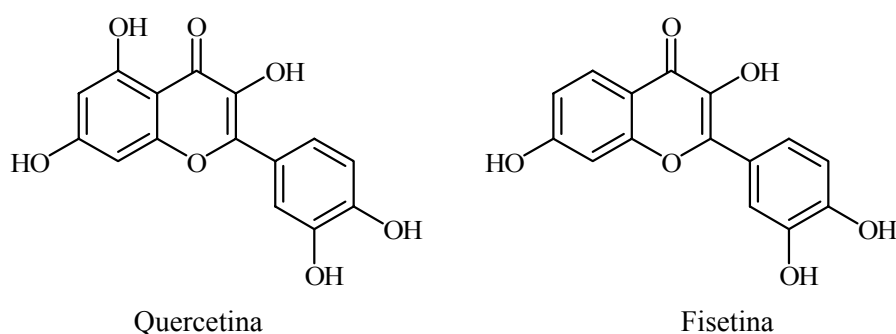
- derivati idrossiantrachinonici quali l'Emodina (1,3,8-triidrossi-6-metilantachinone) (Figura 9) che è un inibitore selettivo per CK2; essa si

inserirsi in una tasca idrofobica più profondamente rispetto all'ATP o GTP, con solo i due anelli più esterni sovrapposti alla base nucleotidica. Il legame tra l'Emodina e la CK2 avviene grazie ad interazioni idrofobiche e di Van der Waals tra gli anelli aromatici ed alcuni aminoacidi non polari presenti nella tasca e caratteristici della CK2, e grazie a deboli legami polari con gli ossidrili antrachinonici per la presenza dell'ossidrile in 3 dell'Emodina<sup>15</sup>.



**Figura 9.** Struttura dell'Emodina.

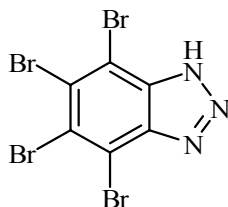
- Alcuni flavonoidi (Quercetina e Fisetina, Figura 10) si sono dimostrati efficaci inibitori della CK2 grazie alla presenza di gruppi ossidrilici che formano interazioni polari con residui aminoacidici del sito attivo, ma a differenza dei derivati antrachinonici non sono selettivi per la CK2 probabilmente per la mancanza di interazioni idrofobiche<sup>11</sup>.



**Figura 10.** Struttura della Quercetina e della Fisetina.

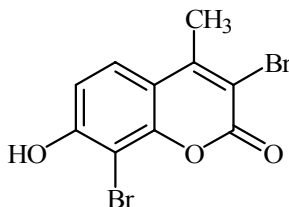
- Derivati benzimidazolici o benzotriazolici alogenati tra cui troviamo il TBB (4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzotriazolo, Figura 11). Questo composto si adatta perfettamente alla tasca idrofobica della CK2 (generalmente le tasche presenti nelle altre proteinchinasi sono più larghe permettendo la libera entrata e uscita del TBB da questa) grazie alla presenza dei quattro atomi di bromo presenti

sull'anello benzenico che formano interazione idrofobiche con la parte apolare della CK2 $\alpha$ . Tra il TBB e la CK2 c'è anche un'interazione polare grazie a molecole di acqua presenti nella struttura di CK2 che consentono la formazione di legami con un atomo di azoto del TBB<sup>16</sup>.



**Figura 11.** Struttura di TBB (4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzotriazolo).

- Derivati idrossicumarinici tra i quali vi sono gli inibitori più specifici per la CK2 finora conosciuti. In particolare la DBC (3,8-dibromo-7-idrossi-4-metilcumarina, Figura 12) è il lead compound<sup>8</sup> di questa classe grazie alla presenza dei due atomi di bromo in posizione 3 e 8 che formano interazioni idrofobiche e di Van der Waals con aminoacidi non polari della tasca.



**Figura 12.** Struttura della DBC (3,8-dibromo-7-idrossi-4-metilcumarina).

### 3.3 SINTESI ORGANICA ASSISTITA DA MICROONDE

Si presume che tutte le reazioni chimiche condotte con l'ausilio del calore possano essere accelerate dall'utilizzo delle microonde. Per confermare questo presupposto fin dalla metà degli anni '80 è iniziato l'uso delle microonde per condurre sintesi organiche. Inizialmente vennero usati i forni a microonde domestici in commercio, che non sempre si dimostrarono adeguati a sostenere le condizioni di reazione. I continui miglioramenti apportati hanno quindi permesso la realizzazione degli attuali reattori per uso scientifico.

Le microonde sono onde elettromagnetiche situate tra la radiazione IR e le onde radio tra 0.3 e 300 GHz (lunghezza d'onda 1mm-1m) (Figura 13). Per evitare interferenze con i sistemi di telecomunicazione ed i radar, la frequenza degli apparati a microonde domestici ed industriali è regolata a 2450 MHz (12.2 cm).

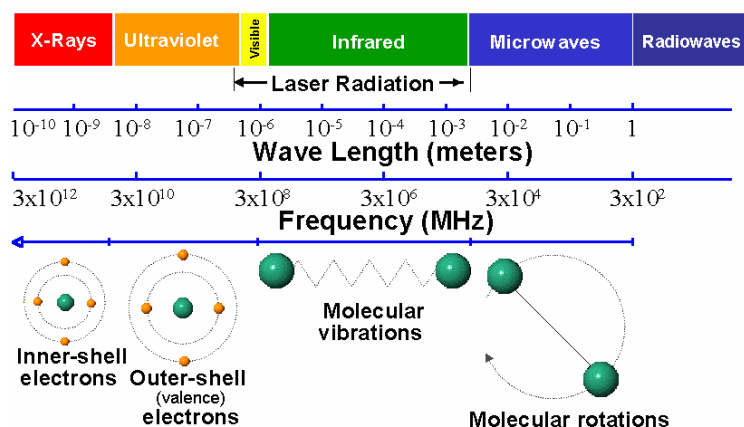
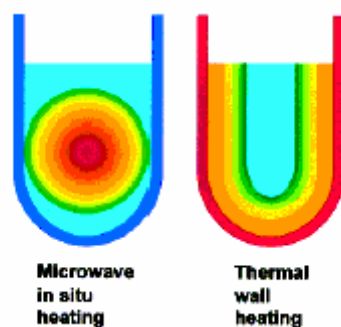


Figura 13. Spettro elettromagnetico.

Ad ogni forma di energia è associata una risposta molecolare: le microonde inducono solo movimenti di rotazione circolare delle molecole, mantenendo intatti i legami molecolari e la loro lunghezza. Infatti l'energia per rompere un legame è stimata tra 80 e 120 Kcal/mol, mentre l'energia del fotone delle microonde è di 0.037 Kcal/mole, evidentemente non sufficiente per indurre la rottura di un legame.



La tecnica MW si è dimostrata utilissima nei casi in cui il riscaldamento tradizionale ha bassa efficienza per effetto di trasmissione inefficiente del calore. Infatti la sintesi convenzionale avviene attraverso il trasferimento lento e graduale di calore da una sorgente esterna alla miscela di reazione attraverso il contenitore. Nel caso di MW il transfer di energia è rapido e senza inerzia, ha potere di penetrazione dell'ordine della lunghezza usata (quindi 10 cm) ed interessa i reagenti ed il solvente ma non il recipiente (Figura 14).

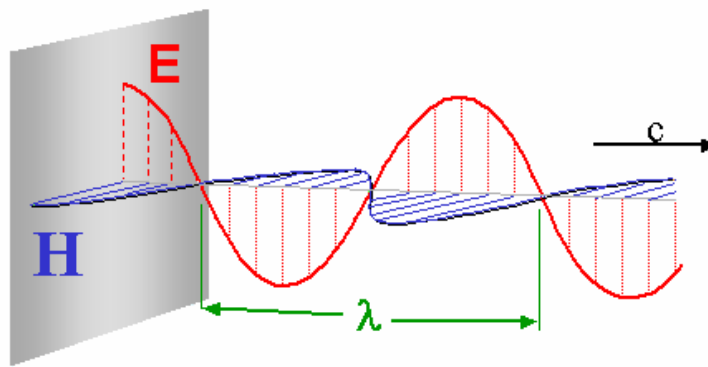


**Figura 14.** Illustrazione schematica del riscaldamento *in-situ* dovuto alle microonde.

Quindi il riscaldamento è rapido e localizzato dato che non dipende dalla conducibilità termica del contenitore (trasparente alle microonde).

### 3.3.1 AZIONE DELLE MICROONDE

Le microonde sono formate da un campo elettrico (E) e da un campo magnetico (H) (Figura 15), ma solo quello elettrico trasferisce energia scaldando la sostanza, mentre quello magnetico non interviene nello svolgimento della reazione chimica.

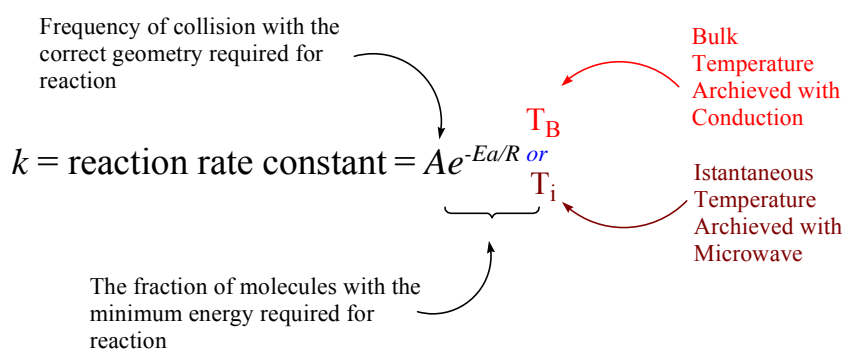


**Figura 15.** Andamento dell'onda elettromagnetica dovuta a microonde.

Le microonde provocano particolari oscillazioni in molecole che possiedono momento dipolare non nullo: tali movimenti determinano un riscaldamento elevatissimo e immediato. Tale riscaldamento si esplica attraverso due meccanismi: la rotazione dipolare e la conduzione ionica. Nel fenomeno di rotazione dipolare, molecole dipolari sottoposte ad una radiazione elettromagnetica tendono ad allinearsi con il campo elettrico quindi assumono movimenti oscillatori, che producono energia sotto forma di riscaldamento. Tali movimenti dipendono dalla viscosità del mezzo in cui sono immerse e dalla frequenza del campo applicato. Se le frequenze sono troppo elevate, le molecole non hanno tempo sufficiente per rispondere al campo elettrico, non riescono a ruotare e quindi non c'è transfer di energia né riscaldamento; se le frequenze sono troppo basse, le molecole ruotano perfettamente in fase con il campo elettrico, ma l'energia sviluppata è bassa e non si produce calore. Se la frequenza applicata è dell'ordine delle microonde, le molecole hanno tempo di ruotare senza però essere completamente in fase con il campo elettrico, quindi tendono a riallinearsi continuamente con il campo che a sua volta continuamente oscilla. Questa differenza di fase provoca collisioni e comporta riscaldamento. L'entità del riscaldamento è funzione della grandezza del momento dipolare e anche della viscosità, che varia la possibilità di rotazione delle molecole. In un mezzo gassoso le molecole sono lontane e libere di oscillare in fase, perciò non si avrà riscaldamento. Nel fenomeno di conduzione, particelle cariche (ioni) in soluzione si muovono sotto l'influenza del campo elettrico con aumento delle collisioni tra le molecole, con conversione dell'energia cinetica in riscaldamento. Liquidi

contenenti ioni si riscaldano maggiormente di liquidi deionizzati. Esiste quindi una correlazione diretta tra momento di dipolo di una molecola e la sua capacità di assorbire le microonde. Infatti l'aumento di temperatura dipende fortemente dalla polarità della miscela di reazione. Per questo principio la scelta del solvente assume notevole importanza: più polare è il solvente, maggiore è l'aumento di temperatura che ne risulta. In base alle considerazioni fatte sui meccanismi d'azione delle microonde, questa tecnica può essere applicata anche in assenza di solvente, nel caso in cui i reagenti abbiano proprietà dielettriche opportune.

Le microonde aumentano velocità e resa di reazione: l'energia trasferita è molto maggiore rispetto alla quota necessaria per raggiungere l'energia d'attivazione. Tale trasferimento è inoltre molto rapido per cui si ha un'attivazione maggiore delle singole molecole. Queste condizioni provocano un aumento della temperatura istantanea con il potenziale raggiungimento di valori molto maggiori, mentre nel metodo convenzionale l'aumento riguarda la temperatura complessiva del sistema (temperatura di bulk,  $T_B$ ). Quindi nell'equazione di Arrhenius, che descrive la dipendenza della cinetica di reazione dalla temperatura, si può sostituire il termine  $T_B$  con la temperatura istantanea ( $T_i$ ), che raggiunge valori maggiori (Figura 16). In questo modo viene influenzata la cinetica di reazione e aumenta la resa dei prodotti ed inoltre le reazioni sono molto pulite perché non essendoci fenomeni di surriscaldamento sono ridotti i prodotti collaterali.



**Figura 16.** Effetto del riscaldamento MW sulla costante cinetica di reazione.

### 3.3.2 MICROONDE SINGLE-MODE E MULTIPLE-MODE

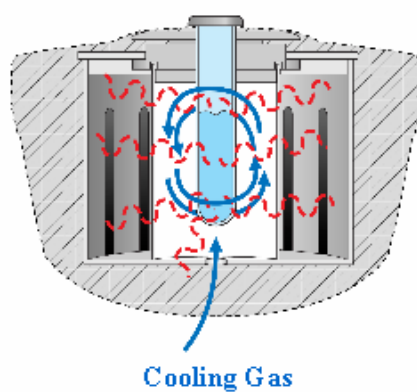
Esistono due tipi di apparati per microonde: multimodali e monomodali. Nel primo caso rientrano, ad esempio, i forni a microonde domestici o strumenti industriali dotati di una cavità ampia con una conseguente dispersione di energia e una distribuzione energetica non uniforme. Nei sistemi monomodali invece si ha focalizzazione energetica sul campione con conseguente densità e uniformità energetica maggiori.

Il reattore utilizzato in questo lavoro di tesi è di tipo monomodale self-tuning (Figura 17), in cui si ha un'automatica regolazione della potenza delle microonde in base a temperatura e pressione impostate.



**Figura 17.** Reattore monomodale self-tuning.

Nel sistema è presente un flusso di gas di raffreddamento (Figura 18) attivabile secondo le esigenze di reazione ed un controllo a feedback della temperatura che permette di massimizzare l'input delle microonde (Enhanced microwave synthesis, EMS). In questo modo è possibile fornire energia senza aumentare proporzionalmente la temperatura di bulk, migliorando la cinetica di reazione e riducendo i fenomeni di termodegradazione.



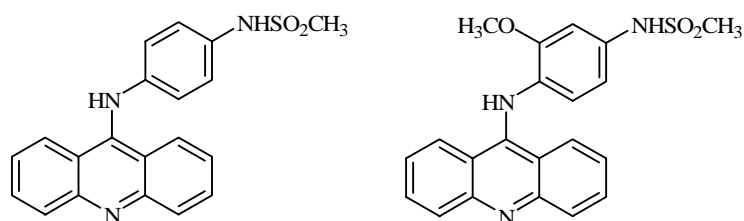
**Figura 18.** Schematizzazione del sistema di raffreddamento.

In conclusione, la sintesi assistita da microonde porta a reazioni più veloci, rese maggiori, minore formazione di coprodotti o prodotti di degradazione ed inoltre l'impiego di una chimica sostenibile<sup>17</sup>.

## 4. OBIETTIVO

L'obiettivo della ricerca è lo studio di come gli inibitori della Topoisomerasi II e della proteinchinasi CK2 possano agire in modo sinergico nei confronti del tumore, considerando che la terapia dei tumori è solitamente multicomponente.

Il progetto ha previsto la sintesi di nuovi potenziali inibitori della Topoisomerasi II con struttura ibrida (Figura 1), che derivano cioè dall'assemblaggio di unità strutturali di farmaci diversi. Scegliendo come molecola di riferimento l'Amsacrina, sono stati individuati come farmacofori alcuni policicli planari potenzialmente idonei ad intercalare nel DNA, aventi nella struttura policiclica uno o più atomi di azoto, in analogia al nucleo acridinico di base dell'amsacrina, e questi sistemi aromatici planari sono stati funzionalizzati con elementi di farmaci antitopoisomerasici noti, più precisamente con le catene metansolfonamidoaniliche di Amsacrina e *m*-Amsacrina (Figura 19).

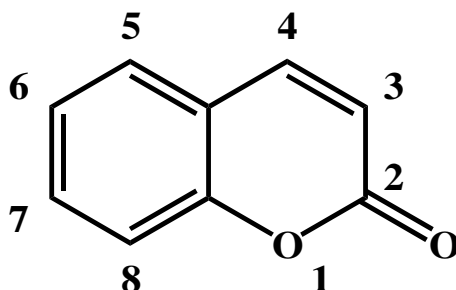


**Figura 19.** Struttura di Amsacrina e *m*-Amsacrina.

In secondo luogo è stata prevista la sintesi di composti a struttura chinolinonica o cumarinica (Figura 2 e Figura 3) come nuovi potenziali inibitori della proteinchinasi CK2 prendendo come riferimento la 3,8-dibromo-7-idrossi-4-metilcumarina (DBC) (Figura 12) che è il composto con maggiore attività inibitoria nei confronti della proteinchinasi CK2 attualmente descritto in letteratura<sup>8</sup>.

L'obiettivo perseguito con la sintesi di nuovi composti cumarinici e chinolinonici ad attività inibitoria nei confronti di CK2 è stato quello di realizzare un preliminare rapporto struttura attività sullo scaffold benzopiranonico confrontando

i dati di cumarine presenti in letteratura<sup>8</sup> con i dati dei saggi biologici dei nuovi composti sintetizzati. L'attenzione si è focalizzata sullo studio delle posizioni 1, 8, 6 ed infine delle posizioni 7 e 4 del nucleo di base.



Nello studio della posizione 1 sono stati progettati composti aventi:

- Una sostituzione bioisostera dell'ossigeno piranico (accettore di idrogeno) con un atomo di azoto del nucleo chinolinico (donatore di idrogeno).

La preparazione di alcuni derivati bioisosteri a struttura chinolinica è dovuta all'interesse di valutare come una sostituzione bioisostera NH-O in posizione 1 nel nucleo cumarinico possa modulare l'attività inibitoria nei confronti del target enzimatico.

Nello studio della posizione 8 si è progettata la sintesi di composti aventi in tale posizione:

- Un gruppo stericamente ingombrante con effetto elettronattrattore (nitro, formile, ossima, carbonitrile) sull'adiacente posizione 7 in grado di modulare l'acidità dell'ossidrilico fenolico.
- Un gruppo (ossidrilico) in grado di aumentare le possibili interazioni polari nella tasca dell'enzima mantenendo o meno le posizioni 3 e 6 sostituite con un atomo di bromo.

Nello studio della posizione 6 si è progettata la sintesi di composti sostituiti con:

- ✓ Un gruppo (ossidrilico) in grado di dare interazioni polari nella tasca dell'enzima mantenendo o meno le posizioni 3 e 8 sostituite con un atomo di bromo.
- ✓ Un gruppo stericamente ingombrante e con effetto elettronattrattore (nitro) in grado di aumentare l'acidità dell'ossidrilico fenolico mantenendo gli atomi di bromo in posizione 3 ed 8 come nel lead compound DBC.

Nello studio della posizione 7 si è progettata la sintesi di composti aventi:

- ❖ Un gruppo ossidrilico mascherato (metossile, acetossile) non in grado di dare buone interazioni polari nella tasca dell'enzima.
- ❖ Un gruppo (aminico, tiolico) con diversa acidità dal gruppo fenolico della DBC.

Nello studio della posizione 4 sono stati progettati composti aventi:

- Nessun sostituente in questa posizione per verificare l'importanza del gruppo metilico presente nella struttura del lead compound.
- Un gruppo in grado di dare interazioni polari nella tasca dell'enzima (ossidrile, idrossimetile).
- Un gruppo (trifluorometile) in grado di modulare la solubilità dei derivati cumarinici preparati ed un ingombro sterico simile al metile.
- Un gruppo (etile, metossile, clorometile, bromometile) stericamente più ingombrante del metile della DBC.





## **5. RISULTATI E DISCUSSIONE**

Nell'ambito della ricerca di nuove molecole da utilizzare in terapia antitumorale, una particolare importanza riveste la classe degli inibitori delle Topoisomerasi, enzimi ubiquitari in grado di controllare lo stato topologico del DNA, mediante un meccanismo di taglio e richiusura della doppia elica. Esse si classificano in Topoisomerasi I (tagliano un solo filamento di DNA) e Topoisomerasi II (tagliano contemporaneamente entrambi i filamenti) e svolgono un ruolo fondamentale per la vita cellulare, sono inoltre il bersaglio di molti dei farmaci antitumorali usati oggi nella pratica clinica.

Altro bersaglio attualmente molto studiato per nuovi farmaci antitumorali è la proteinchinasi CK2, enzima fosforilante che riveste un ruolo fondamentale nella trasduzione dei segnali di sopravvivenza cellulare.

Da recenti studi si sono evidenziate interazioni tra Topoisomerasi II e CK2, che si inseriscono nei percorsi apoptotici che portano alla morte cellulare programmata.

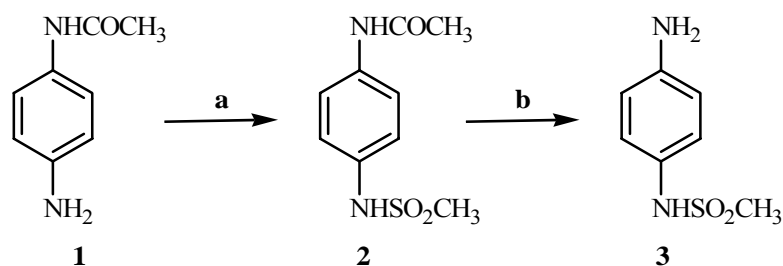
E' stato quindi studiato come gli inibitori di Topoisomerasi II e di CK2 possano agire in modo sinergico nei confronti del tumore, considerando anche che la terapia farmacologica dei tumori è solitamente multicomponente.

### **5.1 SINTESI DI POTENZIALI INIBITORI DELLA TOPOISOMERASI II**

Il cammino sintetico progettato per la preparazione dei potenziali inibitori della Topoisomerasi II prevede la preparazione delle catene sostituenti aromatiche e dei nuclei benzochinazolinici ed infine la condensazione dei due sintoni precedentemente preparati.

### 5.1.1 SINTESI DELLE CATENE LATERALI *N*-(4-AMINOFENIL)-METANSOLFONAMIDICHE

La sintesi della catena sostituenta priva del metossile è stata effettuata utilizzando come composto di partenza la *N*-(4-aminofenil)-acetamide (**1**) (Schema 1)<sup>18</sup>. Il composto **1** è stato trattato con metansolfonilcloruro in presenza di piridina a freddo, in atmosfera di azoto, ottenendo la *N*-(4-metansolfonilamidofenil)-acetamide (**2**). L'acetamide **2** è stata idrolizzata con acido cloridrico, ottenendo la *N*-(4-aminofenil)-metansolfonamide (**3**).

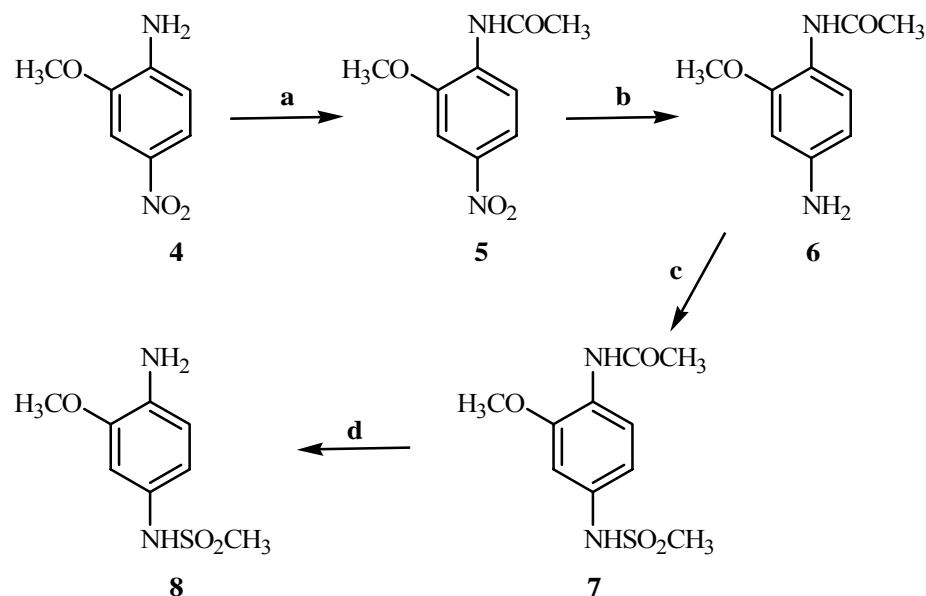


**Schema 1.** Sintesi di *N*-(4-aminofenil)-metansolfonamide.

Condizioni di reazione:

- CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>Cl, piridina, N<sub>2</sub>, 5°C, 30 minuti, resa 84%.
- HCl conc., H<sub>2</sub>O, riflusso, 4 ore, resa 26%.

La sintesi della catena laterale con il metossile in posizione 2 ha come punto di partenza la 2-metossi-4-nitroanilina (**4**) (Schema 2)<sup>18</sup>. Il gruppo aminico dell'anilina **4** è stato protetto tramite acetilazione e l'acetamide **5** è stata sottoposta a riduzione del nitrogruppo per idrogenazione catalitica con Pd/C, ottenendo l'*N*-(4-amino-2-metossifenil)-acetamide (**6**). Il composto **6** è stato trattato con metansolfonilcloruro e piridina in atmosfera di azoto, ottenendo la *N*-(2-metossi-4-metansolfonilamidofenil)-acetamide (**7**). Il composto **7** è stato infine parzialmente idrolizzato in ambiente acido per acido cloridrico, ottenendo la *N*-(4-amino-3-metossifenil)-metansolfonamide (**8**).



**Schema 2.** Sintesi di *N*-(4-amino-3-metossifenil)-metansolfonamide.

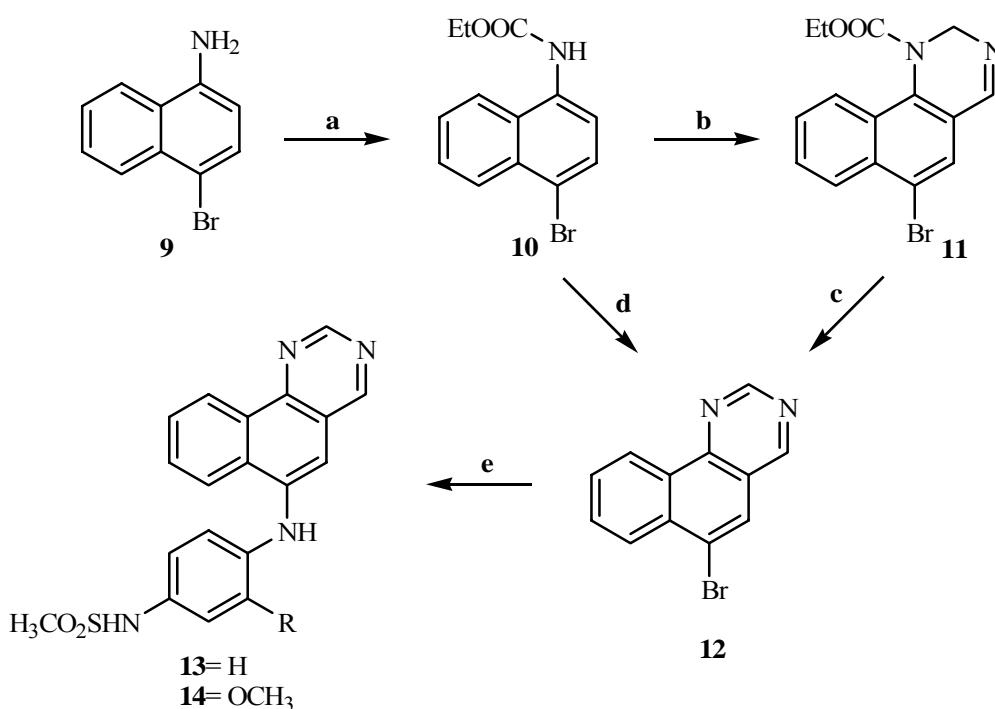
Condizioni di reazione:

- $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{AcOH}$ ,  $80^\circ\text{C}$ , 1 ora, resa 93%.
- $\text{Pd/C}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{EtOAc}$ , 8 ore, resa 98%.
- $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ , piridina,  $\text{N}_2$ ,  $5^\circ\text{C}$ , 30 min., resa 74%.
- $\text{HCl}$  conc.,  $\text{H}_2\text{O}$ , riflusso, 4 ore, resa 56%.

### 5.1.2 SINTESI DI *N*-[4-(BENZOCHINAZOLIN-6-ILAMINO)FENIL]-METANSOLFONAMIDI

I nuclei benzochinazolinici preparati, entrambi a geometria angolare, ma fra loro diversi per la posizione relativa dei due atomi di azoto dell'anello pirimidinico, hanno come prodotti di partenza la 4-bromo-1-naftilamina (**9**) (Schema 3) e la 4-bromo-2-naftilamina (**15**) (Schema 4), i cui gruppi aminici sono stati protetti per reazione con etile cloroformiato. Sui carbammati ottenuti (**10** e **16**) per reazione con urotropina in acido trifluoroacetico è stato condensato l'anello diidropirimidinico, il quale è stato successivamente deidrogenato con potassio ferricianuro, ottenendo le due 6-bromobenzochinazoline<sup>19</sup> isomere: 6-bromobenzo[*h*]chinazolina **12** e 6-bromobenzo[*f*]chinazolina **17**. Nella preparazione del nucleo 6-bromobenzo[*h*]chinazolinico **12** si è notato che l'isolamento dell'intermedio naftildiidropirimidinico **11** comporta una diminuzione della resa mentre la resa aumenta se la reazione viene condotta in unica soluzione. Anche il nucleo bromobenzo[*f*]chinazolinico **17** è stato

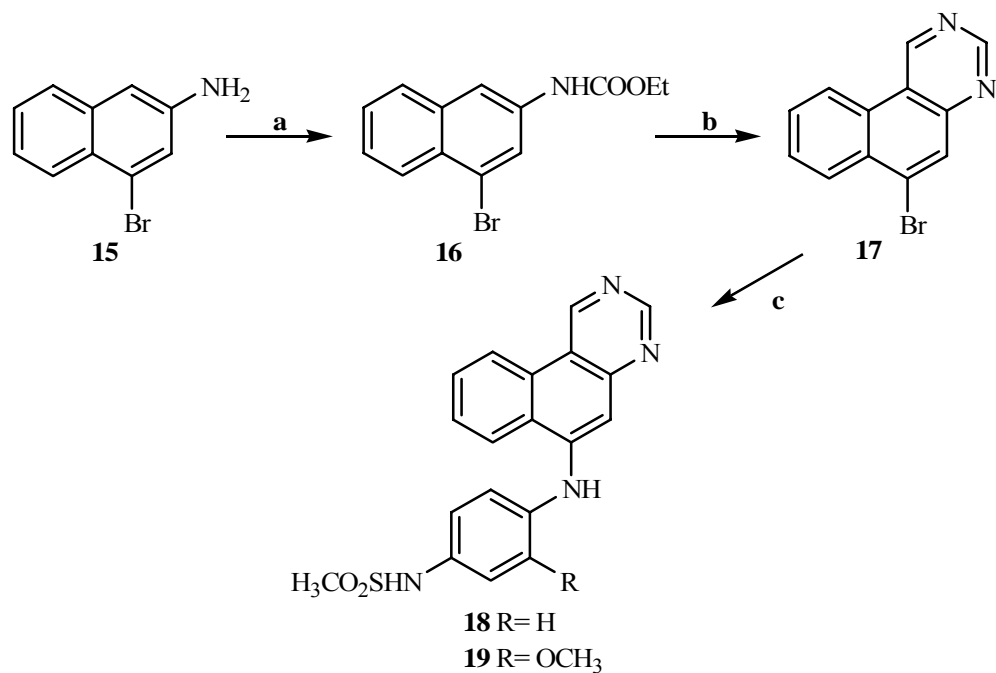
sintetizzato direttamente con la metodica che prevede un solo step sintetico a partire dal bromonaftiluretano **16**. Sul nucleo triciclico planare sono state infine condensate le catene metansolfonamidoaniliniche dell'Amsacrina, tramite reazione di Buchwald-Hartwig assistita da microonde ottenendo i composti **13**, **14**, **18** e **19** con una notevole riduzione dei tempi ed un aumento della resa di reazione rispetto ad analoghe sostituzioni nucleofile effettuate tramite reazione di Buchwald-Hartwig in tecnica classica<sup>20</sup>.



**Schema 3.** Sintesi di *N*-[4-(benzo[*h*]chinazolin-6-ilamino)fenil]-metansolfonamidi.

Condizioni di reazione:

- Etile cloroformiato, THF anidro, TEA, riflusso, 1 ora, resa quantitativa.
- Urotropina, TFA, riflusso, 1 ora, resa 80%.
- KOH 10 %, EtOH/H<sub>2</sub>O 1:1, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, riflusso, resa 6%.
- 1) Urotropina, TFA, riflusso, 1 ora.  
2) KOH 10 %, EtOH/H<sub>2</sub>O 1:1, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, riflusso, resa 23%.
- p*-metansolfonamidoanilina, Pd(Oac)<sub>2</sub>, BINAP, CsCO<sub>3</sub>, DMF, MW, 150°C, 10 min., resa: **13** 45%, **14** 62%.



**Schema 4.** Sintesi di *N*-[4-(benzo[*f*]chinazolin-6-ilamino)fenil]-metansolfonamidi.

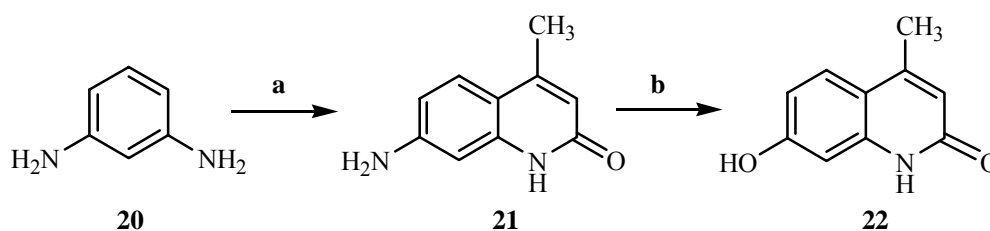
Condizioni di reazione:

- a) Etile cloroformiato, THF anidro, TEA, T amb., 1 ora, resa quantitativa.
- b) 1) Urotropina, TFA, riflusso, 1 ora.  
2) KOH 10 %, EtOH/H<sub>2</sub>O 1:1, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, riflusso, resa 16%.
- c) *p*-metansolfonamidoanilina, Pd(Oac)<sub>2</sub>, BINAP, CsCO<sub>3</sub>, DMF, MW, 150°C, 10 min., resa: **18** 28%, **19** 12%.

## 5.2 SINTESI DI POTENZIALI INIBITORI DELLA PROTEINCHINASI CK2

### 5.2.1 SINTESI DI POTENZIALI INIBITORI DI CK2 CON NUCLEO CHINOLINONICO

Per la preparazione del 7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (**22**)<sup>21</sup>, è stato utilizzato come prodotto di partenza la 1,3-fenilendiamina (**20**) che è stata fatta reagire con etile acetoacetato, ottenendo il 7-amino-4-metilchinolin-2-one (**21**), che è stato sottoposto a reazione di diazotazione con sodio nitrito e successivamente ad idrolisi in ambiente acido per acido solforico diluito per ottenere il 7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (**22**) (Schema 5).



**Schema 5.** Sintesi di 7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (**22**).

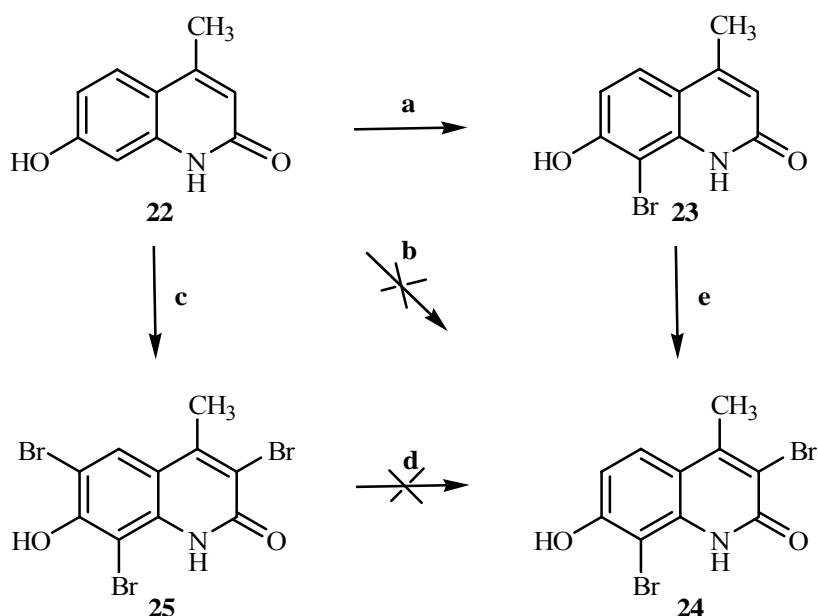
Condizioni di reazione:

- Etile acetoacetato, 150°C, 24 ore, resa 40%.
- 1) NaNO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60%, -5°C.  
2) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30%, 160°C, resa 95%.

La bromurazione (Schema 6) del 7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (**22**) con bromo elementare o con *N*-bromosuccinimide (NBS) in soluzione di acido acetico ha sempre portato, pur variando i rapporti stechiometrici, ad una miscela di prodotto di partenza e dei prodotti di monobromurazione, 8-bromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (**23**), e di dibromurazione, 3,8-dibromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (**24**), impossibili da separare sia per cristallizzazione che per cromatografia.

Dallo studio delle miscele di reazione ottenute con differenti rapporti stechiometrici, si è desunto però che l'alogenziazione avviene prima in posizione 8.

L'utilizzo di NBS in eccesso porta invece al prodotto trihalogenato 3,6,8-tribromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (**25**). L'8-bromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (**23**) è stato ottenuto invece operando la bromurazione con bromo elementare in ammonio idrato al 20% a temperatura ambiente.



**Schema 6.** Sintesi di bromoderivati 4-metil-7idrossichinolinonici.

Condizioni di reazione:

- $\text{Br}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$  (20%), T amb., resa 47%.
- $\text{Br}_2$ ,  $\text{AcOH}$ ,  $60^\circ\text{C}$ .
- NBS,  $\text{AcOH}$ , T amb., 1 ora, resa 76%.
- $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  (3/1), T amb..
- $\text{Br}_2$ ,  $\text{AcOH}$ ,  $60^\circ\text{C}$ , resa 47%.

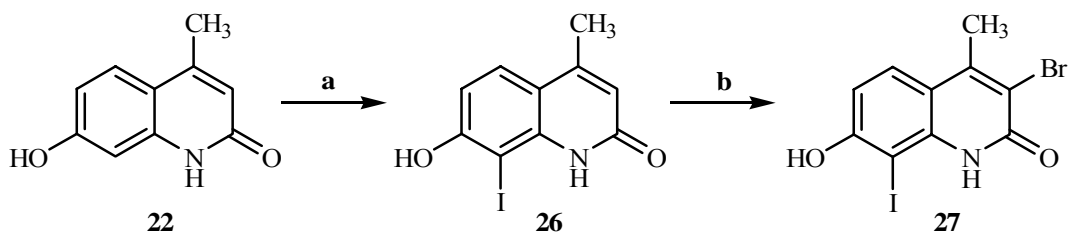
Il 3,8-dibromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (**24**) è stato successivamente ottenuto per bromurazione del composto **23**, aggiungendo goccia a goccia bromo diluito in acido acetico fino a scomparsa del prodotto di partenza.

E' stata anche tentata la sintesi del prodotto **24** per monodebromurazione con sodio solfito dal 3,6,8-tribromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (**25**), preparato dal composto **22** per bromurazione esaustiva con NBS, ma senza ottenere il prodotto desiderato.

Il 7-idrossi-8-iodo-4-metilchinolin-2-one (**26**) (Schema 7) è stato sintetizzato dal composto **22** solubilizzato in ammonio idrato al 20% aggiungendo, goccia a goccia, lo iodio solubilizzato in una soluzione acquosa di potassio ioduro. Dal 7-idrossi-8-iodo-4-metilchinolin-2-one (**26**) è stato quindi sintetizzato il 3-bromo-7-



idrossi-8-iodo-4-metilchinolin-2-one (**27**) per bromurazione in acido acetico glaciale.

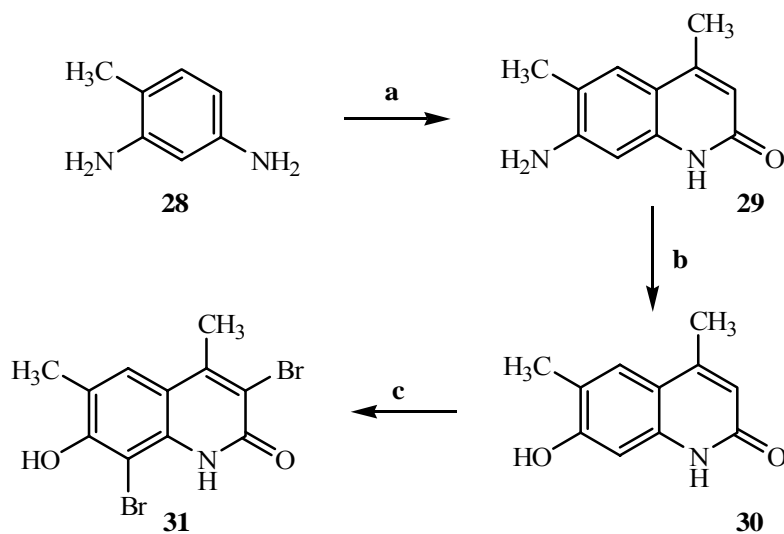


**Schema 7.** Sintesi di iododerivati 4-metil-7idrossichinolinonici.

Condizioni di reazione:

- a)  $I_2$ ,  $NH_4OH$ , T amb., 1 ora, resa 48%.
- b)  $Br_2$ , AcOH,  $60^\circ C$ , resa 48%.

Il 7-idrossi-4,6-dimetilchinolin-2-one (**30**) (Schema 8) è stato preparato per diazotazione ed idrolisi dal 7-amino-4,6-dimetilchinolin-2-one (**29**), ottenuto a sua volta per condensazione di 2,4-diaminotoluene (**28**) ed acetoacetato di etile a  $150^\circ C$ .



**Schema 8.** Sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4,6-dimetilchinolin-2-one (**19**).

Condizioni di reazione:

- a) Etile acetoacetato,  $150^\circ C$ , 48 ore, resa 46%.
- b) 1)  $H_2SO_4$  30%,  $NaNO_2$ ,  $-5^\circ C$ .  
2)  $H_2SO_4$  30%,  $160^\circ C$ , resa 50%.
- c)  $Br_2$ , AcOH,  $60^\circ C$ , 3 ore, resa 72%.

La bromurazione del composto **30** in soluzione acetica con bromo elementare in difetto (0.5:1) ed a diverse temperature, porta alla formazione di una miscela di

prodotti di monobromurazione e dibromurazione che non è stato possibile separare. Invece, usando un eccesso di bromo, si è ottenuto il 3,8-dibromo-7-idrossi-4,6-dimetilchinolin-2-one (**31**).

## **5.2.2 SINTESI DI POTENZIALI INIBITORI DI CK2 CON NUCLEO CUMARINICO**

### **5.2.2.1 SOSTITUZIONI NELLE POSIZIONI 6 ED 8 DEL NUCLEO CUMARINICO<sup>22</sup>**

Il prodotto di partenza della sintesi dei composti riportati nello Schema 9 è il 4-metilumbelliferone (**32**) il quale è stato formilato in posizione 8 con urotropina per ottenere il composto **33**. Dal formilderivato **33** è stata ottenuta l'ossima **34** che successivamente è stata disidratata con anidride acetica e subito sottoposta ad idrolisi in ambiente acido ottenendo il derivato carbonitrilico **35**. Il composto **35** è stato sottoposto a reazione di bromurazione ma senza ottenere il prodotto desiderato **36**. Questo è stato invece ottenuto seguendo tre diverse strategie sintetiche: una via ha previsto la bromurazione in posizione 3 del composto **34** per ottenere l'ossima **37** che è stata sottoposta a disidratazione ottenendo il prodotto carbonitrilico **36**. Una seconda via ha previsto dapprima la sintesi del derivato cumarinico **38** bromosostituito in posizione 3, successivamente la formilazione in posizione 8 ed il composto **39** così ottenuto è stato sottoposto sia a reazione con idrossilamina per ottenere l'ossima **37** dal quale, come scritto precedentemente, si ottiene il composto **36**. Oppure il composto **39** è stato sottoposto direttamente a reazione con idrossilamina con tecnica assistita da microonde per ottenere la formazione dell'intermedio **37** e la sua contemporanea disidratazione a composto **36**.

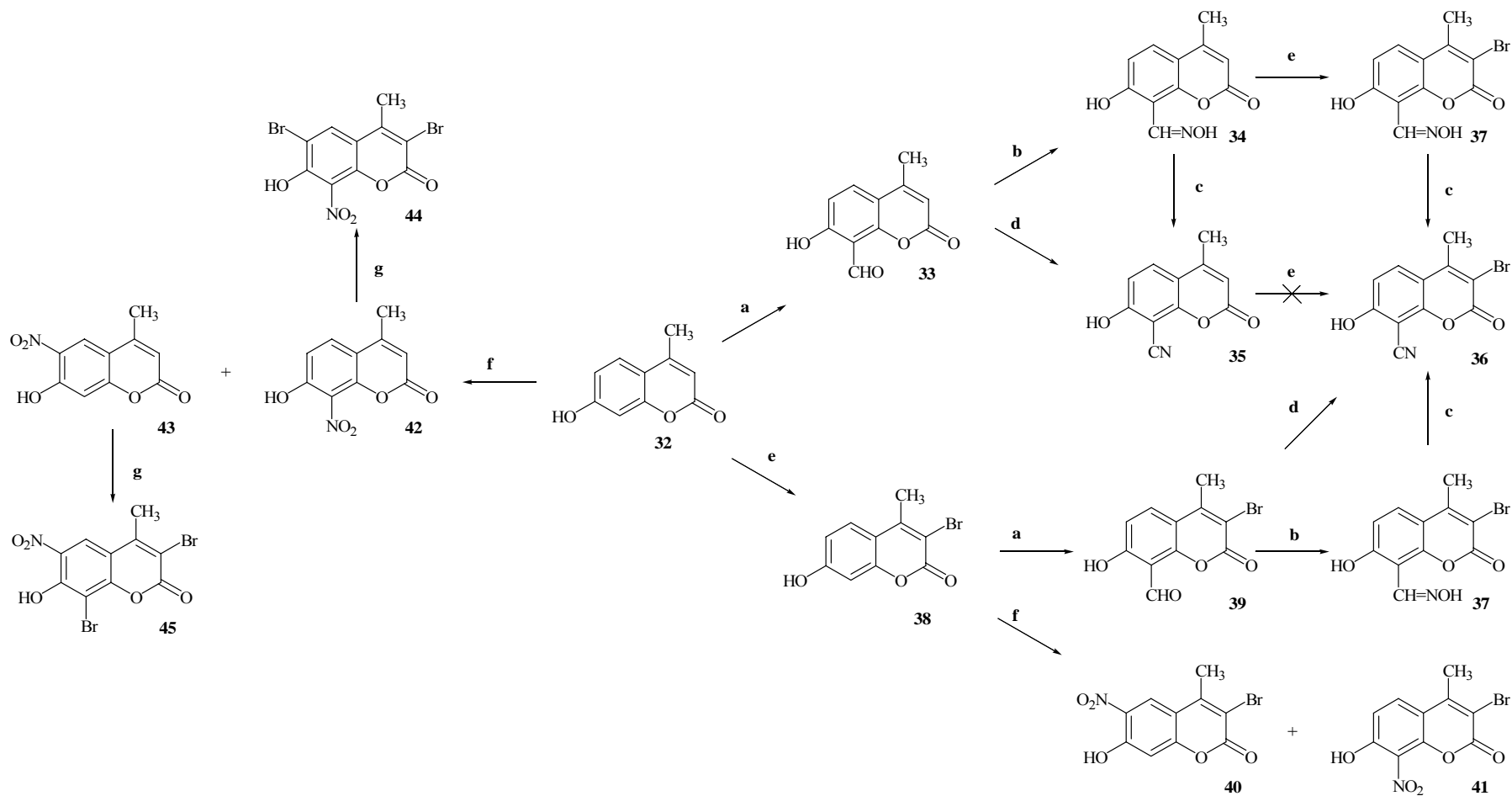
E' stato effettuato un confronto tra sintesi classica e sintesi assistita da microonde nella reazione di formilazione che ha portato ai prodotti **33** e **39**. Dopo un opportuno studio di ottimizzazione delle condizioni di reazione si è ottenuto con la metodica assistita dalle microonde un notevole aumento della resa ed una riduzione dei tempi di reazione (Tabella 1).

Composto	METODO CONVENZIONALE			METODO MW		
	Condizioni	Tempo	Resa	Condizioni	Tempo	Resa
<b>33</b>	HMTA, AcOH, reflusso	2 ore	30%	HMTA, AcOH, 120°C	15 min	75%
<b>39</b>	HMTA, AcOH, reflusso	2 ore	28%	HMTA, AcOH, 120°C	15 min	69%

**Tabella 1.** Confronto sintesi convenzionale vs. sintesi assistita da microonde per i composti **33** e **39**.

I composti **40** e **41**, isomeri 3-bromoderivati con un nitrogruppo rispettivamente in posizione 6 ed 8, sono stati ottenuti sottoponendo a reazione di nitratura con acido nitrico in acido solforico il 3-bromoderivato **38** e separati mediante cromatografia.

Per la sintesi dei due isomeri **44** e **45** si è dapprima sottoposto il composto **32** a reazione di nitratura con acido nitrico in acido solforico ed i due isomeri **42** e **43** sono stati separati per cromatografia e sottoposti a bromurazione esaustiva con NBS in soluzione di acetonitrile a riflusso.

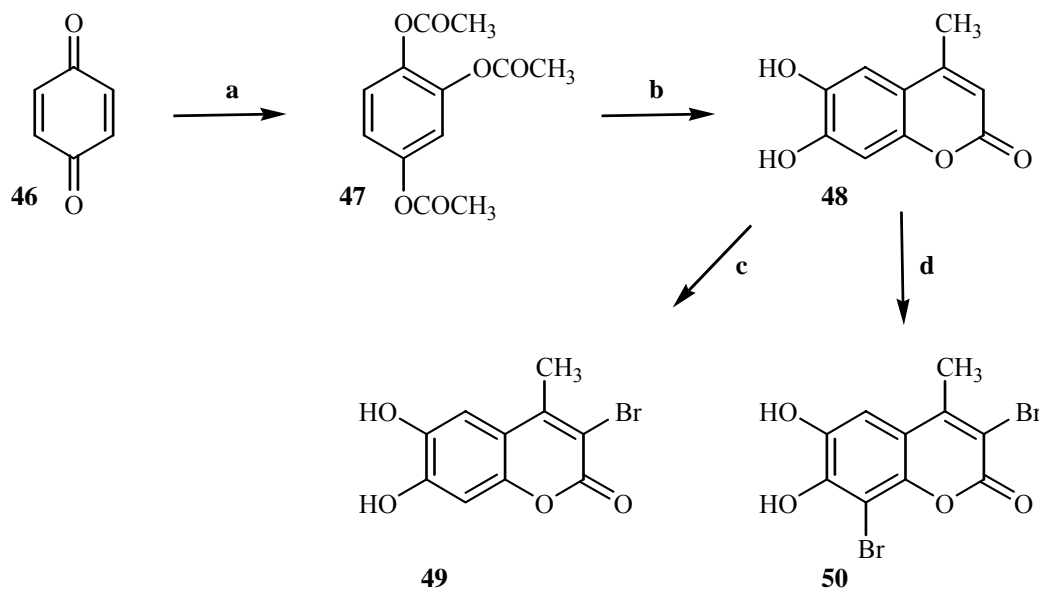


**Schema 9.** Sintesi di derivati coumarinici come inibitori CK2.

Condizioni di reazione Schema 9:

- Urotropina, AcOH, riflusso, 2 ore; resa: **33** 30%, **39** 28%.  
oppure  
Urotropina, AcOH, MW, 120°C, 15 min., resa: **33** 75%, **39** 69%.
- Idrossilamina cloridrato, MeOH, T amb., 2 ore; resa: **34** 55%, **37** 98%.
- 1) Ac<sub>2</sub>O, riflusso, 50 min;  
2) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc., AcOH, riflusso, 2 ore; resa **35** 18%, **36** 27%.
- Idrossilamina cloridrato, NMP, MW, 12 min., 140°C, resa **35** 81%, **36** 68%.
- Br<sub>2</sub>, AcOH, 60°C, resa: **37** 64%, **38** 12%.
- HNO<sub>3</sub> 65%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc., 0°C, resa: **40** 40%, **41** 40%, **42** 41%, **43** 42%.
- NBS, CH<sub>3</sub>CN, riflusso, 2 ore, **44** 95%, **45** 87%.

La 3,8-dibromo-6,7-diidrossi-4-metilcumarina (**50**) è stata ottenuta per bromurazione esaustiva della 6,7-diidrossi-4-metilcumarina (**48**) (Schema 10) mentre la 3-bromo-6,7-diidrossi-4-metilcumarina (**49**) è stata preparata per bromurazione regioselettiva in posizione 3 del nucleo di partenza **48** per trattamento con bromo in soluzione acetica a temperatura ambiente. La diidrossicumarina **48** è stata preparata partendo dall'1,4-benzochinone (**46**) che per reazione con anidride acetica in acido solforico ha fornito l'1,2,4-triacetossibenzene (**47**) che è stato successivamente sottoposto a condensazione di Pechmann con etile acetoacetato.

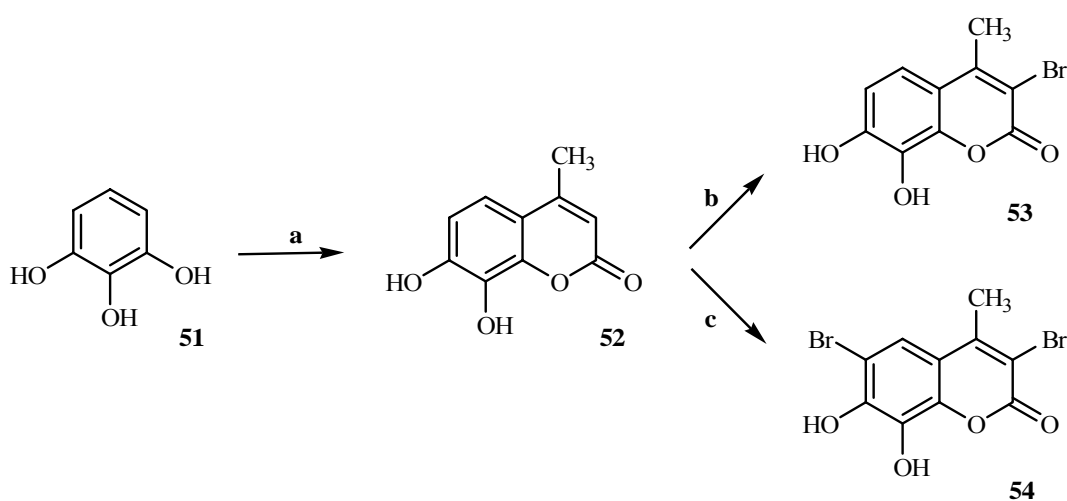


**Schema 10.** Sintesi di bromoderivati della 6,7-diidrossi-4-metilcumarina.

Condizioni di reazione:

- Ac<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 45°C, 30 min., resa 29%.
- Etile acetoacetato, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc., riflusso, 2 ore, resa 40%.
- Br<sub>2</sub>, AcOH, T amb., 30 min., resa 92%.
- Br<sub>2</sub>, AcOH, 60°C, 30 min., resa 61%.

Nello Schema 11 è riportata la via sintetica seguita per ottenere la 3-bromo-7,8-idrossi-4-metilcumarina (**53**) e la 3,6-dibromo-7,8-diidrossi-4-metilcumarina (**54**). La 7,8-diidrossi-4-metilcumarina (**52**) è stata preparata per condensazione di Pechmann di pirogallolo (**51**) ed etile acetoacetato. Il composto **52** per lenta aggiunta della quantità stechiometrica di bromo ha fornito il prodotto di monobromurazione in 3, 3-bromo-7,8-diidrossi-4-metilcumarina (**53**), mentre per bromurazione con eccesso di bromo ha fornito il prodotto di dibromurazione, 3,6-dibromo-7,8-diidrossi-4-metilcumarina (**54**).



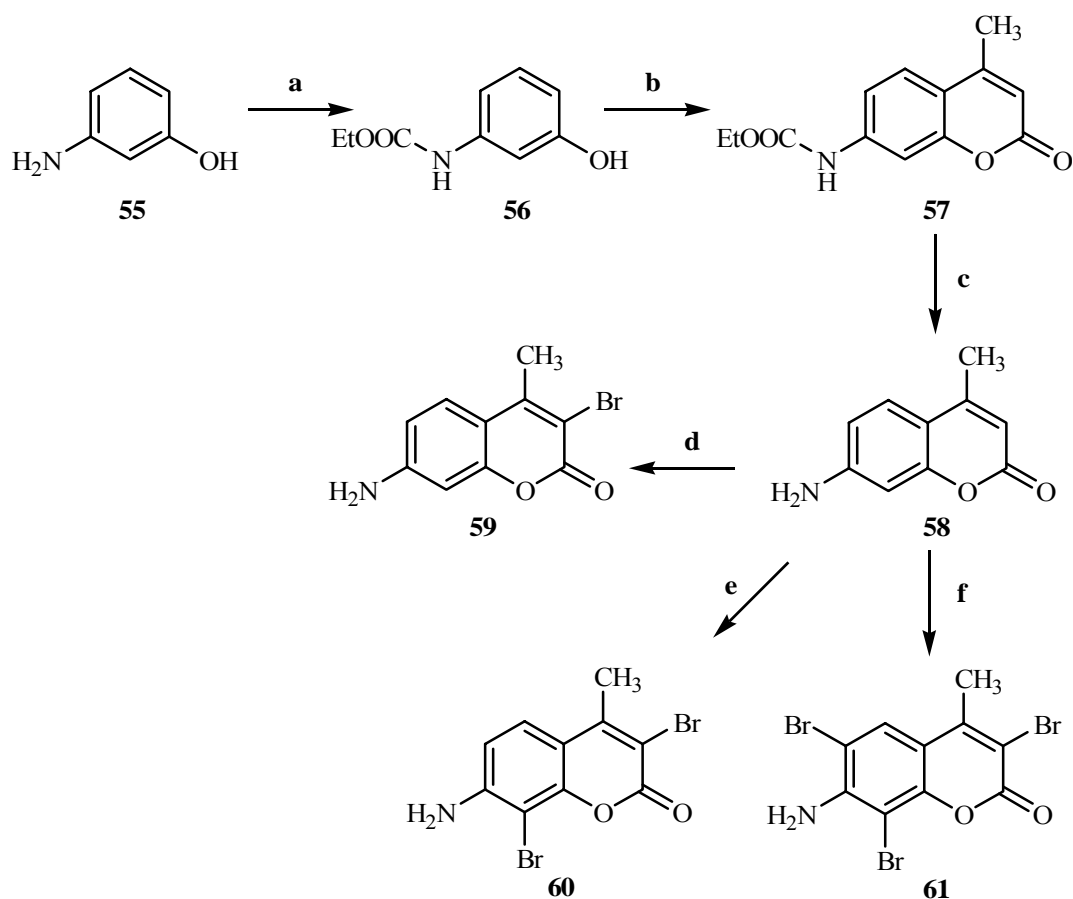
**Schema 11.** Sintesi di bromoderivati 7,8-diidrossicumarinici.

- a) Etile acetoacetato, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc., 0°C, 15 min., resa 59%.
- b) Br<sub>2</sub> ( rapporto molare 1:1), AcOH, 60°C, 10 min., resa 51%.
- c) Br<sub>2</sub> ( rapporto molare 2:1), AcOH, 60°C, 1 ora, resa 52%.

#### 5.2.2.2 SOSTITUZIONI NELLA POSIZIONE 7 DEL NUCLEO CUMARINICO<sup>22</sup>

La sintesi della 7-amino-3,8-dibromo-4-metilcumarina (**60**) (Schema 12), analogo della DBC con la sostituzione del gruppo ossidrilico con un gruppo amminico, è stata effettuata partendo dal 3-aminofenolo (**55**). Per protezione del gruppo amminico con etile cloroformiato è stato ottenuto l'etile (3-idrossifenil)carbammato (**56**) che è stato condensato con etile acetoacetato in acido solforico ottenendo l'etile (4-metilcumarin-7-il)carbammato (**57**). Il composto **57** è stato successivamente idrolizzato con acido solforico in soluzione di acido acetico a riflusso ottenendo la 7-amino-4-metilcumarina (**58**). Il composto **58** è stato infine

dibromurato per reazione con bromo elementare in quantità stechiometrica ottenendo la 7-amino-3,8-dibromo-4-metilcumarina (**60**). Dal composto **58** sono stati anche ottenuti per bromurazione con NBS a temperatura ambiente in acetonitrile il composto **59** e, per bromurazione esaustiva con bromo elementare in eccesso a 60°C, il composto **61**.

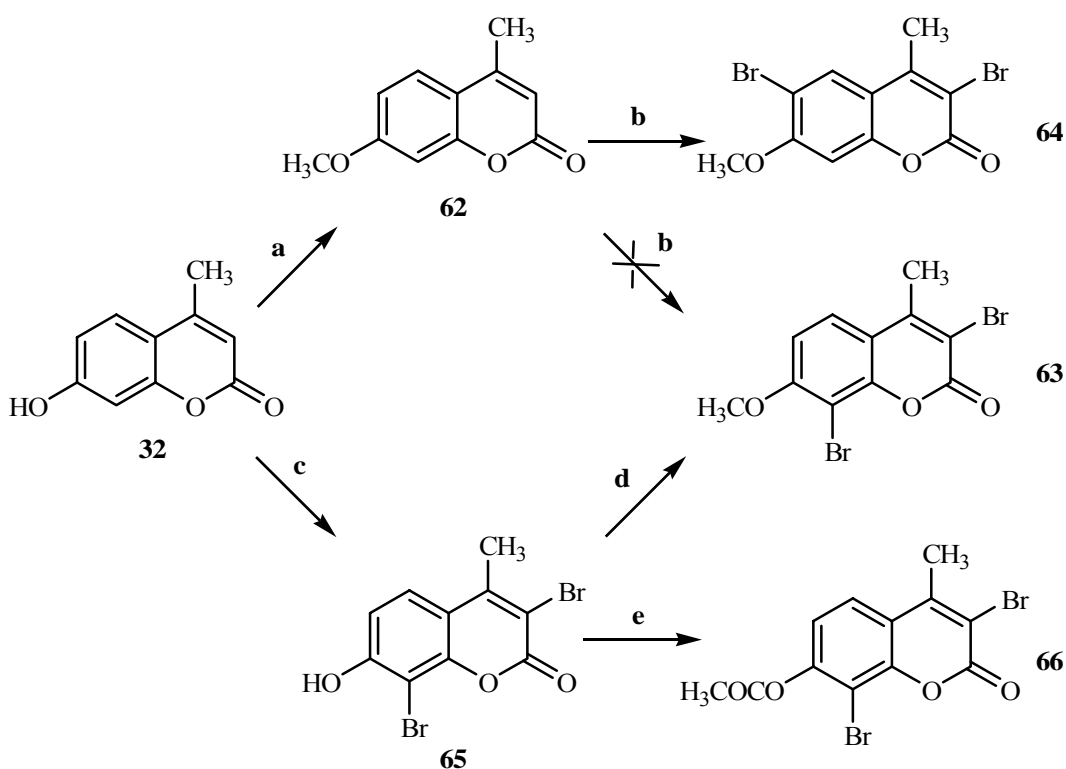


**Schema 12.** Sintesi di 7-amino-3,8-dibromo-4-metilcumarina (**58**).

Condizioni di reazione:

- Etile cloroformiato, THF, T amb., 1 ora, resa 56%.
- Etile acetoacetato, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70%, T amb., 5 ore, resa 85%.
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, AcOH, riflusso, 5 ore, resa 83%.
- NBS, CH<sub>3</sub>CN, T amb., 20 min., resa 66%.
- Br<sub>2</sub>, AcOH, 60°C, 1 ora, resa 14%.
- Br<sub>2</sub>, AcOH, 60°C, 3 ore, resa 44%.

Per ottenere il 3,8-dibromo-7-metossi-4-metilcumarina (**63**), analogo metossilato in posizione 7 del lead compound cumarinico (DBC), si è tentato (Schema 13) dapprima di metilare con iodometano l'ossidrilico in posizione 7 del 4-metilumbelliferone (**32**) ottenendo il composto **62** e sottoponendo quest'ultimo a bromurazione con bromo elementare ottenendo però esclusivamente la 3,6-dibromo-7-metossi-4-metilcumarina (**64**) isomero del prodotto desiderato **63**. Questo è stato invece ottenuto per metilazione del gruppo ossidrilico della DBC (**65**), ottenuta per reazione di bromurazione del composto **32**. Per reazione di acetilazione del composto **65** si è ottenuto il derivato 7-acetossilato della DBC (**66**).



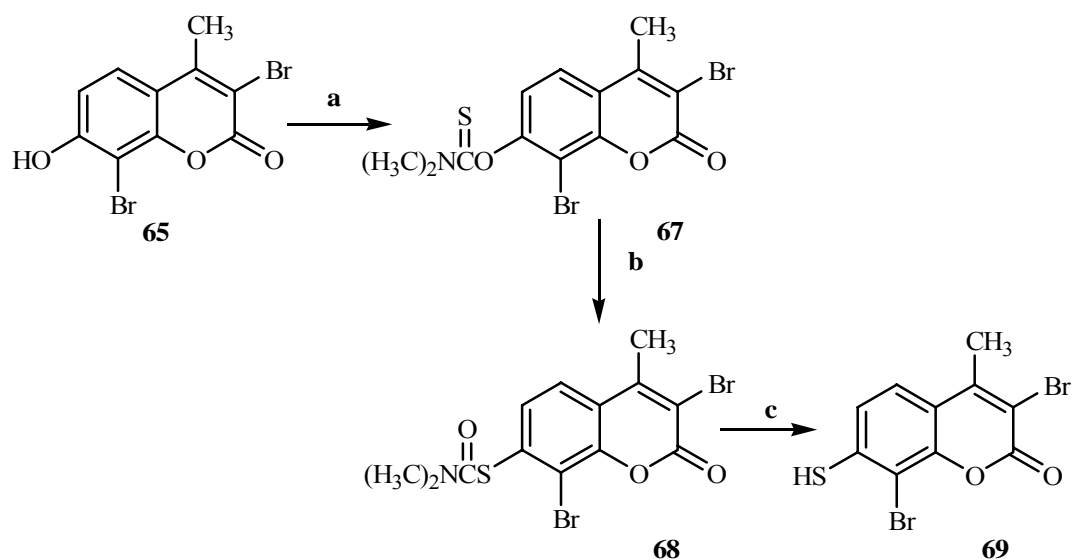
**Schema 13.** Sintesi di bromocumarine 7-sostituite.

Condizioni di reazione:

- $\text{CH}_3\text{I}$ , acetone,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , T amb., 3 ore, resa quantitativa.
- $\text{Br}_2$ , AcOH,  $60^\circ\text{C}$ , 2 ore, resa 76%.
- $\text{Br}_2$ , AcOH,  $60^\circ\text{C}$ , 3 ore, resa 48%.
- $\text{CH}_3\text{I}$ , acetone,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , T amb., resa quantitativa.
- $\text{Ac}_2\text{O}$ , sodio acetato, riflusso, 1 ora, resa 58%.



Il composto **67** (Schema 14), ottenuto facendo reagire la DBC (**65**) con dimetiltiocarbamoil cloruro, è stato sottoposto a riarrangiamento per fusione ottenendo così l'intermedio **68**, il quale è stato sottoposto ad idrolisi in ambiente acido portando alla formazione della 3,8-dibromo-4-metil-7-tiolcumarina (**69**).



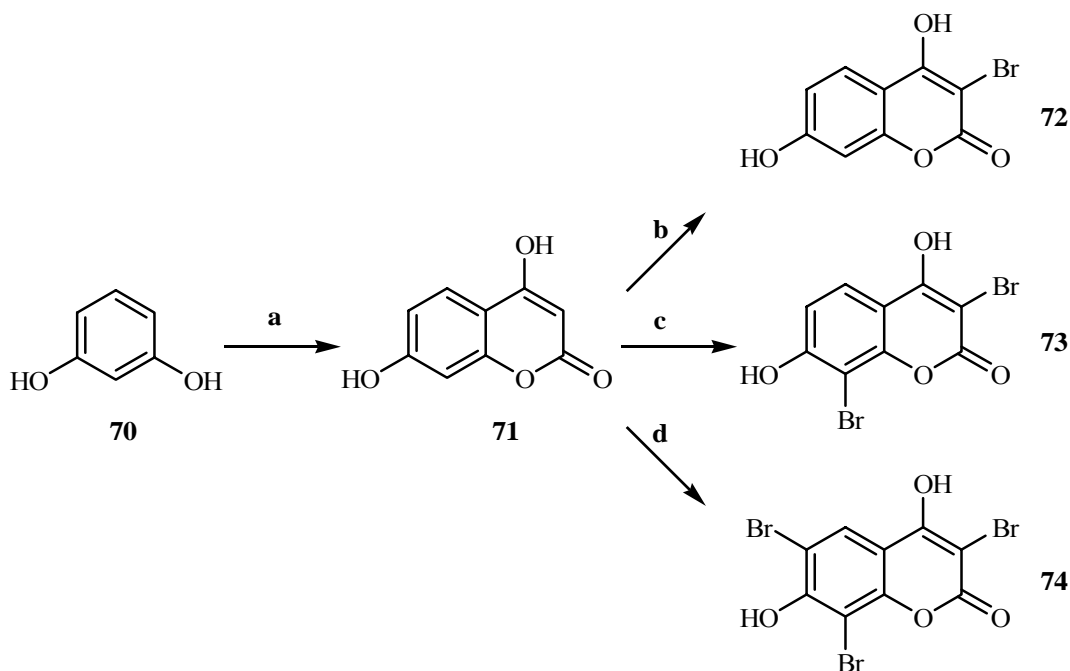
**Schema 14.** Sintesi di 3,8-dibromo-4-metil-7-tiolcumarina (**69**).

Condizioni di reazione:

- Dimetiltiocarbamoil cloruro,  $K_2CO_3$ , acetone, riflusso, 2 ore, resa 80%.
- Fusione, 10 min., resa quantitativa.
- $H_2SO_4$  conc., AcOH, riflusso, 1 ora, resa 79%.

### 5.2.2.3 SOSTITUZIONE NELLA POSIZIONE 4 DEL NUCLEO CUMARINICO

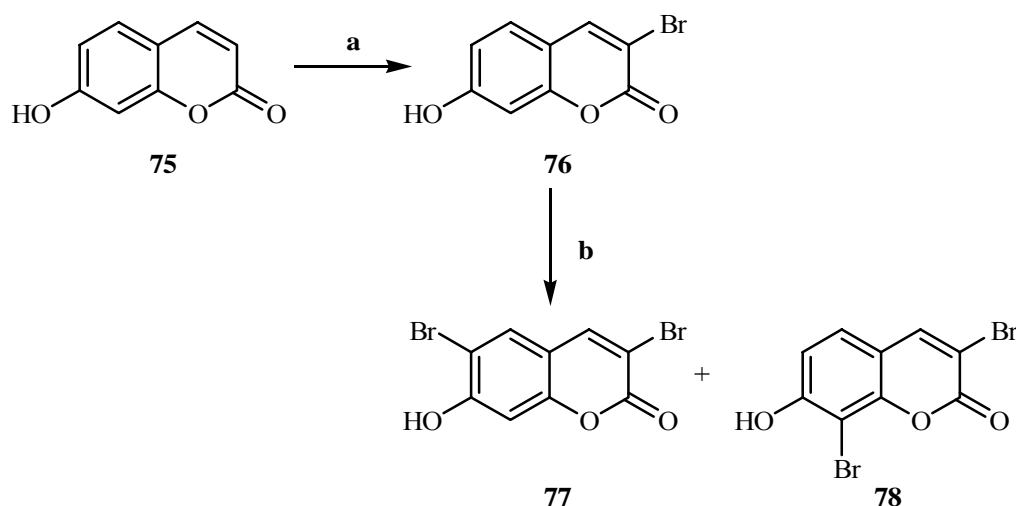
La 4,7-diidrossicumarina **71** (Schema 15) è stata sintetizzata sottoponendo a reazione di Pechmann con acido malonico la resorcina<sup>22</sup> (**70**). Il prodotto **71** è stato sottoposto a reazione di bromurazione con bromo elementare con diversi rapporti stechiometrici per ottenere i prodotti desiderati: 3-bromo-7-idrossi-4,7-diidrossicumarina (**72**), 3,8-dibromo-7-idrossi-4,7-diidrossicumarina (**73**), 3,6,8-tribromo-7-idrossi-4,7-diidrossicumarina (**74**); chiaramente la posizione 3 è la prima ad essere bromurata, successivamente si bromura la posizione 8 e per bromurazione esaustiva si bromurano le posizioni 3, 6 ed 8.



**Schema 15.** Sintesi di bromoderivati 4,7-diidrossicumarinici.

- Acido malonico,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{POCl}_3$ ,  $75^\circ\text{C}$ , 3 ore, resa 18%.
- $\text{Br}_2$  (rapporto molare 1:1),  $\text{AcOH}$ ,  $60^\circ\text{C}$ , 3 ore, resa 43%.
- $\text{Br}_2$  (rapporto molare 2:1),  $\text{AcOH}$ ,  $50^\circ\text{C}$ , 2 ore, resa 40%.
- $\text{Br}_2$  (rapporto molare 3:1),  $\text{AcOH}$ ,  $60^\circ\text{C}$ , 3 ore, resa 47%.

Per reazione di bromurazione con bromo elementare dell'umbelliferone (**75**) (Schema 16) in soluzione di acido acetico è stata ottenuta la 3-bromo-7-idrossicumarina (**76**) in quanto la posizione maggiormente attivata per la sostituzione con bromo risulta essere quella vinilica in 3. La 3,6-dibromo-7-idrossicumarina (**77**) e la 3,8-dibromo-7-idrossicumarina (**78**) sono state ottenute dalla reazione di bromurazione del composto **76** per lenta aggiunta di bromo elementare in acetonitrile fino a scomparsa del prodotto di partenza in quanto la polibromurazione diretta del nucleo di base **75** porta a miscele di reazione con più prodotti difficilmente separabili per cristallizzazione o cromatografia. Il derivato esaustivamente bromurato dell'umbelliferone non è stato preparato in quanto precedentemente già sintetizzato e saggiato su CK2.



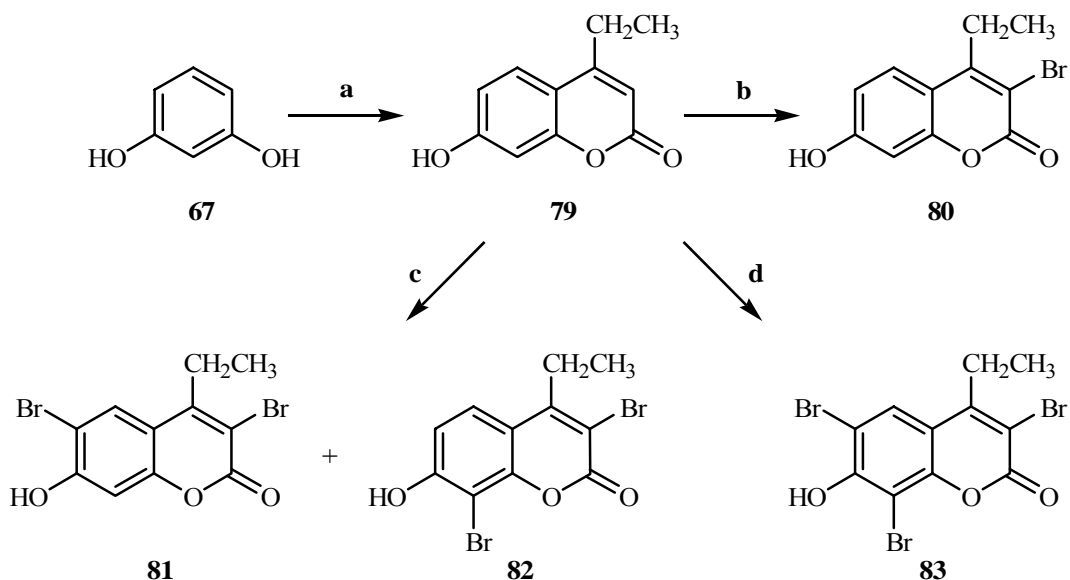
**Schema 16.** Sintesi di bromocumarine non sostituite in posizione 4.

Condizioni di reazione:

- a) Br<sub>2</sub>, AcOH, 60°C, resa 40%.
- b) Br<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN, 60°C, resa: **77** 18%, **78** 15%.

La 4-etil-7-idrossicumarina (**79**) (Schema 17) è stata preparata dal resorcinolo (**70**) per condensazione di Pechmann con etile propionilacetato. La 3-bromo-4-etil-7-idrossicumarina (**80**) è stata ottenuta per bromurazione della 4-etil-7-idrossicumarina (**79**). I due isomeri 3,6-dibromo-4-etil-7-idrossicumarina (**81**) e 3,8-dibromo-4-etil-7-idrossicumarina (**82**) sono stati ottenuti per bromurazione del composto **79** aggiungendo molto lentamente bromo elementare diluito fino a scomparsa del prodotto di partenza e separati mediante cromatografia. La lenta addizione di bromo è necessaria per ridurre la contemporanea formazione del

prodotto trisostituito **83**. La 3,6,8-tribromo-4-etil-7-idrossicumarina (**83**) è stata sintetizzata a partire dal composto **79** mediante bromurazione esaustiva in acido acetico.



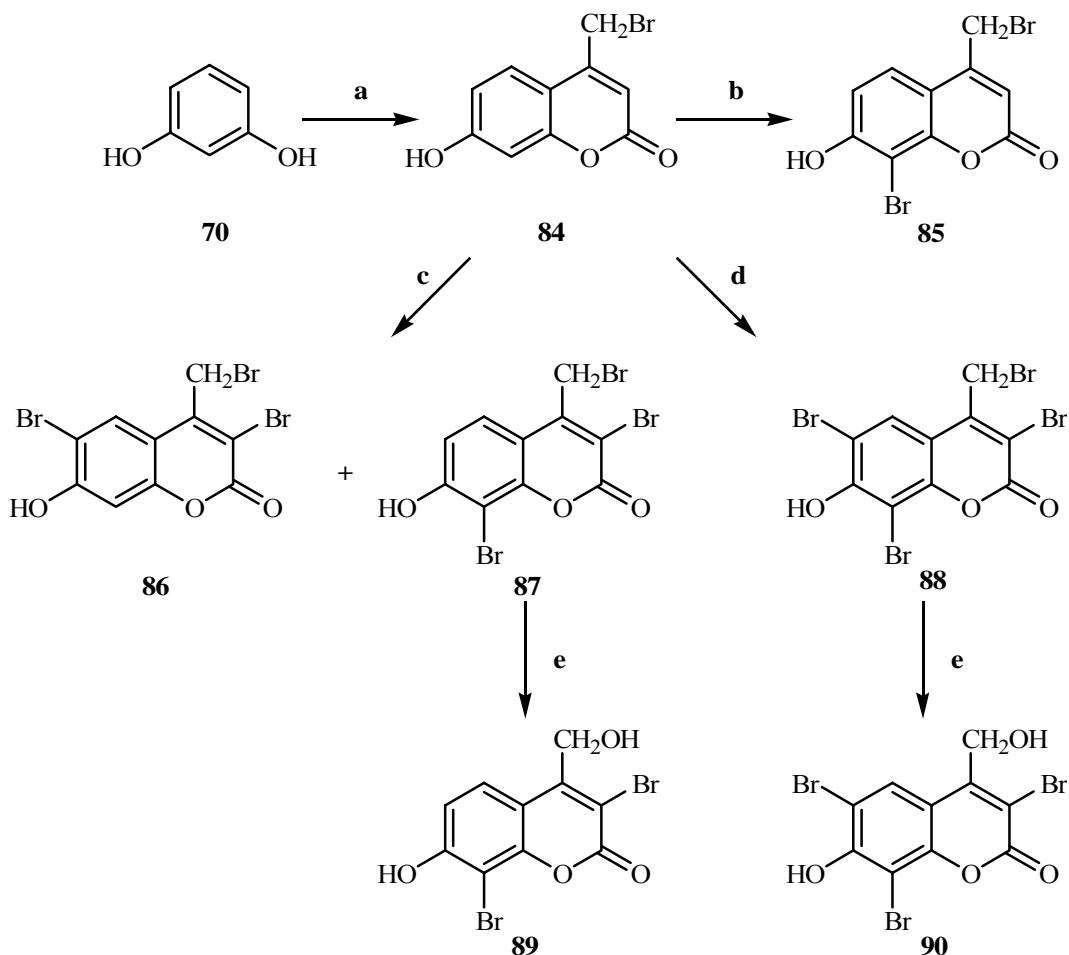
**Schema 17.** Sintesi di bromoderivati 4-etil-7-idrossicumarinici.

Condizioni di reazione:

- a) Etile propionilacetato, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, riflusso, 1 ora, resa 90%.
- b) Br<sub>2</sub>, AcOH, 60°C, 2 ore, resa 58%.
- c) Br<sub>2</sub>, AcOH, 60°C, resa: **81** 18%, **82** 11%.
- d) Br<sub>2</sub>, AcOH, 60°C, 1 ora, resa 89%.

La 4-bromometil-7-idrossicumarina (**84**) (Schema 18) è stata preparata dal resorcinolo (**70**) per condensazione di Pechmann con 4-bromoacetoacetato di etile, preparato a sua volta per reazione con bromo a temperatura ambiente dell'acetoacetato di etile. La 8-bromo-4-bromometil-7-idrossicumarina (**85**) è stata sintetizzata per bromurazione del composto **84**, per lenta aggiunta di bromo diluito in acetonitrile fino a scomparsa del prodotto di partenza, mantenendo la temperatura a 0-5°C. La 3,6-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina (**86**) e la 3,8-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina (**87**) sono state ottenute per bromurazione del composto **84** aggiungendo goccia a goccia bromo elementare diluito in acetonitrile a temperatura ambiente ed i due isomeri sono stati isolati mediante cromatografia su colonna. La 3,6,8-tribromo-4-bromometil-7-

idrossicumarina (**88**) è stata preparata dalla cumarina di partenza **84** per bromurazione esaustiva con bromo elementare in acido acetico.



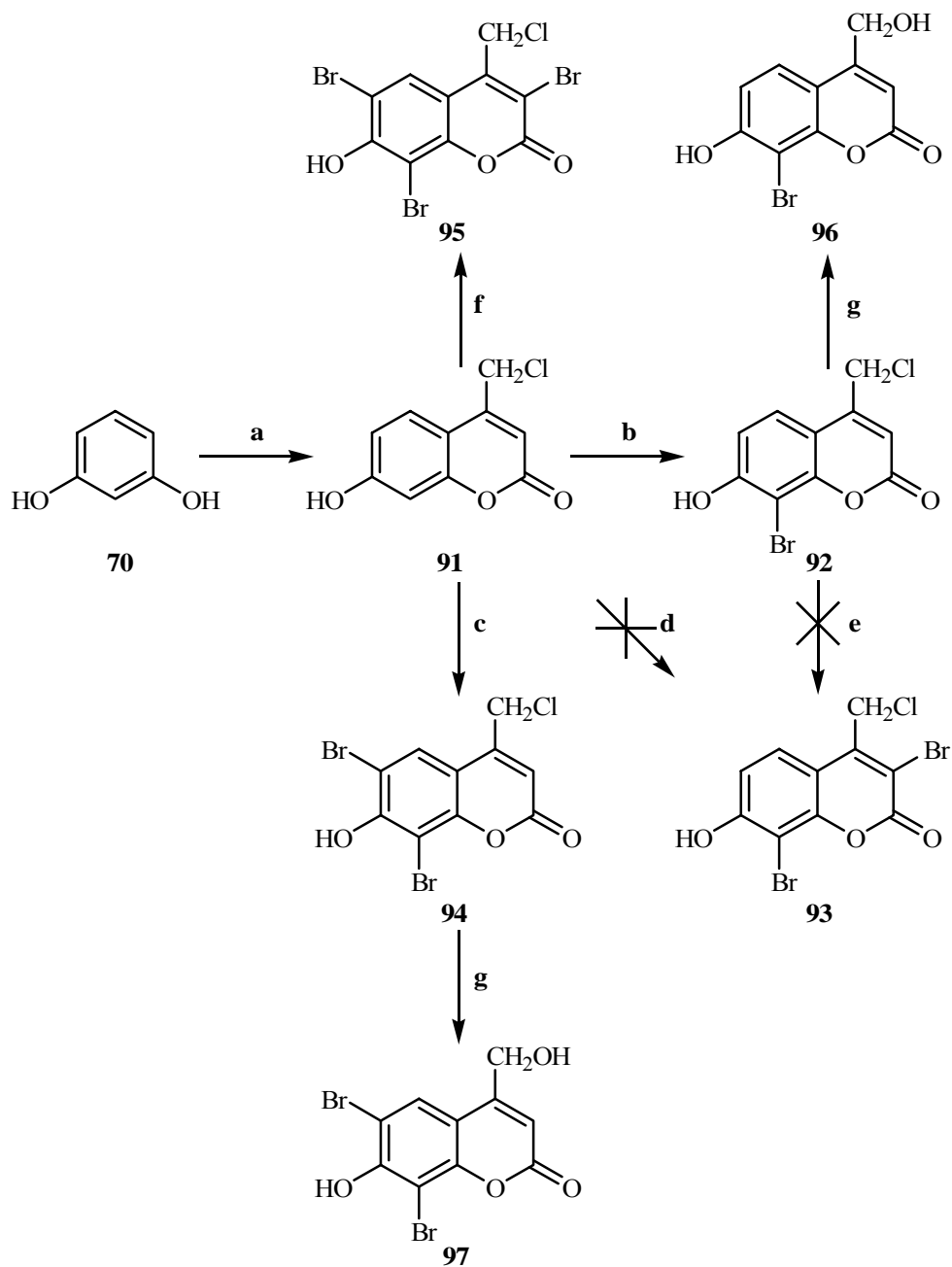
**Schema 18.** Sintesi di bromo-4-bromometilcumarine e bromo-4-idrossimetilcumarine.

Condizioni di reazione:

- 4-Bromoacetato di etile,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , T amb., 1 ora, resa 45%.
- $\text{Br}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $0-5^\circ\text{C}$ , resa 24%.
- $\text{Br}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , T amb., resa: **86** 17% , **87** 25%.
- $\text{Br}_2$ ,  $\text{AcOH}$ ,  $50^\circ\text{C}$ , 2 ore, resa 89%.
- $\text{H}_2\text{O}$ , MW,  $150^\circ\text{C}$ , 15 min., resa quantitativa.

La 4-clorometil-7-idrossicumarina (**91**) è stata preparata dal resorcinolo (**70**) per condensazione di Pechmann con il 4-cloroacetato di etile (Schema 19). Per bromurazione del composto **91** con bromo elementare diluito in acetonitrile ed in bagno di ghiaccio è stata ottenuta la 8-bromo-4-clorometil-7-idrossicumarina (**92**), mentre per reazione di bromurazione a temperatura ambiente ed in soluzione

cloroformica del composto **91** si è ottenuta la 6,8-dibromo-4-clorometil-7-idrossicumarina (**94**).

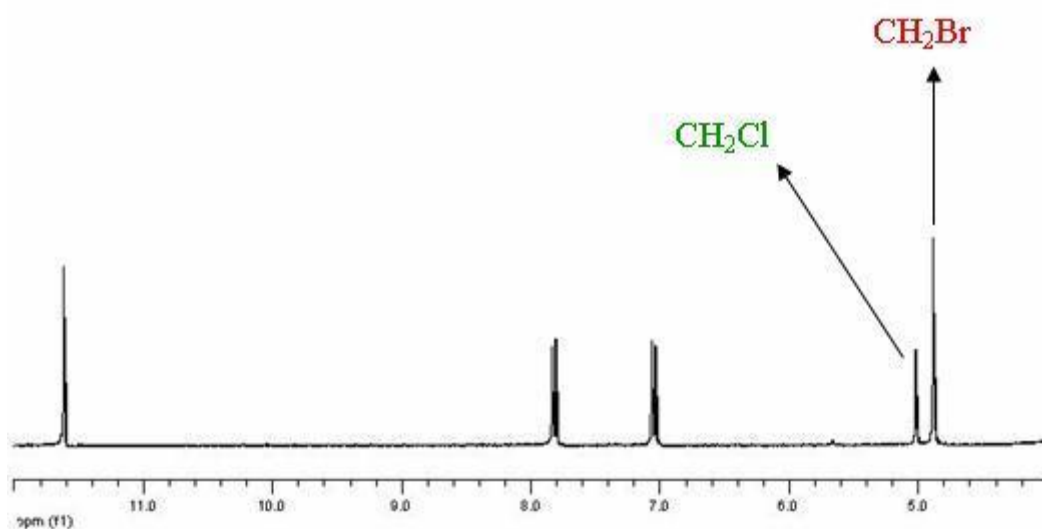


**Schema 19.** Sintesi di bromo-4-clorometilcumarine e bromo-4-idrossimeticumarine.

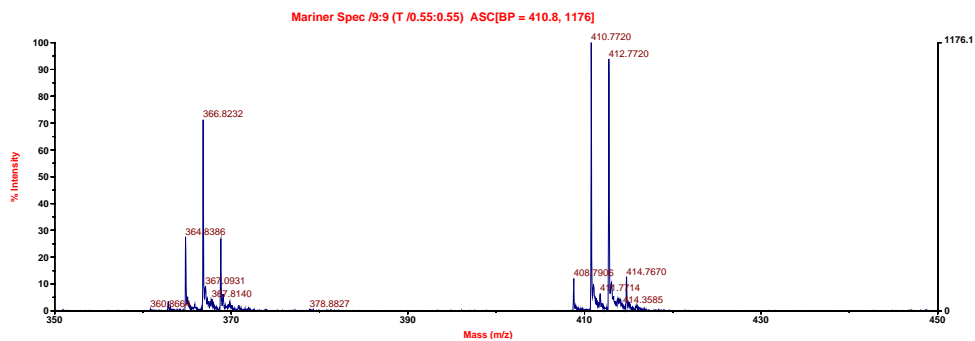
Condizioni di reazione:

- 4-Cloroacetoacetato di etile,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , T amb., 1 ora, resa 48%.
- $\text{Br}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $0-5^\circ\text{C}$ , resa 39%.
- $\text{Br}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ , T amb., resa 65%.
- $\text{Br}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , diverse condizioni.
- $\text{Br}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $0-5^\circ\text{C}$ .
- NBS,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , riflusso, 2 ore, resa 92%.
- $\text{H}_2\text{O}$ , MW,  $150^\circ\text{C}$ , 15 minuti, resa: **96** quantitativa, **97** quantitativa.

Per ottenere il composto **93** dibromurato nelle posizione 3 ed 8 sono state tentate diverse strategie sintetiche: si sono variate sia le condizioni di reazione modificando le temperature ed i tempi di aggiunta del bromo diluito, sia i prodotti di partenza (sono stati impiegati i composti **91** e **92**). Si è cercato infatti di favorire la sostituzione del bromo in posizione 3 rispetto alla sostituzione dello stesso in posizione 6, ma nella maggior parte delle reazioni eseguite sono state ottenute miscele di reazione spesso alquanto complesse e le reazioni sono state così abbandonate. Il composto desiderato **93** si forma addizionando molto lentamente una soluzione diluita di bromo (una settimana) ma si è osservata la formazione come sottoprodotto del composto **87** per sostituzione del cloro clorometilenico con un atomo di bromo ed i due prodotti ( $^1\text{H-NMR}$  ed HRMS sono riportati in Figura 20 ed 21) sono risultati non separabili né per cromatografia né per cristallizzazione. La 3,6,8-tribromo-4-clorometil-7-idrossicumarina (**95**) è stata preparata bromurando esaustivamente il composto **91** con NBS.



**Figura 20.** Spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$  della miscela di 3,8-dibromo-4-clorometil-7-idrossicumarina (**93**) e 3,8-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina (**87**).

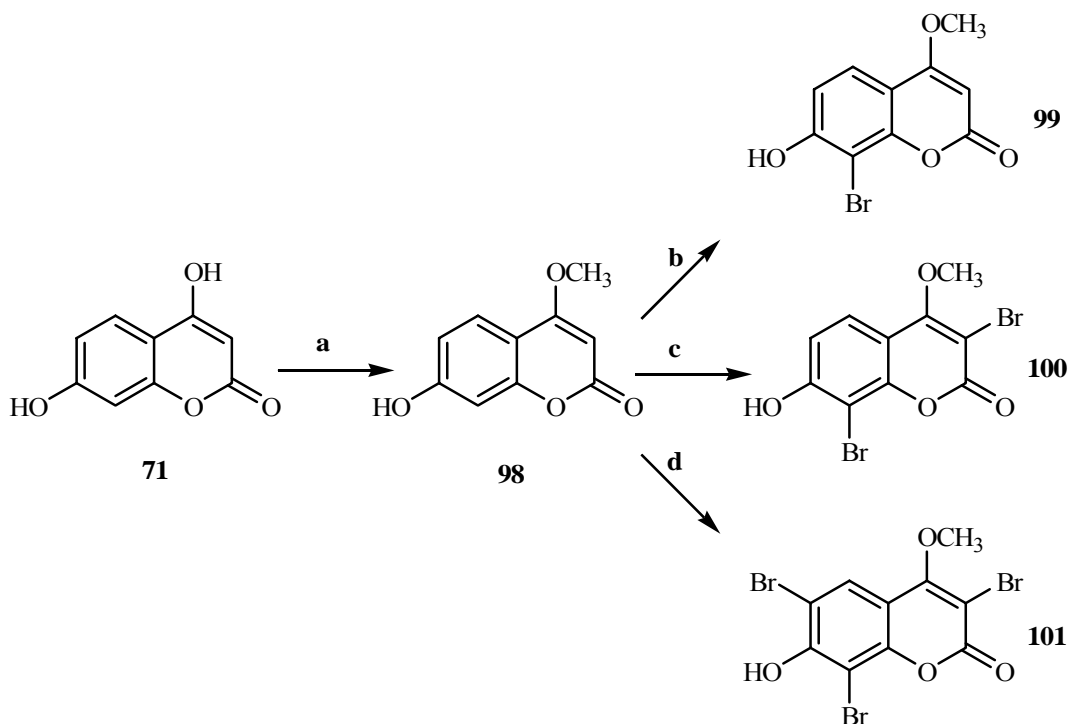


**Figura 21.** Spettroscopia HMRS in negativo della miscela di 3,8-dibromo-4-clorometil-7-idrossicumarina (**93**) e 3,8-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina (**87**).

I prodotti 4-idrossimetilici (Schema 18 e Schema 19) **89**, **90**, **96**, **97**, sono stati ottenuti dai rispettivi 4-alometilderivati **87**, **88**, **92**, **94**, utilizzando la sintesi assistita da microonde che ha consentito, confrontando i dati ottenuti con altri presenti in letteratura<sup>23</sup> per composti analoghi, di ridurre notevolmente i tempi di reazione (da 14 ore a circa 15 minuti) e di semplificare il work-up della reazione pur mantenendo paragonabili le rese.

Per la preparazione della 7-idrossi-4-metossicumarina (**98**) (Schema 20) è stato utilizzato come prodotto di partenza la 4,7-diidrossicumarina (**71**), che è stata sottoposta a reazione di metilazione selettiva<sup>24</sup> in posizione 4 per riflusso con metanolo in ambiente acido per acido solforico. La 8-bromo-7-idrossi-4-metossicumarina (**99**) e poi la 3,8-dibromo-7-idrossi-4-metossicumarina (**100**) sono state ottenute dal composto **98** per lenta aggiunta di una soluzione diluita di bromo elementare in acido acetico a diverse temperature.





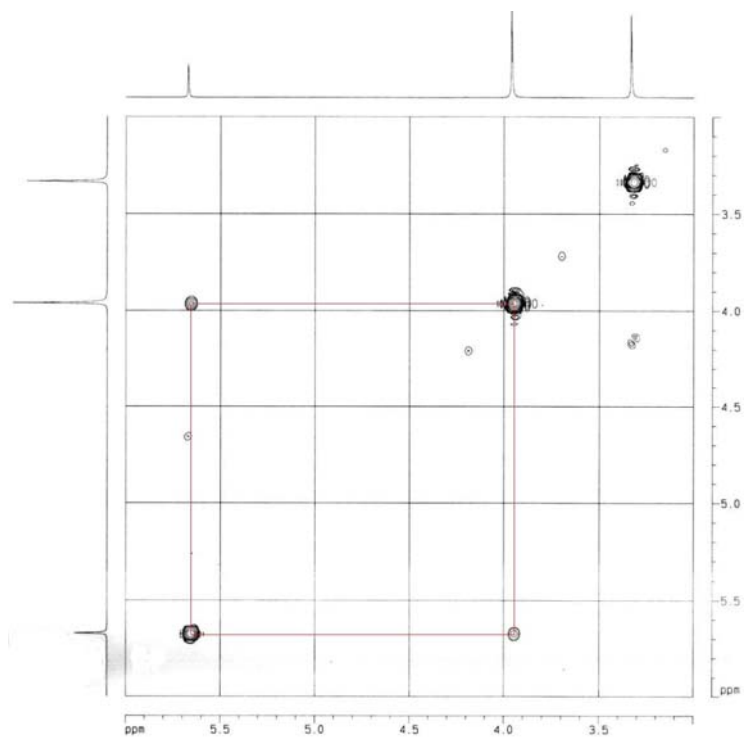
**Schema 20.** Sintesi di bromo-4-metossicumarine.

Condizioni di reazione:

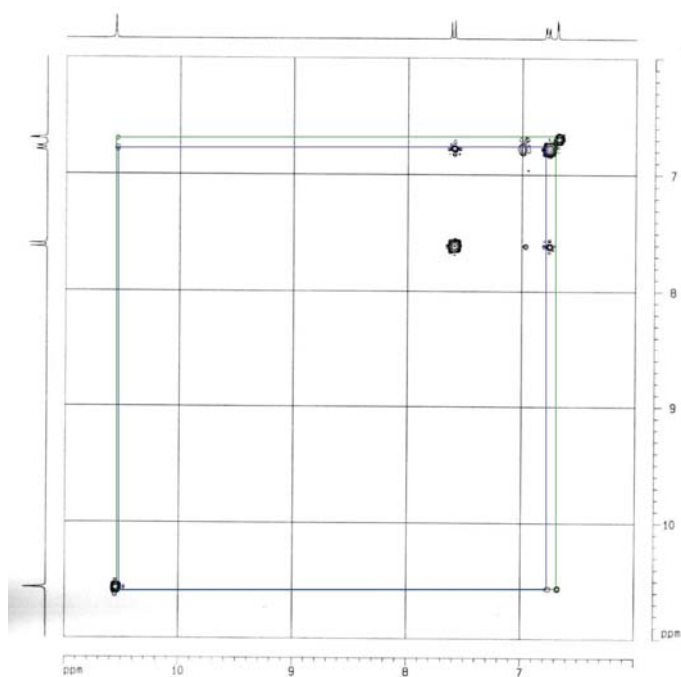
- a)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , MeOH, riflusso, 3 ore, resa 60%.
- b)  $\text{Br}_2$ , AcOH,  $60^\circ\text{C}$ , 2 ore, resa 19%.
- c)  $\text{Br}_2$ , AcOH, T amb., resa 23%.
- d) NBS,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , T amb., 1 ora, resa 88%.

La 3,6,8-tribromo-7-idrossi-4-metossicumarina (**101**) è stata ottenuta per bromurazione esaustiva del composto **98** con NBS in soluzione di acetonitrile.

La struttura del composto **98** è stata confermata mediante NOESY per verificare l'esatta posizione del gruppo metossilico che è risultato essere effettivamente in posizione 4 in quanto si osserva un cross-peak (in rosso) tra il segnale a 3.96 del gruppo metossilico ed il segnale a 5.67 del protone in posizione 3 (Figura 22) ed ulteriormente confermato dai cross-peaks tra il segnale del protone ossidrilico a 10.56 ed i segnali dei protoni in posizione 6 a 6.78 (in blu) ed 8 a 6.69 (in verde) (Figura 23).

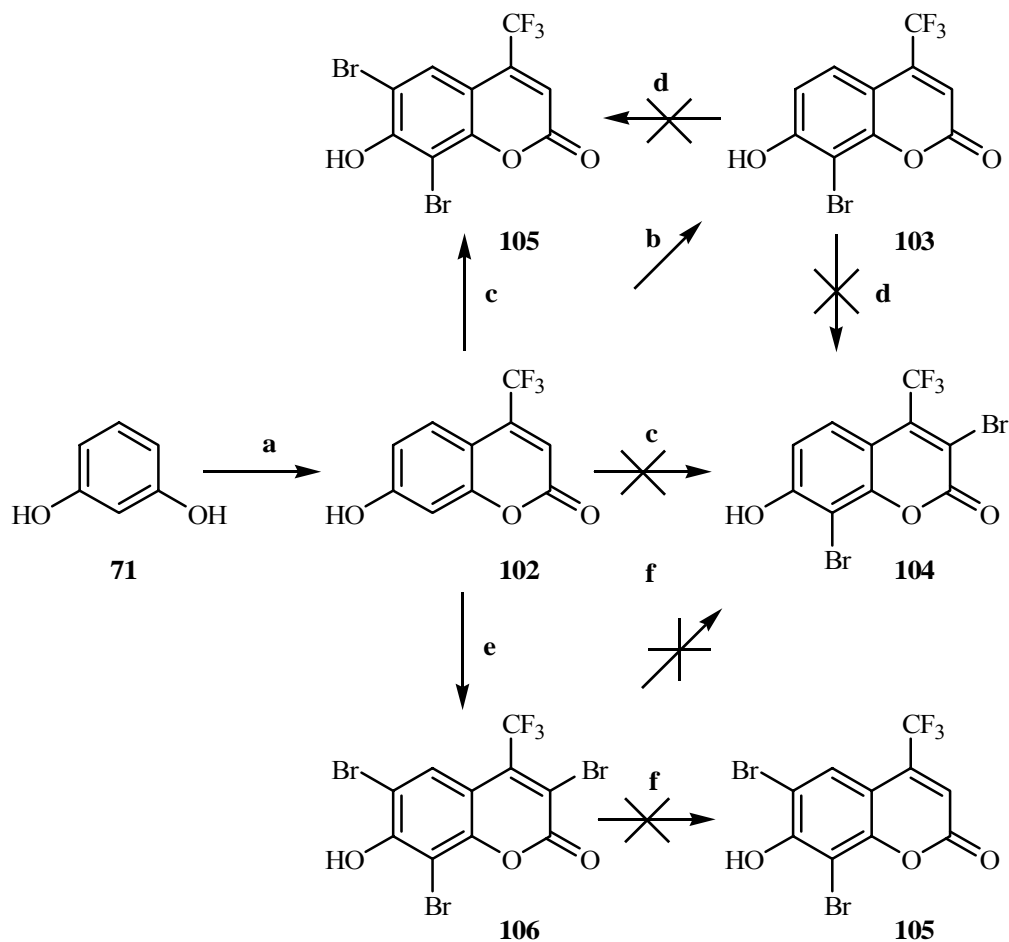


**Figura 22.** Spettro NOESY di 7-idrossi-4-metossicumarina (**98**): cross-peak tra i segnali del metossile in 4 e del protone in 3.



**Figura 23.** Spettro NOESY di 7-idrossi-4-metossicumarina (**98**): cross-peak tra il segnale dell'ossidril in 7 ed i segnali dei protoni in 6 (blu) ed 8 (verde).

Nello Schema 21 è riportata la via di sintesi seguita per ottenere i bromoderivati della 7-idrossi-4-trifluorometilcumarina (**102**).



**Schema 21.** Sintesi di bromo-4-trifluorometilcumarine.

Condizioni di reazione:

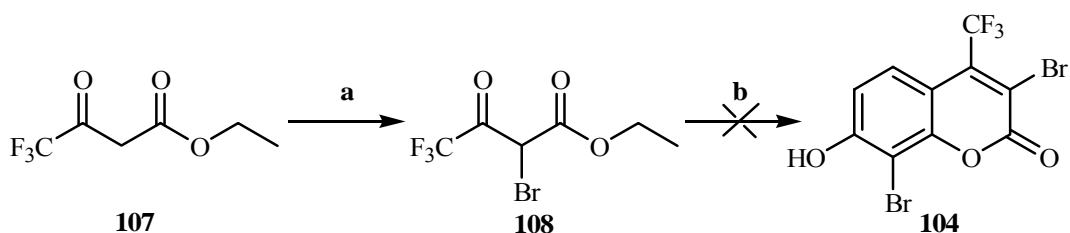
- Trifluoroacetoacetato d'etile, TFA, riflusso, 3 ore, resa 56%.
- $\text{Br}_2$ , AcOH, T amb., 2 ore, resa 30%.
- $\text{Br}_2$ , AcOH, 60°C., resa 55%.
- $\text{Br}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , T amb., 1 ora, resa 77%.
- NBS,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , riflusso, 2 ore, resa 83%.
- $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , NaOH, acqua/MeOH, T amb., 30 min., resa quantitativa.

Il composto **102** è stato ottenuto per condensazione del resorcinolo (**70**) con trifluoroacetoacetato d'etile e successivamente sottoposto a reazione di bromurazione in acido acetico a temperatura ambiente ottenendo il composto **103** bromurato in posizione 8. Per reazione di bromurazione a temperatura ambiente in soluzione di acetonitrile si ottiene il composto 6,8-dibromo sostituito (**105**). La

3,6,8-tibromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina (**106**) è stata ottenuta per bromurazione esaustiva del composto **102** con NBS.

La preparazione del composto **104** è stata tentata per lenta bromurazione del composto **103** ma l'ingresso del bromo in posizione 3 non si è ottenuta pur variando temperature e solventi di reazione. L'ottenimento del composto **104** è stato tentato senza successo anche per reazione di eliminazione del bromo in posizione 6 con sodio solfito.

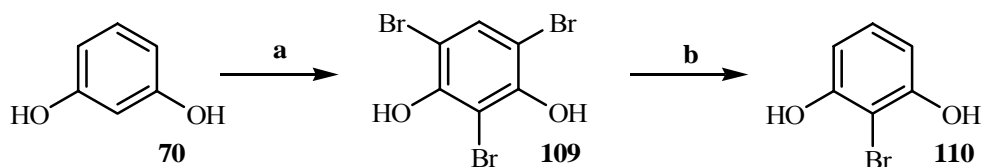
Per ottenere il composto **104** si è provata anche la condensazione di Pechmann tra il 2-bromotrifluoroacetato d'etile (**108**) (Schema 22), preparato per bromurazione del trifluoroacetato d'etile (**107**), ed il 2-bromoresorcinolo<sup>25</sup> (**110**) ma senza successo. Il composto **110** è stato preparato per debromurazione selettiva in posizione 4 e 6, utilizzando Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> in ambiente acquoso alcalino, del composto **109**, che è stato ottenuto per bromurazione esaustiva del resorcinolo (**70**) (Schema 23).



**Schema 22.** Tentativo di sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina (**103**).

Condizioni di reazione:

- a) 1) NaH, THF, 0°C.
- 2) Br<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, T amb., 3 ore, resa 94%.
- b) 2-Bromoresorcinolo, diverse condizioni.



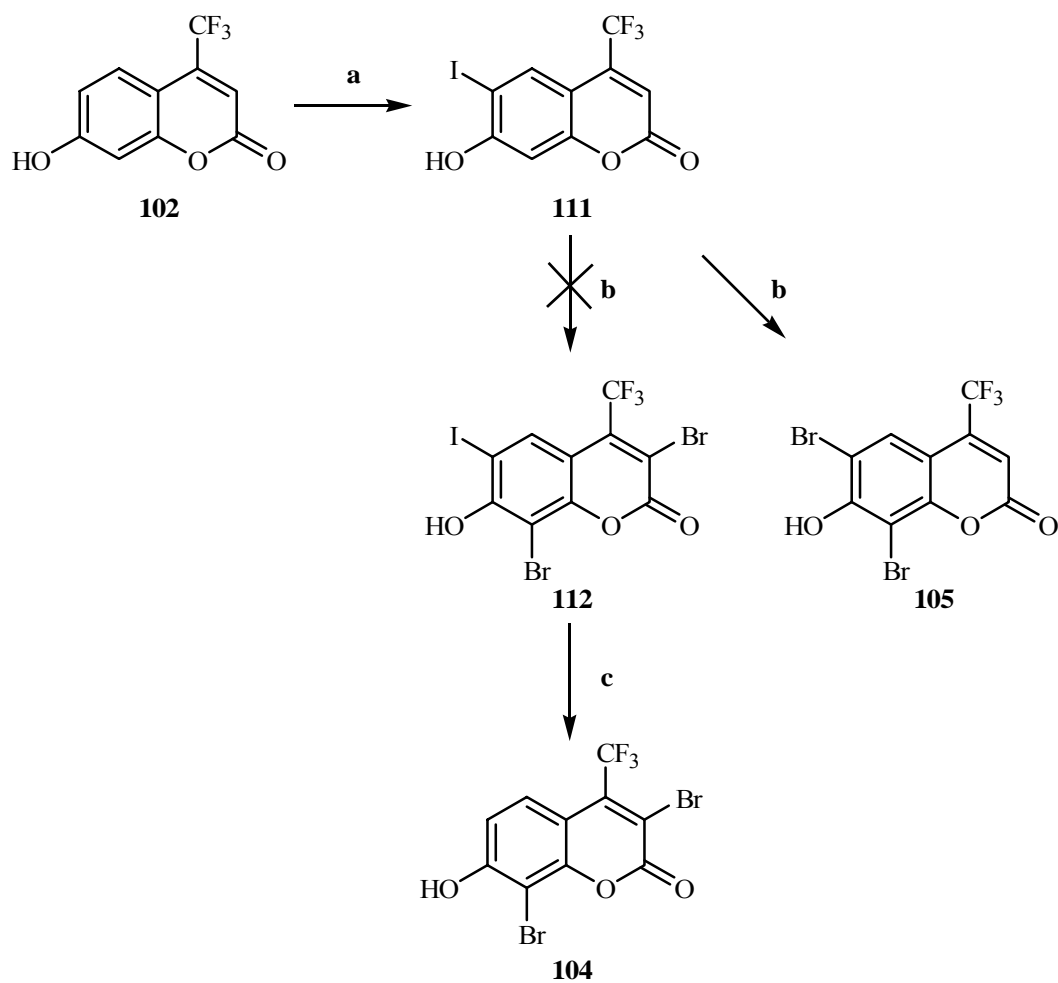
**Schema 23.** Sintesi di 2-bromoresorcinolo.

Condizioni di reazione:

- a) Br<sub>2</sub>, AcOH, 60°C, 4 ore, resa 71%.
- b) Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, NaOH, acqua/MeOH, T amb., 15 min., resa 92%.

Si è tentato di ottenere il composto **104** seguendo la strategia di sintesi riportata nello Schema 24. La 4-trifluorometil-7-idrossicumarina **102** è stata iodurata in

posizione 6 con iodio elementare in soluzione ammoniacale ottenendo il composto **111** il quale è stato sottoposto a reazione di bromurazione per ottenere il composto **112** che non è stato però ottenuto in quanto si ha sostituzione con bromo dello iodio in 6 ed ingresso di bromo nella posizione 8 prima dell'ingresso del bromo sulla posizione 3 del nucleo cumarinico.

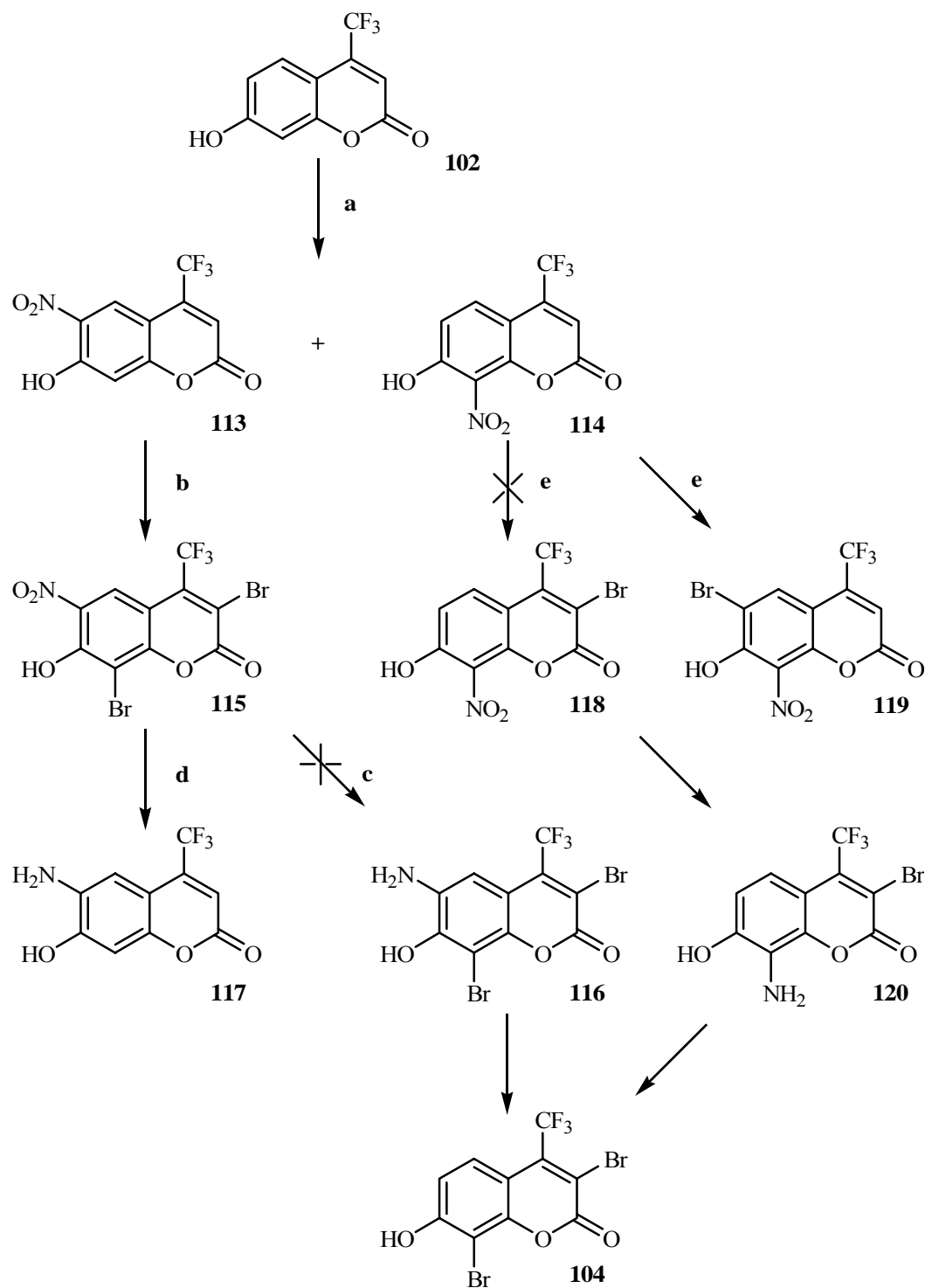


**Schema 24.** Tentativo di sintesi di 3,8-dibromo-7-iodossi-4-trifluorometilcumarina (**104**).

Condizioni di reazione:

- a)  $I_2$ , KI,  $NH_4OH$ , T amb., 1 ora, resa 43%.
- b)  $Br_2$ , AcOH, T amb., resa 80%.

Per provare a sintetizzare il composto **104** si sono seguite due ulteriori strategie sintetiche (Schema 25).



**Schema 25.** Tentativo di sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina (**104**).

Condizioni di reazione:

- $\text{HNO}_3$  65%,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc.,  $0^\circ\text{C}$ , resa: **113** 40%, **114** 31%.
- $\text{Br}_2$ , AcOH,  $60^\circ\text{C}$ , 1 ora, resa 94%.
- $\text{SnCl}_2$ , EtOH assoluto, riflusso, 1 ora;
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$  10%, T amb., 1 ora; oppure  $\text{H}_2$ , Pd/C, EtOH, T amb., resa quantitativa.
- $\text{Br}_2$ , AcOH,  $50^\circ\text{C}$ , 2 ore, resa 62%.

Per reazione di nitrificazione con acido nitrico in acido solforico della 7-idrossi-4-trifluorometilcumarina (**102**) si sono ottenuti i due nitroderivati isomeri **113** ed **114** nitrati rispettivamente nelle posizioni 6 ed 8 che sono stati separati mediante cromatografia su colonna. La 7-idrossi-6-nitro-4-trifluorometilcumarina (**113**) è stata sottoposta a reazione di bromurazione esaustiva con bromo elementare ottenendo la 3,8-dibromo-7-idrossi-6-nitro-4-trifluorometilcumarina (**115**).

Il composto **115** è stato sottoposto a diversi tentativi di riduzione per ottenere il composto **116** che hanno però portato, usando come riducente cloruro stannoso, alla formazione di una miscela complessa di prodotti, ed utilizzando come agenti riducenti sodio solfito od idrogeno, alla formazione della 6-amino-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina (**117**). Dalla 7-idrossi-8-nitro-4-trifluorometilcumarina (**114**) si è cercato di ottenere, seguendo un diverso percorso sintetico il composto **118** per reazione di bromurazione ma non si è ottenuto il prodotto desiderato bensì il prodotto **119** bromurato nella posizione 6.

## 5.3 DATI BIOLOGICI

L'attività inibitoria dei composti sintetizzati è stata valutata mediante saggi di inibizione sui rispettivi target enzimatici. Successivamente, con i composti rivelatisi più attivi nei confronti dell'enzima bersaglio, si sono effettuati saggi di citotossicità su alcune linee cellulari tumorali.

### 5.3.1 NUOVI INIBITORI DELLA TOPOISOMERASI II

L'effetto dei nuovi potenziali inibitori della Topoisomerasi II con nucleo benzo[*h*]chinazolinico (**13**, **14**) e benzo[*f*]chinazolinico (**18**, **19**) sull'attività di decatenazione del DNA (plasmide PBR322) ha dimostrato una discreta attività d'inibizione dell'enzima a concentrazioni comprese tra i 10  $\mu$ M ed i 50  $\mu$ M mentre il composto di riferimento (*m*-Amsacrina) inibisce l'enzima ad una concentrazione 8  $\mu$ M.

I composti sono stati successivamente saggiati su alcune linee cellulari tumorali (Tabella 2) e l'attività citotossica è stata determinata mediante il test MTT<sup>26</sup>, un test colorimetrico largamente utilizzato in vari protocolli di *drug screening* per la determinazione dell'attività biologica di nuove sostanze. I dati ottenuti hanno evidenziato una discreta citotossicità del composto **13** nei confronti delle diverse linee cellulari tumorali ed una buona citotossicità dei composti **13**, **14**, **19** su cellule leucemiche HL60. Il composto **18** non è stato saggiato per problemi di solubilità.

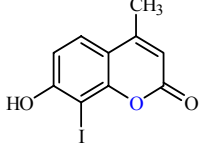
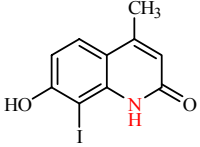
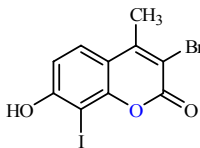
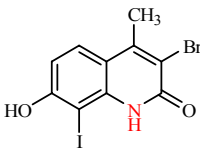
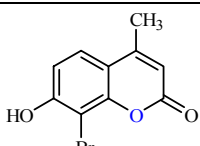
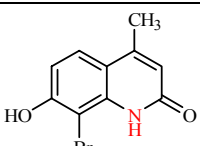
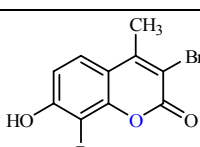
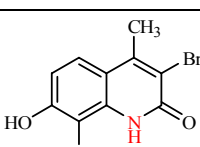
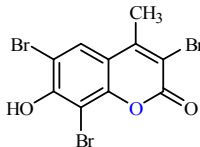
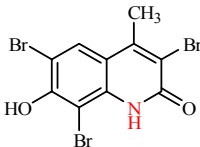


COMPOSTO	IC <sub>50</sub> (μM) ± S.D.				
	2008	A431	MCF7	HL60	LoVo
<b>13</b>	57.53±5.72	57.66±4.17	33.99±2.36	26.49±2.87	78.34±5.56
<b>14</b>	>100	>100	>100	26.92±3.29	57.53±5.72
<b>19</b>	62.58±5.95	77.74±4.50	62.50±4.15	30.76±4.51	89.31±1.65
<b>Amsacrina</b>	4.31±0.53	5.89±1.20	5.13±0.50	1.05±0.05	4.98±2.56
<b>Ellipticina</b>	1.68±0.68	3.24±1.00	0.94±0.14	2.03±1.04	2.92±1.35

**Tabella 2.** Citotossicità *in vitro* dei nuovi inibitori della Topoisomerasi II.  
 2008: cellule di adenocarcinoma ovarico.  
 A431: cellule di carcinoma epiteliale umano.  
 MCF7: cellule di carcinoma mammario.  
 HL60: promielociti di leucemia umana.  
 LoVo: cellule di adenocarcinoma del colon umano.

### 5.3.2 NUOVI INIBITORI DELLA PROTEINCHINASI CK2

I dati dei saggi di inibizione sull'enzima isolato CK2 (tutti i dati sono riportati alla fine del capitolo) hanno dimostrato, grazie al confronto con dati presenti in letteratura<sup>8</sup> di alcuni composti cumarinici variamente alogenati, che la sostituzione bioisostera NH-O in posizione 1 del nucleo cumarinico non porta a sostanziali variazioni di attività inibitoria nei confronti dell'enzima e quindi lo scaffold cumarinico e quello chinolinico sono pressoché equivalenti (Tabella 3).

CUMARINA	IC <sub>50</sub> (μM)	CHINOLINONE	IC <sub>50</sub> (μM)
	0.80		1.30
	0.28		0.30
	0.70		1.60
	0.10 (DBC)		0.20
	1.90		2.20

**Tabella 3.** Confronto dell'attività inibitoria su CK2 tra i composti chinolinonici sintetizzati ed alcuni analoghi cumarinici.

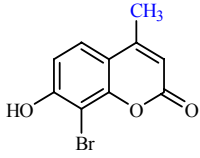
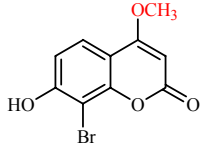
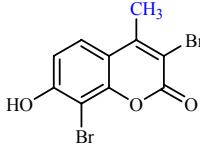
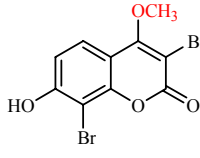
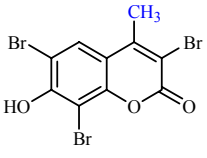
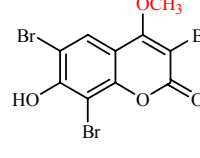
La sostituzione dell'atomo di bromo in posizione 8 della DBC (IC<sub>50</sub> 0.1 μM) con un gruppo formilico, idrossimminico, carbonitrilico, ossidrilico od un nitrogruppo (composti **36**, **37**, **39**, **53** e **41**) o la non sostituzione di questa posizione (composto **38**) porta ad una diminuzione dell'attività inibitoria nei confronti di CK2. Anche la sostituzione nei composti chinolinonici sintetizzati dell'atomo di bromo in posizione 8 (**23**, **24**) con un atomo di iodio (**26**, **27**) porta ad un aumento di IC<sub>50</sub>. I composti con maggiore attività non presentano un sostituito in posizione 6. Infatti i composti sostituiti in posizione 6 della DBC con un gruppo ossidrilico (**50**) o con un nitrogruppo (**45**) o i derivati con un bromo (**25**) od un metile (**31**) in tale posizione dell'analogo chinolinonico della DBC hanno minore attività

inibitoria nei confronti dell'enzima rispetto agli analoghi non sostituiti in posizione 6. Ciò è confermato anche osservando come abbiano un  $IC_{50}$  maggiore i composti non sostituiti in posizione 4 da un gruppo metilico e bromurati in posizione 6 (**74, 77, 83, 88, 90, 101**) rispetto agli analoghi non bromurati in tale posizione (**73, 76, 82, 87, 89, 100**).

Il mascheramento del gruppo ossidrilico della DBC con un gruppo metossilico (**63**,  $IC_{50} > 40.00 \mu M$ ) od acetossilico (**66**,  $IC_{50} = 2.50 \mu M$ ), o la sostituzione di questo con un gruppo aminico (**60**,  $IC_{50} > 40.00 \mu M$ ) o tiolico (**69**,  $IC_{50} = 2.30 \mu M$ ) porta ad una diminuzione di attività inibitoria nei confronti di CK2, dimostrando quindi come l'ossidrile della DBC sia fondamentale per l'attività inibitoria nei confronti del target enzimatico.

L'aumento dei valori di  $IC_{50}$  negli analoghi dei composti **36, 37, 39, 53, 41 87, 89**, non bromurati in posizione 3 (rispettivamente i composti **33, 34, 35, 52, 42, 85, 96**) dimostrano l'importanza della presenza dell'atomo di bromo in tale posizione.

L'attività dei composti variamente sostituiti nella posizione 4 dimostra che l'assenza di sostituenti o la sostituzione del metile della DBC con un gruppo ossidrilico, etilico, alometilico, idrossimetilico o trifluorometilico porta ad una diminuzione di attività. Invece l'attività inibitoria aumenta sostituendo il metile della posizione 4 della DBC con un gruppo metossilico (Tabella 4).

4-METIL	IC <sub>50</sub> (μM)	4-METOSSI	IC <sub>50</sub> (μM)
	0.70		0.19
	0.10 (DBC)		0.09
	1.90		0.26

**Tabella 4.** Confronto dell'attività inibitoria su CK2 tra composti bromocumarinici 4-metil sostituiti e 4-metossi sostituiti.

In particolare la 3,8-dibromo-7-idrossi-4-metossicumarina (**100**) è attualmente la cumarina con miglior attività inibitoria nei confronti di CK2.

La DBC (**65**) ed i bromoderivati sostituiti in posizione 4 con un gruppo metossilico (**99**, **100**, **101**) sono stati saggiati sulla linea cellulare HeLa, una linea cellulare umana di adenocarcinoma della cervice uterina. Per la valutazione della vitalità cellulare è stato utilizzato il test dell'MTT utilizzando come riferimento la TBB (4,5,6,7-tetrabromobenzotriazolo). I dati sperimentali (Tabella 5) dimostrano come i composti **100** e **101** abbiano una significativa attività antitumorale nei confronti delle cellule HeLa anche se i valori di IC<sub>50</sub> sono superiori a quelli del composto di riferimento.

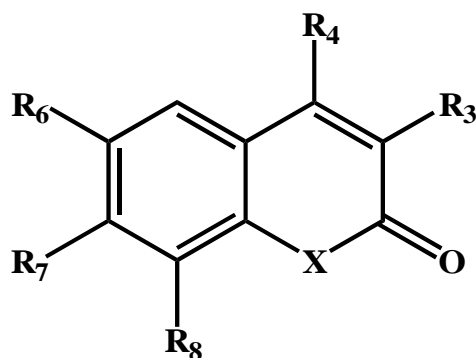
	IC <sub>50</sub> (μM) ± S.D.				
	DBC ( <b>65</b> )	<b>99</b>	<b>100</b>	<b>101</b>	TBB
HeLa	57.61±2.18	84.58±3.01	29.97±2.17	21.84±2.14	12.25±2.11

**Tabella 5.** Citotossicità *in vitro* dei nuovi inibitori di CK2. Le cellule sono state incubate per 48 ore ed i valori di IC<sub>50</sub> sono stati determinati mediante analisi dei probit (test del  $\chi^2$ ).

### **5.3.3 SAGGI IN ASSOCIAZIONE**

Per studiare l'esistenza del sinergismo d'azione tra gli inibitori della Topoisomerasi II e gli inibitori della proteinchinasi CK2 si stanno effettuando al momento di stesura di questo lavoro dei saggi di citotossicità su cellule tumorali utilizzando alcune associazioni costituite da inibitori noti della Topoisomerasi II, quali l'Amsacrina e l'Ellipticina, e da nuovi inibitori della proteinchinasi CK2, quali i composti **100**, e **101**.

**DATI BIOLOGICI SU CK2 DEI COMPOSTI SINTETIZZATI**



COMPOSTO	X	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>23</b>	NH	H	CH <sub>3</sub>	H	OH	Br	<b>1.60</b>
<b>24</b>	NH	Br	CH <sub>3</sub>	H	OH	Br	<b>0.20</b>
<b>25</b>	NH	Br	CH <sub>3</sub>	Br	OH	Br	<b>2.20</b>
<b>26</b>	NH	H	CH <sub>3</sub>	H	OH	I	<b>1.30</b>
<b>27</b>	NH	Br	CH <sub>3</sub>	H	OH	I	<b>0.30</b>
<b>31</b>	NH	Br	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	Br	<b>8.30</b>
<b>33</b>	O	H	CH <sub>3</sub>	H	OH	CHO	<b>&gt;40.00</b>
<b>34</b>	O	H	CH <sub>3</sub>	H	OH	CHNOH	<b>20.00</b>
<b>35</b>	O	H	CH <sub>3</sub>	H	OH	CN	<b>4.20</b>
<b>36</b>	O	Br	CH <sub>3</sub>	H	OH	CN	<b>1.90</b>
<b>37</b>	O	Br	CH <sub>3</sub>	H	OH	CHNOH	<b>2.50</b>
<b>38</b>	O	Br	CH <sub>3</sub>	H	OH	H	<b>28.50</b>
<b>39</b>	O	Br	CH <sub>3</sub>	H	OH	CHO	<b>3.30</b>
<b>40</b>	O	Br	CH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	OH	H	<b>3.30</b>
<b>41</b>	O	Br	CH <sub>3</sub>	H	OH	NO <sub>2</sub>	<b>4.00</b>
<b>42</b>	O	H	CH <sub>3</sub>	H	OH	NO <sub>2</sub>	<b>4.00</b>
<b>43</b>	O	H	CH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	OH	H	<b>30.00</b>

COMPOSTO	X	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)
44	O	Br	CH <sub>3</sub>	Br	OH	NO <sub>2</sub>	4.00
45	O	Br	CH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	OH	Br	4.00
48	O	H	CH <sub>3</sub>	OH	OH	H	>40.00
49	O	Br	CH <sub>3</sub>	OH	OH	H	31.00
50	O	Br	CH <sub>3</sub>	OH	OH	Br	2.00
52	O	H	CH <sub>3</sub>	H	OH	OH	>40.00
53	O	Br	CH <sub>3</sub>	H	OH	OH	10.50
54	O	Br	CH <sub>3</sub>	Br	OH	OH	3.60
58	O	H	CH <sub>3</sub>	H	NH <sub>2</sub>	H	>40.00
59	O	Br	CH <sub>3</sub>	H	NH <sub>2</sub>	H	>40.00
60	O	Br	CH <sub>3</sub>	H	NH <sub>2</sub>	Br	>40.00
61	O	Br	CH <sub>3</sub>	Br	NH <sub>2</sub>	Br	>40.00
63	O	Br	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	Br	>40.00
64	O	Br	CH <sub>3</sub>	Br	OCH <sub>3</sub>	H	>40.00
66	O	Br	CH <sub>3</sub>	H	OCOCH <sub>3</sub>	Br	2.50
69	O	Br	CH <sub>3</sub>	H	SH	Br	2.30
72	O	Br	OH	H	OH	H	39.00
73	O	Br	OH	H	OH	Br	28.00
74	O	Br	OH	Br	OH	Br	>40.00
76	O	Br	H	H	OH	H	28.50
77	O	Br	H	Br	OH	H	29.30
78	O	Br	H	H	OH	Br	0.28
80	O	Br	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	OH	H	20.90
81	O	Br	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Br	OH	H	6.30
82	O	Br	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	OH	Br	0.37

COMPOSTO	X	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>83</b>	O	Br	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Br	OH	Br	<b>1.40</b>
<b>85</b>	O	H	CH <sub>2</sub> Br	H	OH	Br	<b>3.00</b>
<b>86</b>	O	Br	CH <sub>2</sub> Br	Br	OH	H	<b>1.30</b>
<b>87</b>	O	Br	CH <sub>2</sub> Br	H	OH	Br	<b>1.20</b>
<b>88</b>	O	Br	CH <sub>2</sub> Br	Br	OH	Br	<b>2.00</b>
<b>89</b>	O	Br	CH <sub>2</sub> OH	H	OH	Br	<b>1.60</b>
<b>90</b>	O	Br	CH <sub>2</sub> OH	Br	OH	Br	<b>3.90</b>
<b>92</b>	O	H	CH <sub>2</sub> Cl	H	OH	Br	<b>1.80</b>
<b>94</b>	O	H	CH <sub>2</sub> Cl	Br	OH	Br	<b>3.30</b>
<b>95</b>	O	Br	CH <sub>2</sub> Cl	Br	OH	Br	<b>0.36</b>
<b>96</b>	O	H	CH <sub>2</sub> OH	H	OH	Br	<b>3.00</b>
<b>97</b>	O	H	CH <sub>2</sub> OH	Br	OH	Br	<b>19.70</b>
<b>99</b>	O	H	OCH <sub>3</sub>	H	OH	Br	<b>0.19</b>
<b>100</b>	O	Br	OCH <sub>3</sub>	H	OH	Br	<b>0.09</b>
<b>101</b>	O	Br	OCH <sub>3</sub>	Br	OH	Br	<b>0.26</b>
<b>103</b>	O	H	CF <sub>3</sub>	H	OH	Br	<b>0.37</b>
<b>105</b>	O	H	CF <sub>3</sub>	Br	OH	Br	<b>1.00</b>
<b>106</b>	O	Br	CF <sub>3</sub>	Br	OH	Br	<b>0.34</b>
<b>111</b>	O	H	CF <sub>3</sub>	I	OH	H	<b>2.90</b>
<b>113</b>	O	H	CF <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	OH	H	<b>36.40</b>
<b>114</b>	O	H	CF <sub>3</sub>	H	OH	NO <sub>2</sub>	<b>26.30</b>
<b>115</b>	O	Br	CF <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	OH	Br	<b>2.76</b>
<b>119</b>	O	H	CF <sub>3</sub>	Br	OH	NO <sub>2</sub>	<b>22.70</b>





## 6. PARTE SPERIMENTALE

### 6.1 MATERIALI

I prodotti ed i reagenti impiegati (*Acros* ed *Aldrich*) sono stati utilizzati come tali, senza purificazioni.

La purezza dei solventi organici (*Carlo Erba* e *Lab Scan*) è di grado analitico.

I solventi deuterati utilizzati per NMR (*Aldrich*) presentano grado di purezza isotopica minimo 99.5%.

La cromatografia su strato sottile è stata effettuata su lastre al gel di silice 60 F<sub>254</sub> (0.2 mm, *Merck*), eluendo come indicato volta per volta.

La cromatografia su colonna è stata eseguita utilizzando gel di silice 60 (0.063-0.100 mm, *Merck*), eluendo con i solventi di volta in volta indicati.

### 6.2 STRUMENTAZIONE

I punti di fusione sono stati determinati in capillare aperto, utilizzando un apparecchio per punto di fusione Gallenkamp MFB-595-010M.

Gli spettri <sup>1</sup>H-NMR e <sup>13</sup>C-NMR sono stati eseguiti con spettrometro Bruker 300-AMX, utilizzando TMS come standard interno ( $\delta = 0$ ) ed i solventi deuterati di volta in volta indicati; i valori di assorbimento sono espressi in  $\delta$  e le costanti in Hz. Gli spettri di massa sono stati realizzati su spettrometro Applied Biosystem Mariner System 5220 per iniezione diretta del campione.

Le analisi elementari sono state realizzate su analizzatore Perkin Elmer 2400. I valori delle analisi elementari degli intermedi e dei prodotti finali rientrano entro lo 0.3% del valore teorico.

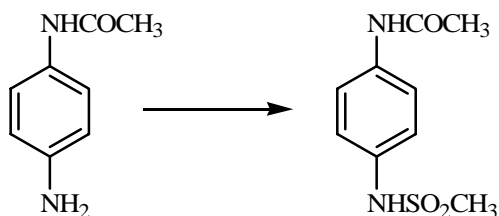
Le sintesi tramite microonde sono state effettuate con reattore monomodale *self-tuning* Discover CEM.

## 6.3 METODI

### 6.3.1 SINTESI DI NUOVI INIBITORI DELLA TOPOISOMERASI II

#### 6.3.1.1 SINTESI DI *N*-(4-AMINOFENIL)-METANSOLFONAMIDE

##### Sintesi di *N*-(4-metansolfonilaminofenil)-acetamide



Ad una soluzione di *N*-(4-aminofenil)-acetamide (10.0 g, 66.6 mmoli) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (234 ml) in atmosfera di azoto è stata aggiunta piridina (19.3 ml, 238.3 mmoli) raffreddata a 5°C. Alla soluzione è stato aggiunto metansolfonilcloruro (18.5 ml, 238.3 mmoli), goccia a goccia in 30 minuti, mantenendo la temperatura al di sotto di 15°C. La miscela è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte, quindi concentrata a secchezza. Il residuo semisolido ottenuto è stato ripreso con acqua (120 ml) e lasciato per 30 minuti sotto agitazione. Il solido è stato raccolto per filtrazione e lavato con acqua (40 ml), ottenendo l'***N*-(4-metansolfonilaminofenil)-acetamide** (12.8 g, resa 84%), con p.f. 205°C.

##### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

9.90 (s all., 1 H, -NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

9.48 (s all., 1 H, -NHCOCH<sub>3</sub>)

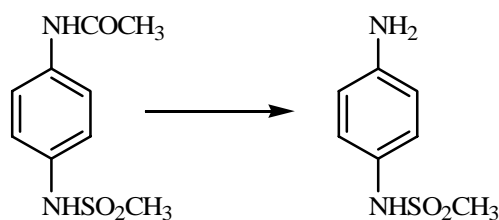
7.51 (d, J=8.9, 2 H, 3-H e 5-H)

7.12 (d, J=8.9, 2 H, 2-H e 6-H)

2.91 (s, 3 H, -NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

2.01 (s, 3 H, -NHCOCH<sub>3</sub>)

### Sintesi di *N*-(4-aminofenil)-metansolfonamide



Una miscela di *N*-(4-metansolfonilaminofenil)-acetamide (12.5 g, 54.7 mmoli), EtOH 96% (50 ml), acqua (14 ml) ed HCl conc. (16 ml) è stata riscaldata a riflusso per 4 ore, poi portata a temperatura ambiente. La miscela è stata raffreddata a 10°C, mantenuta sotto agitazione per 45 minuti e filtrata. Il solido ottenuto è stato lavato con 2-propanolo (15 ml) e ripreso con acqua (80 ml). La soluzione è stata portata a pH 8 con NH<sub>4</sub>OH conc., trattata con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (110 mg) e mantenuta in agitazione per tutta la notte. Il solido ottenuto per filtrazione è stato lavato con acqua (30 ml), ottenendo l'***N*-(4-aminofenil)-metansolfonamide** (2.7 g, resa 26%), con p.f. 125°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

8.89 (s all., 1 H, -NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

6.88 (d, J=8.7, 2 H, 2-H e 6-H)

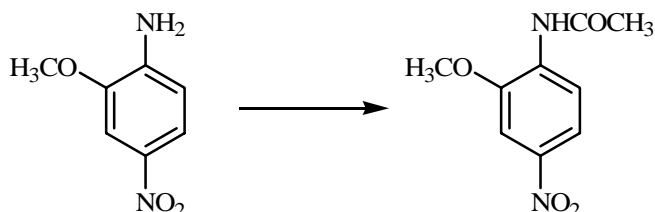
6.51 (d, J=8.7, 2 H, 3-H e 5-H)

5.00 (s all., 2 H, -NH<sub>2</sub>)

2.79 (s, 3 H, -NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

### 6.3.1.2 SINTESI DI N-(4-AMINO-3-METOSSIFENIL)-METANSOLFONAMIDE

#### Sintesi di N-(2-metossi-4-nitrofenil)-acetamide

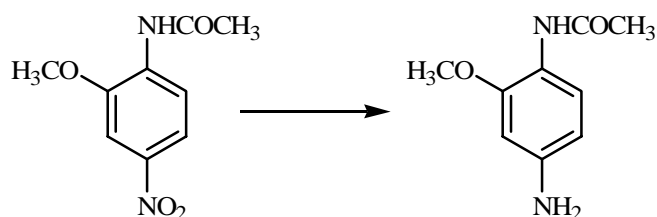


Ad una soluzione di 2-metossi-4-nitroanilina (10.0 g, 59.5 mmoli) e AcOH (56 ml) raffreddata a 10°C è stata aggiunta Ac<sub>2</sub>O (6.2 ml) e la soluzione è stata termostata a 80°C per 1 ora (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Dopo raffreddamento il precipitato formatosi è stato filtrato e lavato con acqua (3 x 60 ml), ottenendo l'**N-(2-metossi-4-nitrofenil)-acetamide** (11.6 g, resa 93%), con p.f. 162°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

- 8.57 (d, J=9.0, 1 H, 6-H)
- 7.92 (dd, J=2.4, J=9.0, 1 H, 5-H)
- 7.75 (d, J=2.4, 1 H, 3-H)
- 4.00 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>)
- 2.26 (s, 3 H, -NHCOCH<sub>3</sub>)

### Sintesi di *N*-(4-amino-2-metossifenil)-acetamide

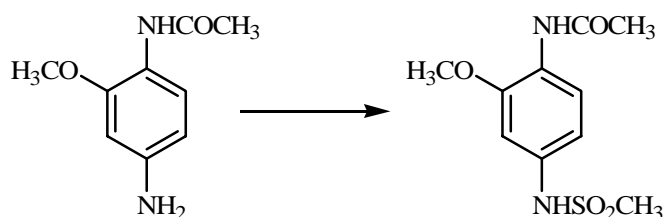


Ad una sospensione di Pd/C (300 mg) in EtOAc (50 ml) saturata con H<sub>2</sub> è stata aggiunta una soluzione di *N*-(2-metossi-4-nitrofenil)acetamide (11.6 g, 55.1 mmoli) in EtOAc (600 ml). La miscela di reazione è stata mantenuta in agitazione sotto leggera pressione di H<sub>2</sub> per 8 ore (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Il catalizzatore è stato eliminato per filtrazione e il filtrato è stato concentrato a secchezza, ottenendo l'*N*-(4-amino-2-metossifenil)-acetamide (9.8 g, resa 98%), con p.f. 127°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

- 8.71 (s, 1 H, -NHCOCH<sub>3</sub>)
- 7.26 (d, J=8.4, 1 H, 6-H)
- 6.24 (d, J=2.3, 1 H, 3-H)
- 6.07 (dd, J=2.3, J=8.4, 1 H, 5-H)
- 4.93 (s, 2 H, -NH<sub>2</sub>)
- 3.69 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>)
- 1.96 (s, 3 H, -NHCOCH<sub>3</sub>)

Sintesi di *N*-[2-metossi-4-(metansolfonil)-aminofenil]-acetamide

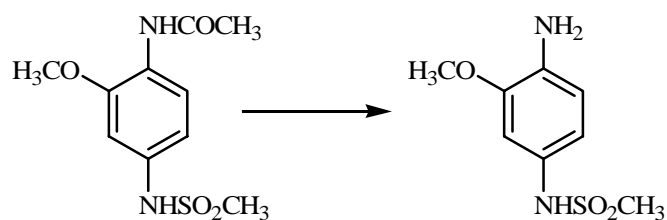


Ad una miscela di *N*-(4-amino-2-metossifenil)-acetamide (9.7 g, 53.8 mmoli), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (180 ml) e piridina (11.3 ml, 138.8 mmoli) raffreddata a 5°C sotto azoto è stato aggiunto metansolfonilcloruro (10.7 ml, 138.8 mmoli), goccia a goccia in 30 minuti, mantenendo la temperatura al di sotto di 15°C. La miscela è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 3 ore, quindi concentrata a secchezza. Il residuo semisolido ottenuto è stato ripreso con acqua (400 ml) e mantenuto sotto agitazione per 30 minuti. Il solido ottenuto per filtrazione è stato lavato con acqua (50 ml), ottenendo la ***N*-[2-metossi-4-(metansolfonil)-aminofenil]-acetamide** (10.3 g, resa 74%), con p.f. 146°C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>)

- 8.32 (d, J=8.6, 1 H, 6-H)
- 7.68 (s all., 1 H, -NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)
- 6.95 (d, J=2.3, 1 H, 3-H)
- 6.70 (dd, J=2.3, J=8.6, 1 H, 5-H)
- 6.40 (s all., 1 H, -NHCOCH<sub>3</sub>)
- 3.90 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>)
- 2.97 (s, 3 H, -NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)
- 2.21 (s, 3 H, NHCOCH<sub>3</sub>)

### Sintesi di *N*-(4-amino-3-metossifenil)-metansolfonamide



Una miscela di *N*-[2-metossi-4-(metansolfonil)-aminofenil]-acetamide (10.3 g, 39.7 mmoli), EtOH 96% (35 ml), acqua (10 ml) e HCl concentrato (12 ml) è stata riscaldata a riflusso per 4 ore, poi portata a temperatura ambiente durante la notte. La miscela è stata raffreddata a 10°C, mantenuta sotto agitazione per 45 minuti e filtrata. Il solido ottenuto è stato filtrato e lavato con 2-propanolo (10 ml) e ripreso con acqua (100 ml). La soluzione acida ottenuta è stata portata a pH 8 con NH<sub>4</sub>OH conc., trattata con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (78 mg) e mantenuta sotto agitazione per 4 ore, quindi filtrata. Il residuo solido ottenuto è stato lavato con acqua (80 ml), ottenendo l'***N*-(4-amino-3-metossifenil)-metansolfonamide** (4.8 g, resa 56%), con p.f. 153°C.

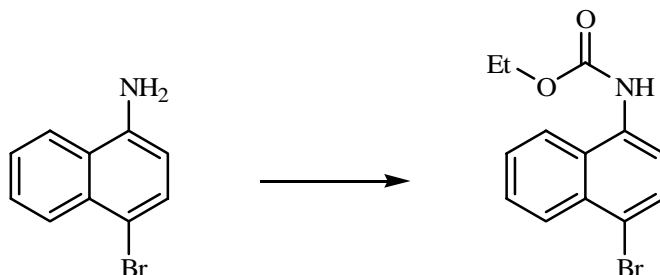
#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

- 8.97 (s, 1 H, -NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)
- 6.69 (s, 1 H, 3-H)
- 6.57 (m, 2 H, 5-H e 6-H)
- 4.64 (s, 2 H, -NH<sub>2</sub>)
- 3.73 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>)
- 2.83 (s, 3 H, -NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)



### 6.3.1.3 SINTESI DI N-[4-(BENZO[h]CHINAZOLIN-6-ILAMINO)FENIL]METANSOLFONAMIDI

#### Sintesi di etile (4-bromonaftalen-1-il)carbammato

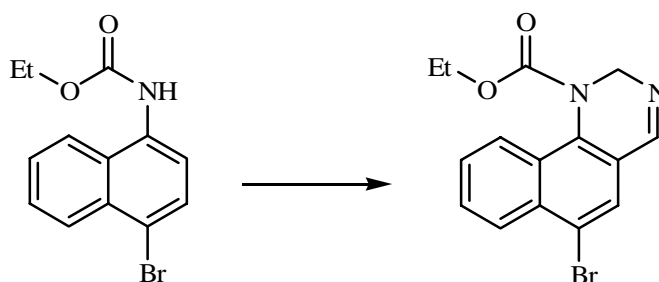


Ad una soluzione di 4-bromo-1-naftilamina (7.1 g, 32.0 mmoli) in THF anidro (300 ml) e TEA (4.5 ml, 32.0 mmoli) è stato aggiunto etile cloroformiato (12.3 ml, 127.9 mmoli). La miscela è stata lasciata sotto agitazione a riflusso per un'ora (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Il cloridrato di TEA formatosi è stato allontanato per filtrazione ed il filtrato è stato concentrato a secchezza. Il residuo solido così ottenuto è stato ripreso con EtOAc e filtrato a caldo. Il filtrato è stato concentrato a secchezza, ottenendo l'etile (4-bromonaftalen-1-il)carbammato (resa quantitativa), con p.f. 143°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

8.28	(dd, J=4.2, J=2.1, 1 H, 5-H o 8-H)
7.88	(dd, J=4.2, J=2.1, 1 H, 5-H o 8-H)
7.77	(s, 2 H, 2-H e 3-H)
7.65-7.55	(m, 2 H, 6-H e 7-H)
6.90	(s all., 1 H, -NH-)
4.28	(q, J=7.1, 2 H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )
1.35	(t, J=7.1, 3 H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )

### Sintesi di etile 6-bromo-2H-benzo[h]chinazolin-1-carbossilato

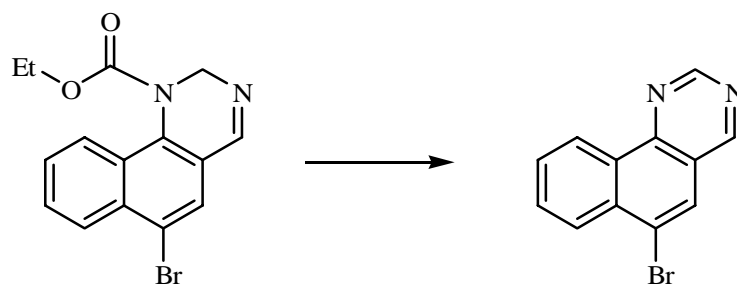


Una soluzione di etile (4-bromonaftalen-1-il)carbammato (4.9 g, 16.7 mmoli) e urotropina (16.4 g, 116.7 mmoli) in TFA (100 ml) è stata posta a riflusso per un'ora (TLC:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 90/10). La miscela di reazione è stata raffreddata e versata in una soluzione di HCl 4M (800 ml), ottenendo la precipitazione delle impurezze allontanate per filtrazione. La soluzione limpida è stata concentrata a secchezza e il residuo solido costituito dal cloridrato dell'**etile 6-bromo-2H-benzo[h]chinazolin-1-carbossilato** è stato utilizzato per la reazione successiva senza ulteriori purificazioni.

#### <sup>1</sup>H-NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )

- 8.38 (t,  $J=1.9$ , 1 H, 4-H)
- 8.18 (dd,  $J=8.0$ ,  $J=1.4$ , 1 H, 7-H o 10-H)
- 7.88 (dd,  $J=8.0$ ,  $J=1.4$ , 1 H, 7-H o 10-H)
- 7.84 (s, 1 H, 5-H)
- 7.64 (td,  $J=8.0$ ,  $J=1.4$ , 1 H, 8-H o 9-H)
- 7.56 (td,  $J=8.0$ ,  $J=1.4$ , 1 H, 8-H o 9-H)
- 6.15 (d,  $J=13.9$ , 1 H, 2<sub>a</sub>-H)
- 4.43 (d,  $J=13.9$ , 1 H, 2<sub>b</sub>-H)
- 4.08 (q,  $J=7.1$ , 2 H,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ )
- 1.03 (t,  $J=7.1$ , 3 H,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ )

## Sintesi di 6-bromobenzo[*h*]chinazolina

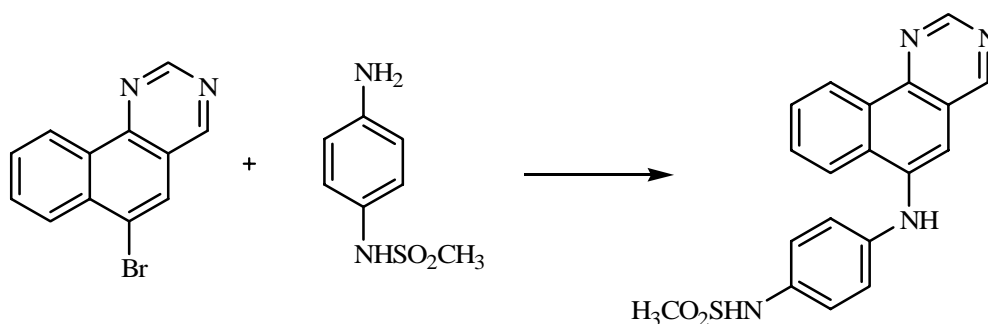


Il cloridrato dell'etile 6-bromo-2*H*-benzo[*h*]chinazolin-1-carbossilato ottenuto dalla precedente reazione è stato disciolto in una soluzione di KOH 10% in H<sub>2</sub>O/EtOH 1:1 (500 ml). Alla miscela (pH ≥ 10) è stato aggiunto K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (40.0 g, 121.5 mmoli) e la miscela è stata posta a riflusso per 4 ore (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata raffreddata, versata in acqua ed estratta a fondo con toluene. Il residuo solido ottenuto per concentrazione a secchezza della fase organica è stato ripreso con la minima quantità di EtOH e versato in H<sub>2</sub>O, con formazione di un abbondante precipitato. Il precipitato è stato filtrato e lavato con H<sub>2</sub>O, ottenendo così la **6-bromobenzo[*h*]chinazolina** (1.0 g, resa 23% rispetto alla quantità di etile (4-bromonaftalen-1-il)carbammato di partenza) con p.f. 115°C.

### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

- 9.58 (s, 1 H, 4-H)
- 9.52 (s, 1 H, 2-H)
- 9.26 (d, J=7.7, 1 H, 7-H o 10-H)
- 8.50 (s, 1 H, 5-H)
- 8.36 (d, J=7.7, 1 H, 7-H o 10-H)
- 8.07 (t, J=7.7, 1 H, 8-H o 9-H)
- 7.97 (t, J=7.7, 1 H, 8-H o 9-H)

## Sintesi di *N*-[4-(benzo[*h*]chinazolin-6-ilamino)fenil]metansolfonamide



### METODO A

Una sospensione di 6-bromobenzo[*h*]chinazolina (0.30 g, 1.0 mmoli) e *N*-(4-aminofenil)metansolfonamide (0.20 g, 1.3 mmoli) in DMF anidra (5 ml) è stata lasciata a riflusso in atmosfera di azoto per 3 ore (TLC: EtOAc/CE, 70/30) senza ottenere formazione di alcun prodotto, quindi la reazione è stata abbandonata.

### METODO B

Una sospensione di 6-bromobenzo[*h*]chinazolina (0.30 g, 1.0 mmoli) e *N*-(4-aminofenil)metansolfonamide (0.20 g, 1.3 mmoli) in DMF anidra (5 ml) è stata irradiata con microonde a 100 W, raggiungendo la temperatura di 150°C in 2 minuti. La potenza di 100 W è stata mantenuta per 10 minuti (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10) senza ottenere formazione di alcun prodotto, quindi la reazione è stata abbandonata.

### METODO C

Ad una sospensione di 6-bromobenzo[*h*]chinazolina (0.30 g, 1.0 mmoli) e *N*-(4-aminofenil)metansolfonamide (0.20 g, 1.3 mmoli) in DMF anidra (5 ml) sono stati aggiunti Pd(OAc)<sub>2</sub> (10 mg, 0.03 mmoli), BINAP (30 mg, 0.04 mmoli) e Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.50 g, 1.5 mmoli). La sospensione è stata irradiata con microonde a 100 W, raggiungendo la temperatura di 160°C in 2 minuti. La potenza di 100 W è stata mantenuta per 10 minuti (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata ripresa con EtOH (20 ml) e il precipitato formatosi è stato allontanato per filtrazione. La soluzione limpida è stata versata in H<sub>2</sub>O (100

ml), con formazione di abbondante precipitato. Il precipitato è stato filtrato e digerito in toluene (50 ml) a riflusso per 1 ora. La sospensione è stata raffreddata, il precipitato è stato filtrato e lavato con toluene, ottenendo la ***N*-[4-(benzo[*h*]chinazolin-6-ilamino)fenil]metansolfonamide** (0.16 g, resa 45%) con p.f. 265°C.

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

9.31	(s, 1 H, 4'-H)
9.24-9.21	(m, 2 H, 2'-H e 7'-H o 10'-H)
8.54	(s all., 1 H, -NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )
8.50	(d, J=8.0, 1 H, 7'-H o 10'-H)
7.98-7.87	(m, 2 H, 8'-H e 9'-H)
7.32-7.23	(m, 4 H, 2-H, 3-H, 5-H e 6-H)
2.98	(s, 3 H, -NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

156.57, 152.52, 145.08, 140.49, 139.35, 132.15, 130.09, 129.97, 129.49, 127.81, 124.36, 124.25, 122.72, 122.37, 121.34, 101.86, 38.82.

**HRMS (ESI-TOF) per C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S (M<sup>+</sup> +1)**

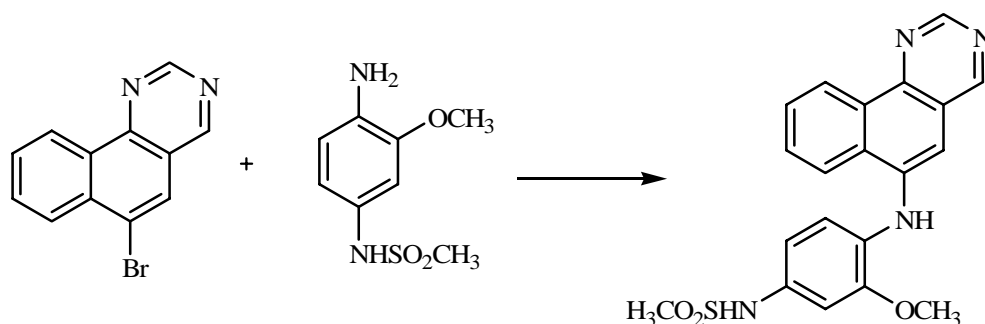
(M <sup>+</sup> ) +1	365.1067 (calcolato)	365.0962 (trovato)
----------------------	----------------------	--------------------

**ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 62.62%, H 4.43%, N 15.37%, S 8.80%

Trovato: C 62.59%, H 4.45%, N 15.32%, S 8.77%

Sintesi di *N*-[4-(benzo[*h*]chinazolin-6-ilamino)-3-metossifenil]metansolfonamide



Ad una sospensione di 6-bromobenzo[*h*]chinazolina (0.26 g, 1.0 mmoli) e *N*-(4-amino-3-metossifenil)metansolfonamide (0.32 g, 1.5 mmoli) in DMF anidra (5 ml) sono stati aggiunti Pd(OAc)<sub>2</sub> (2 mg, 0.01 mmoli), BINAP (25 mg, 0.04 mmoli) e Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.49 g, 1.5 mmoli). La sospensione è stata irradiata con microonde a 150 W, raggiungendo la temperatura di 160 °C in 2 minuti. La potenza di 150 W è stata mantenuta per 10 minuti (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con EtOH (20 ml) e il precipitato formatosi è stato eliminato per filtrazione. La soluzione limpida è stata versata in H<sub>2</sub>O (100 ml) e alla soluzione acquosa è stato aggiunto CHCl<sub>3</sub>, con formazione di abbondante precipitato. Il precipitato è stato filtrato e digerito in toluene (50 ml) a riflusso per 1 ora. La sospensione è stata raffreddata, il precipitato è stato filtrato e lavato con toluene, ottenendo la *N*-[4-(benzo[*h*]chinazolin-6-ilamino)-3-metossifenil]metansolfonamide (0.24 g, resa 62%), con p.f. 260°C.

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

9.22-9.17	(m, 3 H, 2'-H, 4'-H e 7'-H o 10'-H)
8.53	(d, J=8.0, 7'-H o 10'-H)
7.97-7.85	(m, 3 H, 8'-H, 9'-H e -NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )
7.25	(d, J=8.5, 1 H, 5-H)
7.03	(d, J=2.1, 1 H, 2-H)
6.89	(dd, J=8.5, J=2.1, 1 H, 6-H)
6.74	(s, 1 H, 5'-H)

3.29 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>)  
3.05 (s, 3 H, -NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

156.22, 153.44, 151.98, 144.60, 141.59, 135.52, 129.88, 128.84, 127.57, 126.39,  
125.61, 124.55, 124.38, 122.59, 112.51, 104.94, 100.00, 55.40, 39.02.

**HRMS** (ESI-TOF) per C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S (M<sup>+</sup> +1)

(M<sup>+</sup>) +1                                      395.1172 (calcolato)                      395.1331 (trovato)

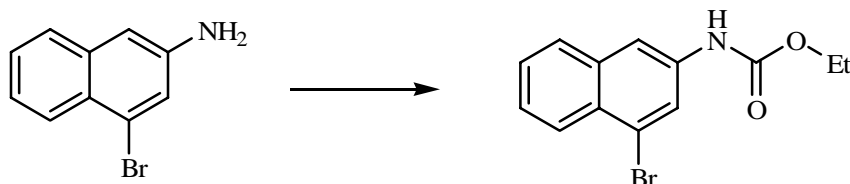
**ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 60.90%, H 4.60%, N 14.20%, S 8.13%

Trovato: C 60.92%, H 4.57%, N 14.23%, S 8.11%

### 6.3.1.4 SINTESI DI N-[4-(BENZO[f]CHINAZOLIN-6-ILAMINO)FENIL]METANSOLFONAMIDI

#### Sintesi di etile (4-bromonaftalen-2-il)carbammato



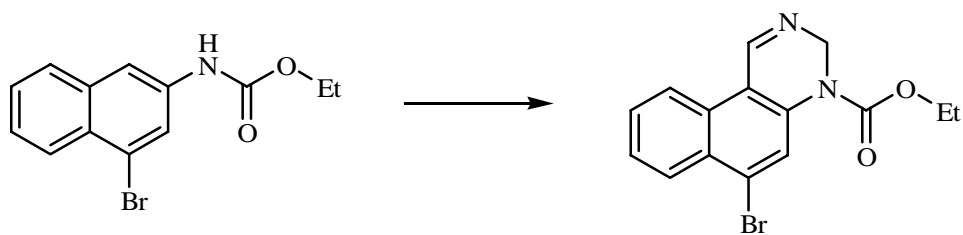
Ad una soluzione di 4-bromo-2-naftilammina (5.3 g, 23.8 mmoli) in THF anidro (200 ml) e TEA (6.6 ml, 47.6 mmoli) è stato aggiunto etile cloroformiato (4.6 ml, 47.6 mmoli). La miscela è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per un'ora (TLC:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 90/10). Il cloridrato di TEA formatosi è stato allontanato per filtrazione e il filtrato è stato concentrato a secchezza. Il residuo solido è stato ripreso con EtOAc e filtrato a caldo. Il filtrato è stato concentrato a secchezza, ottenendo l'etile (4-bromonaftalen-2-il)carbammato (resa quantitativa), di consistenza oleosa.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

9.98	(s, 1 H, -NH-)
8.09	(d, J=1.3, 1 H, 1-H o 3-H)
8.02-7.98	(m, 2 H, 1-H o 3-H e 5-H o 8-H)
7.86-7.83	(m, 1 H, 5-H o 8-H)
7.58-7.50	(m, 2 H, 6-H e 7-H)
4.18	(q, J=7.1, 2 H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )
1.27	(t, J=7.1, 3 H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )

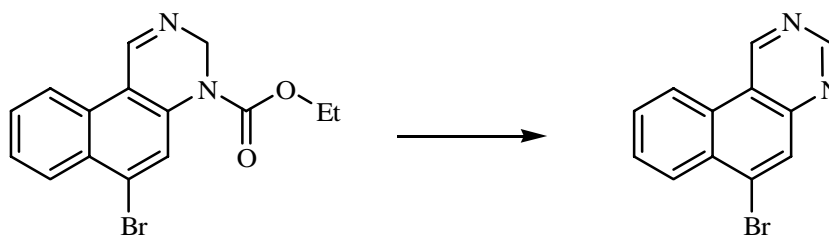


Sintesi di etile 6-bromo-3H-benzo[f]chinazolin-4-carbossilato



Una soluzione di etile (4-bromonaftalen-2-il)carbammato (7.0 g, 23.8 mmoli) e urotropina (23.4 g, 166.7 mmoli) in TFA (150 ml) è stata riscaldata a riflusso per un'ora (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata raffreddata e versata in una soluzione di HCl 4M (800 ml), ottenendo la precipitazione delle impurezze allontanate per filtrazione. La soluzione limpida è stata concentrata a secchezza e il residuo solido costituito dal cloridrato dell'**etile 6-bromo-3H-benzo[f]chinazolin-4-carbossilato** è stato utilizzato per la reazione successiva senza ulteriori purificazioni.

### Sintesi di 6-bromobenzo[f]chinazolina

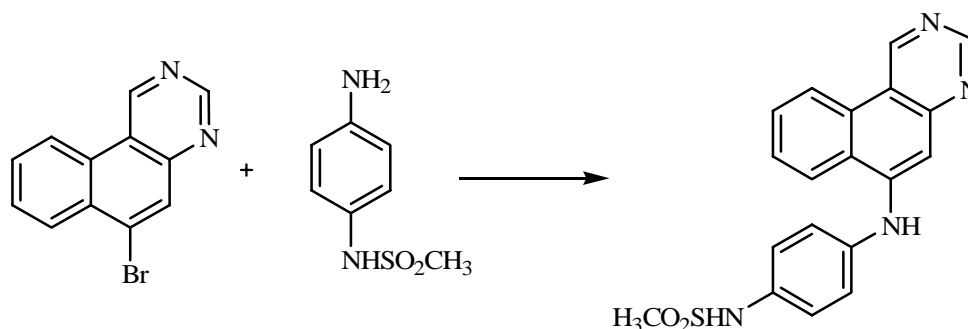


Il cloridrato dell'etile 6-bromo-3*H*-benzo[f]chinazolin-4-carbossilato ottenuto dalla precedente reazione è stato disciolto in una soluzione di KOH 10% in H<sub>2</sub>O/EtOH 1:1 (700 ml). Alla miscela (pH ≥ 10) è stato aggiunto K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (50.0 g, 151.9 mmoli) e la miscela è stata posta a riflusso fino a scomparsa del prodotto di partenza (4 ore) (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata raffreddata, versata in acqua, ed estratta a fondo con toluene. Il residuo solido ottenuto per concentrazione a secchezza della fase organica è stato ripreso con la minima quantità di EtOH e versato in H<sub>2</sub>O, con formazione di un abbondante precipitato. Il precipitato è stato filtrato e lavato con H<sub>2</sub>O, ottenendo così la **6-bromobenzo[f]chinazolina** (1.0 g, resa 16% calcolata rispetto alla quantità di etile (4-bromonaftalen-2-il)carbammato di partenza) con p.f. 147°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

10.43	(s, 1 H, 1-H)
9.44	(s, 1 H, 3-H)
9.12-9.13	(m, 1 H, 10-H)
8.42-8.39	(m, 1 H, 7-H)
8.34	(s, 1 H, 5-H)
7.98-7.95	(m, 2 H, 8-H e 9-H)

Sintesi di *N*-[4-(benzo[*f*]chinazolin-6-ilamino)fenil]metansolfonamide



Ad una sospensione di 6-bromobenzo[*f*]chinazolina (0.26 g, 1.0 mmoli) e *N*-(4-aminofenil)metansolfonamide (0.28 g, 1.5 mmoli) in DMF anidra (5 ml) sono stati aggiunti Pd(OAc)<sub>2</sub> (2 mg, 0.01 mmoli), BINAP (25 mg, 0.04 mmoli) e Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.49 g, 1.5 mmoli). La sospensione è stata irradiata con microonde a 150 W, raggiungendo la temperatura di 150 °C in 2 minuti. La potenza di 150 W è stata mantenuta per 10 minuti (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata ripresa con EtOH (20 ml) ed il precipitato formatosi è stato eliminato per filtrazione. La soluzione è stata concentrata a secchezza e il residuo solido è stato ripreso con acetone (200 ml), eliminando il precipitato rimasto indisciolto per filtrazione. Il residuo ottenuto per concentrazione a secchezza della soluzione è stato digerito in toluene (50 ml) a riflusso per 1 ora. La sospensione è stata raffreddata e il precipitato è stato filtrato e lavato con toluene, ottenendo la ***N*-[4-(benzo[*f*]chinazolin-6-ilamino)fenil]metansolfonamide** (0.28 g, resa 28%), con p.f. 295°C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

9.86	(s, 1 H, 1'-H)
8.95	(s, 1 H, 3'-H)
8.93	(d, J=7.8, 1 H, 7'-H o 10'-H)
8,59	(d, J=7.8, 1 H, 7'-H o 10'-H)
7.85-7.76	(m, 2 H, 8'-H e 9'-H)
7.03-6.91	(m, 4 H, 2-H, 3-H, 5-H e 6-H)
6.74	(s, 1 H, 5'-H)

2.59 (s, 3 H,  $\text{NH}\text{SO}_2\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ )

156.14, 152.60, 152.48, 147.61, 136.97, 134.37, 129.37, 128.74, 127.77, 124.94,  
124.27, 123.07, 122.73, 121.56, 116.88, 101.47, 39.05.

**HRMS** (ESI-TOF) per  $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$  ( $\text{M}^+ + 1$ )

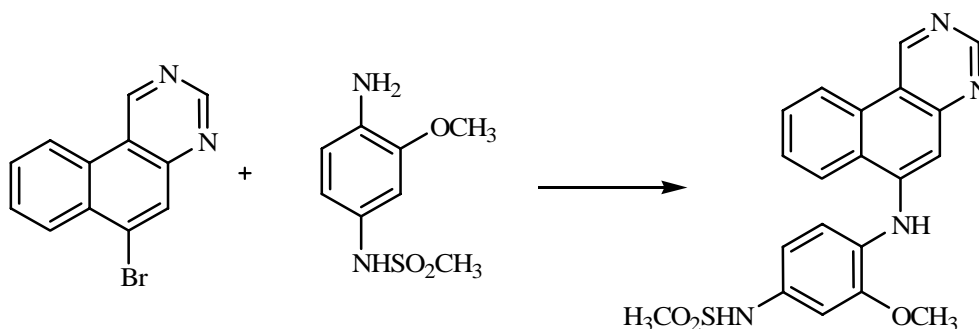
( $\text{M}^+$ ) +1	365.1067 (calcolato)	365.1105 (trovato)
---------------------	----------------------	--------------------

#### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 62.62%, H 4.43%, N 15.37%, S 8.80%

Trovato: C 62.57%, H 4.44%, N 15.38%, S 8.82%

Sintesi di *N*-[4-(benzo[*f*]chinazolin-6-ilamino)-3-metossifenil]metansolfonamide



Ad una sospensione di 6-bromobenzo[*f*]chinazolina (0.26 g, 1.0 mmoli) e *N*-(4-amino-3-metossifenil)metansolfonamide (0.32 g, 1.5 mmoli) in DMF anidra (5 ml) sono stati aggiunti Pd(OAc)<sub>2</sub> (2 mg, 0.01 mmoli), BINAP (25 mg, 0.04 mmoli) e Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.49 g, 1.5 mmoli). La sospensione è stata irradiata con microonde a 150 W, raggiungendo la temperatura di 160 °C in 2 minuti. La potenza di 150 W è stata mantenuta per 10 minuti (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata ripresa con EtOH (20 ml) e la soluzione limpida è stata concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato ripreso con acetone (200 ml), eliminando il precipitato rimasto indisciolto per filtrazione. Il residuo ottenuto per concentrazione a secchezza della soluzione è stato digerito prima in toluene/EtOH (95/05, 50 ml) a riflusso per 1 ora e successivamente in H<sub>2</sub>O (20 ml) a riflusso per 1 ora. La sospensione è stata raffreddata, il precipitato è stato filtrato e lavato con H<sub>2</sub>O, ottenendo la *N*-[4-(benzo[*f*]chinazolin-6-ilamino)-3-metossifenil]metansolfonamide (0.05 g, resa 12%), con p.f. 266°C.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

9.93	(s, 1 H, 1'-H)
8.99-8.95	(m, 2 H, 3'-H e 7'-H o 10'-H)
8.60	(d, J=8.4, 1 H, 7'-H o 10'-H)
8.53	(s all, 1 H, -NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )
7.88-7.79	(m, 2 H, 8'-H e 9'-H)
7.30	(d, J=8.4, 1 H, 5-H)
7.04	(d, J=1.9, 1 H, 2-H)

6.93 (dd, J=8.4, J=1.9, 1 H, 6-H)  
6.41 (s, 1 H, 5'-H)  
3.73 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>)  
3.06 (s, 3 H, -NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

156.06, 154.81, 152.71, 152.30, 148.48, 137.35, 129.20, 128.52, 128.37, 127.69,  
124.43, 124.14, 123.03, 122.70, 116.37, 111.85, 104.32, 100.50, 55.38.

**HRMS (ESI-TOF) per C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S (M<sup>+</sup> +1)**

(M<sup>+</sup>) +1                      395.1172 (calcolato)                      395.1161 (trovato)

**ANALISI ELEMENTARE**

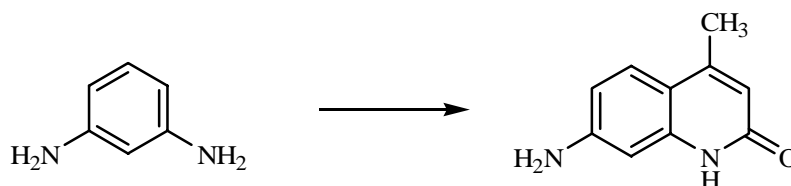
Teorico: C 60.90%, H 4.60%, N 14.20%, S 8.13%

Trovato: C 60.94%, H 4.63%, N 14.18%, S 8.11%

## 6.3.2 SINTESI DI NUOVI INIBITORI CHINOLINONICI DI CK 2

### 6.3.2.1 ALOGENAZIONE DI 7-IDROSSI-4-METILCHINOLIN-2-ONE

#### Sintesi di 7-amino-4-metilchinolin-2-one

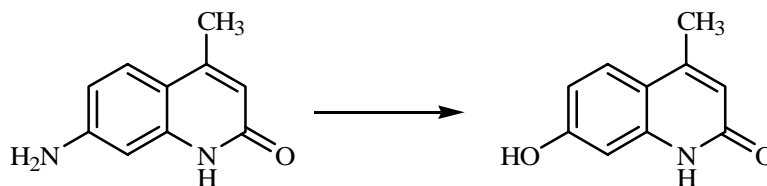


Una miscela di 1,3-fenilendiamina (20.0 g, 185.0 mmoli) ed etile acetoacetato (23.6 ml, 185.0 mmoli) è stata termostata a 150°C fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con 40 ml di MeOH e filtrata, ottenendo il **7-amino-4-metilchinolin-2-one** (15.0 g, resa 46%), con p.f. 279°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

- 11.10 (s all., 1 H, -NH-)
- 7.33 (d, J=8.6, 1 H, 5-H)
- 6.45 (dd, J=8.6, J=2.2, 1 H, 6-H)
- 6.36 (d, J=2.2, 1 H, 8-H)
- 5.94 (s, 1 H, 3-H)
- 5.71 (s, 2 H, -NH<sub>2</sub>)
- 2.27 (s, 3 H, 4-Me)

### Sintesi di 7-idrossi-4-metilchinolin-2-one



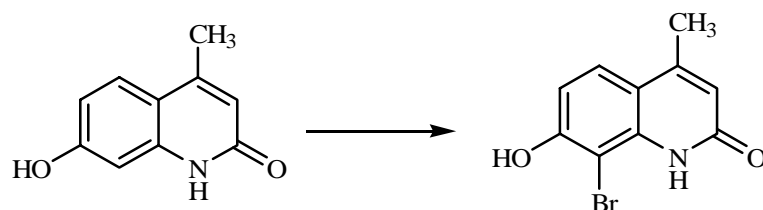
Una miscela di 7-amino-4-metilchinolin-2-one (15.0 g, 86.1 mmoli), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato (140 ml), acqua e ghiaccio (280 ml) è stata termostata a -5°C, mantenendola sotto costante agitazione. Alla miscela è stata aggiunta lentamente una soluzione di NaNO<sub>2</sub> (8.9 g, 129.1 mmoli) in acqua (7 ml) mantenendo la temperatura compresa tra 0°C e -5°C. Terminata l'aggiunta la miscela di reazione è stata mantenuta a temperatura ambiente per 15 minuti e quindi versata in una soluzione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30% (450 ml) e riscaldata a 160°C, mantenendola a tale temperatura fino a completa eliminazione dell'azoto. La soluzione è stata quindi versata in acqua e ghiaccio (600 g), ottenendo un abbondante precipitato (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Il precipitato è stato filtrato, lavato a fondo con acqua e cristallizzato da MeOH, ottenendo il **7-idrossi-4-metilchinolin-2-one** (7.4 g, resa 50%), con p.f. >300°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

- 11.39 (s all., 1 H, -OH o -NH-)
- 10.05 (s all., 1 H, -OH o -NH-)
- 7.52 (d, J=8.7, 1 H, 5-H)
- 6.69 (d, J=2.3, 1 H, 8-H)
- 6.65 (dd, J=8.7, J=2.3, 1 H, 6-H)
- 6.14 (s, 1 H, 3-H)
- 2.34 (s, 3 H, 4-Me)



## Sintesi di 8-bromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one



### METODO A

Una miscela di 7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (0.10 g, 0.57 mmoli) ed AcOH glaciale (20 ml) è stata termostata a 60°C e quindi aggiunta goccia a goccia di Br<sub>2</sub> (0.015 ml, 0.28 mmoli) diluito in AcOH (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Dopo 3 ore la miscela di reazione è stata fatta raffreddare fino a temperatura ambiente. La miscela di reazione, versata in acqua e neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub>, è stata estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata quindi anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a secchezza ottenendo una miscela di prodotti non separabili.

### METODO B

Una miscela di 7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (0.10 g, 0.57 mmoli) ed AcOH glaciale (20 ml) è stata termostata a 60°C e quindi aggiunta goccia a goccia di Br<sub>2</sub> (90 mg, 0.03 ml, 0.57 mmoli) diluito in AcOH. (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Dopo 3 ore la miscela di reazione è stata fatta raffreddare fino a temperatura ambiente. La miscela di reazione, versata in acqua e neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub>, è stata estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata quindi anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a secchezza ottenendo una miscela di prodotti non separabili.

#### METODO C

Una miscela di 7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (0.10 g, 0.57 mmoli), AcOH glaciale (20 ml) ed NBS (50 mg, 0.28 mmoli) è stata mantenuta sotto costante agitazione a temperatura ambiente per 4 ore (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione, versata in acqua e neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub>, è stata estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata quindi anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a secchezza ottenendo una miscela di prodotti non separabili.

#### METODO D

Una miscela di 7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (0.10 g, 0.57 mmoli), AcOH glaciale (20 ml) ed NBS (0.10 g, 0.57 mmoli) è stata mantenuta sotto costante agitazione a temperatura ambiente per 4 ore (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione, versata in acqua e neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub>, è stata estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata quindi anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a secchezza. La miscela di reazione risulta esser troppo complessa.

#### METODO E

Una miscela di 7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (0.10 g, 0.57 mmoli) e NH<sub>4</sub>OH 20% (40 ml) è stata aggiunta goccia a goccia di Br<sub>2</sub> (0.03 ml, 0.57 mmoli) diluito in acqua ed EtOH. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata quindi neutralizzata con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluito ed è stata estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a secchezza ed il residuo solido è stato cristallizzato da MeOH ottenendo l' **8-bromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one** (70 mg, resa 47%), con p.f. 239°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

11.03 (s all., 1 H, -OH o -NH-)

9.83 (s all., 1 H, -OH o -NH-)

7.59 (d, J=8.8, 1 H, 5-H)

6.88 (d, J=8.8, 1 H, 6-H)

6.26 (s, 1 H, 3-H)

2.38 (s, 3 H, 4-Me)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

161.64, 156.33, 148.50, 137.55, 125.25, 117.45, 113.79, 110.84, 95.20, 18.56.

**HRMS** (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>BrNO<sub>2</sub> (M<sup>-</sup> -1)

(M <sup>-</sup> ) -1	251.9666 (calcolato)	251.9698 (trovato)
----------------------	----------------------	--------------------

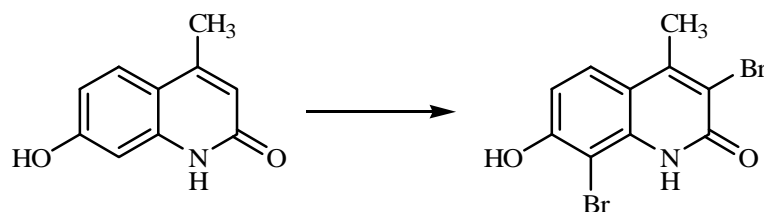
(M <sup>-</sup> + 2) -1	253.9646 (calcolato)	253.9692 (trovato)
-------------------------	----------------------	--------------------

#### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 47.27%, H 3.17%, Br 31.45%, N 5.51%

Trovato: C 47.31%, H 3.12%, Br 31.38%, N 5.40%

Tentativo di sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one dal 7-idrossi-4-metilchinolin-2-one



**METODO A**

Una miscela di 7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (0.10 g, 0.57 mmoli) e AcOH glaciale (20 ml) è stata termostata a 60°C e quindi aggiunta goccia a goccia di Br<sub>2</sub> (0.06 ml, 1.14 mmoli) diluito in AcOH (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Dopo 3 ore la miscela di reazione è stata fatta raffreddare fino a temperatura ambiente. La miscela di reazione, versata in acqua e neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub>, è stata estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata quindi anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a secchezza ottenendo una miscela complessa di prodotti.

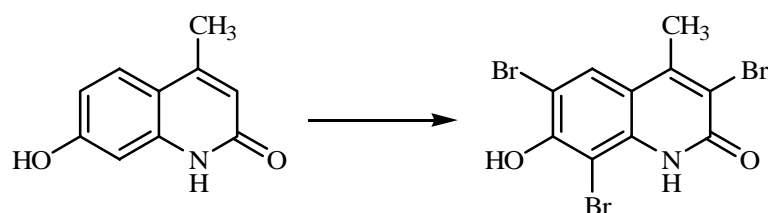
**METODO B**

Una miscela di 7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (0.10 g, 0.57 mmoli) e AcOH glaciale (20 ml) è stata termostata a 60°C e quindi aggiunta goccia a goccia mediante un imbuto da carico di Br<sub>2</sub> (0.04 ml, 0.86 mmoli) diluito in una soluzione di AcOH (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Dopo 3 ore la miscela di reazione è stata fatta raffreddare fino a temperatura ambiente. La miscela di reazione, versata in acqua e neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub>, è stata estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata quindi anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a secchezza ottenendo una miscela di prodotti che non sono stati isolati.

## METODO C

Una miscela di 7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (0.10 g, 0.57 mmoli), AcOH glaciale (20 ml) e NBS (0.15 g, 0.86 mmoli) è stata mantenuta sotto costante agitazione a temperatura ambiente per 4 ore. (TLC:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 90/10. La miscela di reazione, versata in acqua e neutralizzata con  $\text{NaHCO}_3$ , è stata estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata quindi anidrificata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrata a secchezza ottenendo una miscela di prodotti troppo complessa.

### Sintesi di 3,6,8-tribromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one



Il 7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (1.0 g, 5.7 mmoli) è stato sciolto nella minima quantità di AcOH glaciale (100 ml); alla soluzione è stata aggiunta, a piccole porzioni, alla temperatura di 60°C, una soluzione contenente bromo (1.3 ml, 24.6 mmoli) in AcOH glaciale. La miscela di reazione è stata lasciata per 3 ore a 60°C (TLC: EtOAc/CE, 70/30). Per raffreddamento si è formato un precipitato che è stato raccolto per filtrazione e cristallizzato da MeOH, ottenendo il **3,6,8-tribromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one** (0.60 g, resa 26%), con p.f. 220°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

11.80 (s all., 1 H, -OH o -NH-)

10.81 (s all., 1 H, -OH o -NH-)

8.15 (s, 1 H, 5-H)

2.76 (s, 3 H, 4-Me)

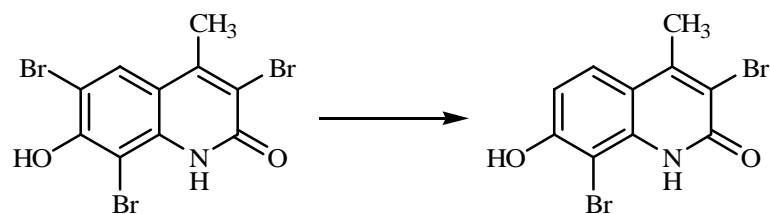
#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

157.23, 152.62, 146.22, 135.50, 128.40, 117.09, 114.62, 105.92, 97.72, 19.75.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>Br<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> (M<sup>-</sup>-1)

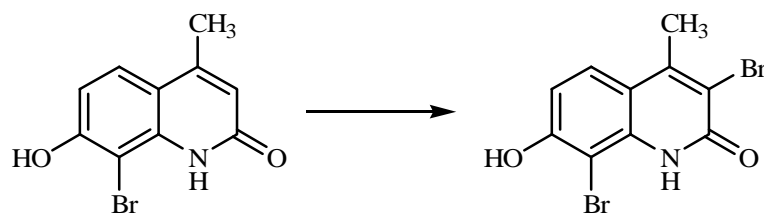
(M <sup>-</sup> )-1	407.7876 (calcolato)	407.7649 (trovato)
(M <sup>+2</sup> )-1	409.7856 (calcolato)	409.7622 (trovato)
(M <sup>+4</sup> )-1	411.7836 (calcolato)	411.7551 (trovato)
(M <sup>+6</sup> )-1	413.7817 (calcolato)	413.7607 (trovato)

Tentativo di sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one da 3,6,8-tribromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one



Una sospensione di 3,6,8-tribromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (0.10 g, 0.24 mmoli) in acqua (10 ml) e MeOH (10 ml) è stata aggiunta di una soluzione di Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (31 mg, 0.24 mmoli), NaOH (9 mg, 0.25 mmoli) in acqua (5 ml) e mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 1 ora (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata quindi acidificata con HCl 4M, ottenendo la formazione di un precipitato che è stato separato per filtrazione e risulta costituito unicamente da prodotto di partenza.

Sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one dal 8-bromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one



Una soluzione di 8-bromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (50 mg, 0.19 mmoli) in AcOH glaciale (40 ml) è stata termostata a 60°C e quindi aggiunta di Br<sub>2</sub> (0.015 ml, 0.29 mmoli) diluito in AcOH a piccole frazioni successive (5 gtt) fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione, versata in acqua e neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub>, è stata estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata quindi anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a secchezza ottenendo il **3,8-dibromo-7-idrossi-4-metilchinolin-2-one** (30 mg, resa 47%), con p.f. 258°C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

11.16 (s all., 1 H, -OH o -NH-)

10.45 (s all., 1 H, -OH o -NH-)

7.72 (d, J=8.9, 1 H, 5-H)

6.92 (d, J=8.9, 1 H, 6-H)

2.60 (s, 3 H, 4-Me)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

157.35, 156.57, 147.11, 136.19, 125.93, 115.49, 113.25, 111.46, 95.01, 19.69.

**HRMS** (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> (M<sup>-</sup>-1)

(M<sup>-</sup>-1) 329.8771 (calcolato) 329.8797 (trovato)

(M<sup>+2</sup>-1) 331.8751 (calcolato) 331.8769 (trovato)

(M<sup>+4</sup>-1) 333.8731 (calcolato) 333.8817 (trovato)

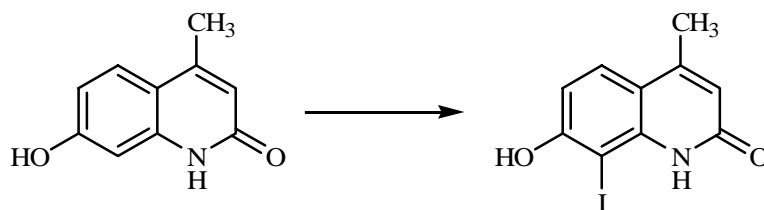


### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 36.07%, H 2.12%, Br 47.99%, N 4.21%

Trovato: C 36.10%, H 2.10%, Br 47.89%, N 4.22%

### Sintesi del 7-idrossi-8-iodo-4-metilchinolin-2-one



Una soluzione di 7-idrossi-4-metilchinolin-2-one (0.20 g, 1.14 mmoli) in  $\text{NH}_4\text{OH}$  20% (40 ml) è stata aggiunta di  $\text{I}_2$  (0.14 g, 0.57 mmoli) solubilizzato in una soluzione acquosa di KI (30 ml). La miscela di reazione è stata mantenuta a temperatura ambiente per 1 ora (TLC:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 90/10) ed è stata quindi acidificata con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluito ottenendo la formazione di un abbondante precipitato che è stato raccolto per filtrazione, lavato con acqua, e cristallizzato da MeOH ottenendo il **7-idrossi-8-iodo-4-metilchinolin-2-one** (0.17 g, resa 48%), con p.f. 205°C.

#### $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{DMSO-}d_6$ )

11.18 (s all., 1 H, -OH o -NH-)

9.08 (s all., 1 H, -OH o -NH-)

7.60 (d,  $J=8.7$ , 1 H, 5-H)

6.84 (d,  $J=8.7$ , 1 H, 6-H)

6.26 (s, 1 H, 3-H)

2.39 (s, 1 H, 4-Me)

#### $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{DMSO-}d_6$ )

161.49, 159.24, 148.76, 139.70, 126.38, 117.09, 113.51, 110.24, 73.90, 18.51.

#### HRMS (ESI-TOF) per $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{INO}_2$ ( $\text{M}^- - 1$ )

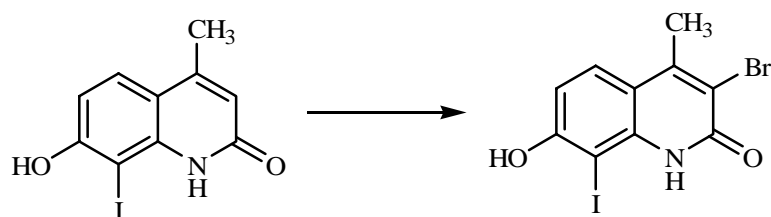
(M) -1                      299.9527 (calcolato)                      299.9512 (trovato)

### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 39.89%, H 2.68%, I 42.15%, N 4.65%

Trovato: C 40.01%, H 2.59%, I 42.13%, N 4.64%

### Sintesi di 3-bromo-7-idrossi-8-iodo-4-metilchinolin-2-one



Una soluzione di 7-idrossi-8-iodo-4-metilchinolin-2-one (0.10 g, 0.33 mmoli) in AcOH glaciale (20 ml) è stata termostata a 60°C e quindi aggiunta goccia a goccia di Br<sub>2</sub> (0.017ml, 0.33 mmoli) diluito in AcOH (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Dopo 3 ore la miscela di reazione è stata fatta raffreddare fino a temperatura ambiente. La miscela di reazione, versata in acqua e neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub>, è stata estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata quindi anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a secchezza ed il solido ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna con eluente CHCl<sub>3</sub>, ottenendo il **3-bromo-7-idrossi-8-iodo-4-metilchinolin-2-one** (60 mg, resa 48%), con p.f. 254°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

11.30 (s all., 1 H, -OH o -NH-)

9.59 (s all., 1 H, -OH o -NH-)

7.74 (d, J = 8.9, 1 H, 5-H)

6.87 (d, J = 8.9, 1 H, 6-H)

2.61 (s, 3 H, 4-Me)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

159.74, 157.64, 147.71, 138.52, 127.38, 115.13, 113.22, 111.06, 74.14, 19.85.

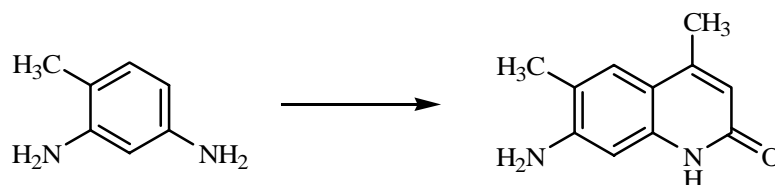
#### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 31.61%, H 1.86%, Br 21.03%, I 33.40%, N 3.69%

Trovato: C 31.61%, H 1.79%, Br 21.00%, I 33.42%, N 3.48%

### 6.3.2.2 BROMURAZIONE DI 7-IDROSSI-4,6-DIMETILCHINOLIN-2-ONE

#### Sintesi di 7-amino-4,6-dimetilchinolin-2-one

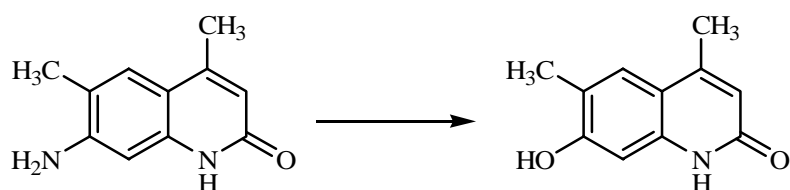


Una miscela di 2,4-diaminotoluene (20.0 g, 185.0 mmoli) ed etile acetoacetato (23.6 ml, 185.0 mmoli) è stata termostata a 150°C fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Dopo raffreddamento la miscela è stata ripresa con 40 ml di MeOH e filtrata, ottenendo il **7-amino-4,6-dimetilchinolin-2-one** (15.0 g, resa 46%), con p.f. 279°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>)

- 7.39 (s all., 1 H, 5-H)
- 6.54 (s, 1 H, 8-H)
- 6.14 (q, J=1.1, 1 H, 3-H)
- 2.41 (d, J=1.1, 3 H, 4-Me)
- 2.20 (s all., 3 H, 6-Me)

### Sintesi di 7-idrossi-4,6-dimetilchinolin-2-one

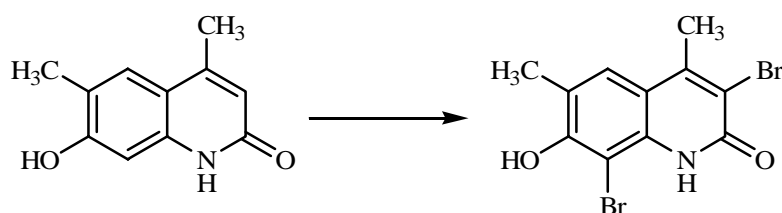


Una miscela di 7-amino-4,6-dimetilchinolin-2-one (15.0 g, 86.1 mmoli), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato (140 ml), acqua e ghiaccio (280 ml) è stata raffreddata a -5°C, mantenendola sotto costante agitazione. Alla miscela è stata aggiunta lentamente una soluzione di NaNO<sub>2</sub> (8.9 g, 129.1 mmoli) in H<sub>2</sub>O (7 ml) mantenendo la temperatura compresa tra 0°C e -5°C. Terminata l'aggiunta, la miscela di reazione è stata mantenuta a temperatura ambiente per 15 minuti e quindi versata in una soluzione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30% (450 ml) e riscaldata a 160°C. La soluzione acida è stata mantenuta a tale temperatura fino a completa eliminazione dell'azoto e quindi versata in acqua e ghiaccio (600 g), ottenendo un abbondante precipitato (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Il precipitato è stato filtrato, lavato a fondo con acqua e cristallizzato da MeOH, ottenendo il **7-idrossi-4,6-dimetilchinolin-2-one** (7.4 g, resa 50%), con p.f. >300°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>)

- 7.48 (s all., 1 H, 5-H)
- 6.73 (s, 1 H, 8-H)
- 6.25 (q, J=1.1, 1 H, 3-H)
- 2.44 (d, J=1.1, 3 H, 4-Me)
- 2.24 (s all., 3 H, 6-Me)

### Sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4,6-dimetilchinolin-2-one



Il 7-idrossi-4,6-dimetilchinolin-2-one (2.0 g, 10.6 mmoli) è stato sciolto nella minima quantità di AcOH glaciale (100 ml); alla soluzione è stata aggiunta, a piccole porzioni, alla temperatura di 60°C, una soluzione contenente bromo (3.4 g, 1.1 ml, 21.0 mmoli) in AcOH glaciale. La miscela di reazione è stata lasciata per 3 ore a 60°C (TLC: CE/EtOAc, 50/50). Per raffreddamento si è formato un precipitato che è stato raccolto per filtrazione e cristallizzato da MeOH, ottenendo il **3,8-dibromo-7-idrossi-4,6-dimetilchinolin-2-one** (1.2 g, resa 32%), con p.f. 271°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

10.37 (s all., 1 H, -OH)  
7.62 (q, J=0.8, 1 H, 5-H)  
2.60 (s, 3 H, 4-Me)  
2.30 (d, J=0.8, 3 H, 6-Me)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

157.21, 154.64, 146.82, 134.24, 126.06, 121.49, 115.81, 113.27, 96.57, 19.68, 16.91.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> (M<sup>-</sup>-1)

(M <sup>-</sup> )-1	343.8927 (calcolato)	343.8733 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2)-1	345.8907 (calcolato)	345.8722 (trovato)
(M <sup>-</sup> +4)-1	347.8888 (calcolato)	347.8694 (trovato)

### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 38.07%, H 12.61%, Br 46.05%, N 4.04%

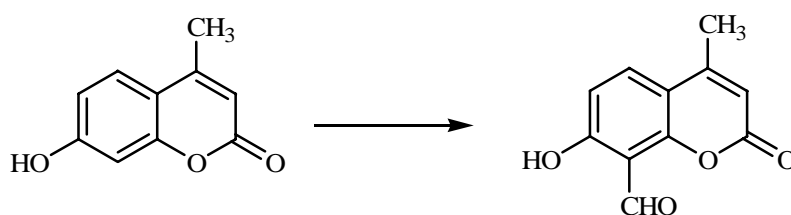
Trovato: C 38.05%, H 12.69%, Br 46.00%, N 3.98%



### 6.3.3 SINTESI DI NUOVI INIBITORI CUMARINICI DI CK2

#### 6.3.3.1 SINTESI DI 7-IDROSSI-4-METILCUMARINE SOSTITuite IN POSIZIONE 6 ED 8

##### Sintesi di 8-formil-7-idrossi-4-metilcumarina



##### METODO A

Una miscela di 7-idrossi-4-metilcumarina (3.0 g, 17.0 mmoli), urotropina (5.5 g, 39.2 mmoli) ed AcOH (50 ml) è stata riscaldata a riflusso per 2 ore (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata aggiunta di HCl dil. (30 ml) e portata a riflusso per 10 min. La soluzione è stata ripresa con acqua ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrata a secchezza, ed il residuo solido ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna con eluente CHCl<sub>3</sub>, ottenendo la **8-formil-7-idrossi-4-metilcumarina** (0.70 g, resa 30%), con p.f. 184°C.

##### METODO B

Una miscela di 7-idrossi-4-metilcumarina (1.0 g, 5.7 mmoli), urotropina (1.8 g, 13.1 mmoli) ed AcOH (50 ml) è stata irradiata a 100W, mantenendo una temperatura di 120°C e per 15 minuti. Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata versata in acqua ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato trattato a caldo con MeOH ed il solido indisciolti è stato raccolto per filtrazione, ottenendo la **8-formil-7-idrossi-4-metilcumarina** (1.73 g, resa 75%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>)

12.21 (s, 1 H, -OH)

10.62 (s, 1 H, -CHO)

7.73 (d, J=9.0, 1 H, 5-H)

6.90 (dd, J=9.0, 1 H, 6-H)

6.20 (q, J=1.2, 1 H, 3-H)

2.42 (d, J=1.2, 3 H, 4-Me)

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>)

193.37, 165.24, 159.19, 156.13, 152.62, 132.85, 114.27, 112.02, 111.95, 108.65,  
18.95.

**HRMS** (ESI-TOF) per C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub> (M<sup>+</sup> +1)

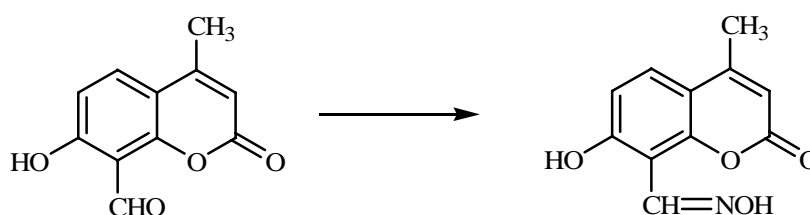
(M <sup>+</sup> ) +1	205.0495 (calcolato)	205.0489 (trovato)
----------------------	----------------------	--------------------

**ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 64.71%, H 3.95%

Trovato: C 64.75%, H 3.93%

### Sintesi di 7-idrossi-8-idrossimminometil-4-metilcumarina



Ad una soluzione di 8-formil-7-idrossi-4-metilcumarina (0.40 g, 2.0 mmoli) in MeOH (30 ml), sono state aggiunte 3 gocce di piridina ed una soluzione di idrossilamina cloridrato (0.20 g, 2.4 mmoli) in MeOH (15 ml). La miscela di reazione è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per 2 ore (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10) e successivamente concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato ripreso con acqua ed il solido indisciolti è stato raccolto per filtrazione, ottenendo la **7-idrossi-8-idrossimminometil-4-metilcumarina** (0.24 g, resa 55%), con p.f. 260°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

11.94 (s, 1 H, -CHNOH)  
11.17 (s, 1 H, -OH)  
8.56 (s, 1 H, -CHNOH)  
7.68 (d, J=8.9, 1 H, 5-H)  
6.95 (d, J=8.9, 1 H, 6-H)  
6.24 (q, J=1.1, 1 H, 3-H)  
2.40 (d, J=1.1, 3 H, 4-Me)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

159.70, 159.20, 153.68, 151.77, 144.02, 127.25, 112.83, 112.05, 110.69, 104.97, 18.25.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>4</sub> (M<sup>+</sup> +1)

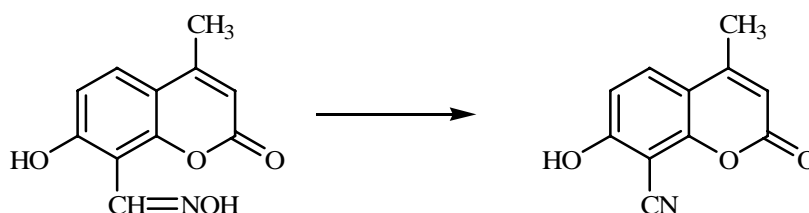
(M<sup>+</sup>) +1                      220.0604 (calcolato)                      220.0591 (trovato)

### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 60.27%, H 4.14%, N 6.39%

Trovato: C 60.30%, H 4.16%, N 6.37%

### Sintesi di 8-ciano-7-idrossi-4-metilcumarina



Una miscela contenente 7-idrossi-8-idrossimminometil-4-metilcumarina (0.70 g, 3.2 mmoli) ed  $\text{Ac}_2\text{O}$  (50 ml) è stata lasciata a riflusso per 50 minuti (TLC:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 90/10). La miscela di reazione è stata diluita con acqua, neutralizzata con  $\text{NaHCO}_3$  ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , concentrata a secchezza ed il residuo solido è stato ripreso con una miscela di AcOH (30 ml) ed  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. (2 ml). La soluzione risultante è stata posta a riflusso per 2 ore (TLC:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 90/10). La miscela di reazione è stata ripresa con acqua, neutralizzata con  $\text{NaHCO}_3$  ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrata a secchezza. Il solido ottenuto è stato solubilizzato nella minima quantità a caldo di EtOAc e fatto precipitare in forma cristallina per lenta aggiunta di CE, ottenendo la **8-ciano-7-idrossi-4-metilcumarina** (80 mg, resa 35%), con p.f.>300°C.

#### $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ )

- 7.86 (d,  $J=9.0$ , 1 H, 5-H)  
6.97 (d,  $J=9.0$ , 1 H, 6-H)  
6.26 (q,  $J=1.4$ , 1 H, 3-H)  
2.37 (d,  $J=1.4$ , 3 H, 4-Me)

#### $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ )

- 163.60, 158.60, 155.53, 153.29, 131.20, 112.60, 112.25, 111.94, 111.07, 88.01, 18.07.

**HRMS** (ESI-TOF) per  $C_{11}H_8NO_3$  ( $M^+ + 1$ )

( $M^+$ ) +1

202.0558 (calcolato)

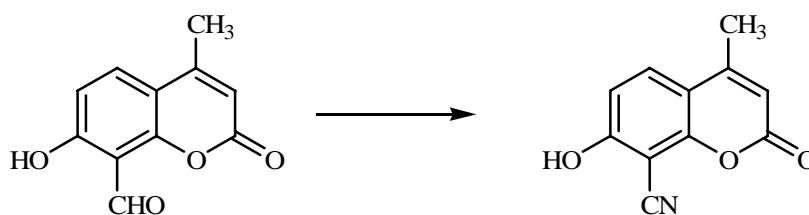
202.0499 (trovato)

**ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 65.67%, H 3.51%, N 6.96%

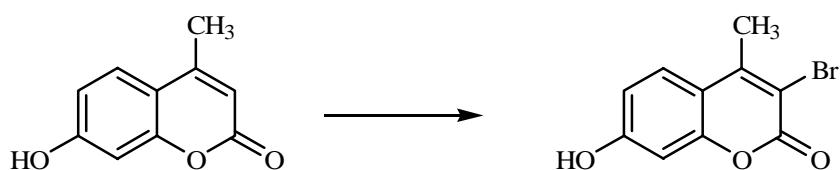
Trovato: C 65.64%, H 3.52%, N 6.97%

### Sintesi di 8-ciano-7-idrossi-4-metilcumarina



La miscela di 8-formil-7-idrossi-4-metilcumarina (0.30 g, 1.5 mmoli), idrossilamina cloridrato (0.15 g, 1.8 mmoli) e NMP (2.5 ml) è stata irradiata con una potenza di 100W, raggiungendo una temperatura di 140°C per 12 min (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata ripresa con acqua ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata lavata con acqua, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato purificato mediante cromatografia Flash Column con eluente EtOAc, ottenendo la **8-ciano-7-idrossi-4-metilcumarina** (0.24 g, resa 81%).

### Sintesi di 3-bromo-7-idrossi-4-metilcumarina



La 7-idrossi-4-metilcumarina (2.0 g, 10.3 mmoli) è stata sciolta nella minima quantità di AcOH glaciale (80 ml); alla soluzione è stata aggiunta, a piccole porzioni, alla temperatura di 60°C, una soluzione contenente bromo (0.26 ml, 5.1 mmoli) in AcOH glaciale. La miscela di reazione è stata lasciata per 3 ore a 60°C (TLC: CE/EtOAc, 50/50). Per raffreddamento si è formato un precipitato che è stato raccolto per filtrazione e purificato mediante cristallizzazioni successive da MeOH, ottenendo la **3-bromo-7-idrossi-4-metilcumarina** (0.30 g, resa 12%), con p.f. 190°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

10.80 (s all., 1 H, -OH)  
7.82 (d, J=8.8, 1 H, 5-H)  
6.97 (dd, J=8.8, J=2.2, 1 H, 6-H)  
6.86 (d, J=2.2, 1 H, 8-H)  
2.67 (s, 3 H, 4-Me)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

161.32, 156.39, 153.03, 151.89, 127.18, 113.41, 111.67, 107.37, 101.93, 19.39.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>BrO<sub>3</sub> (M<sup>-</sup> -1)

(M <sup>-</sup> ) -1	252.9500 (calcolato)	252.9466 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2) -1	254.9480 (calcolato)	254.9442 (trovato)

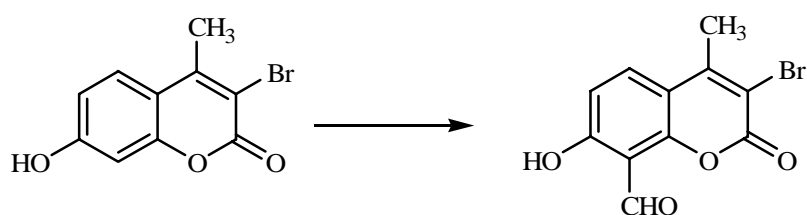
#### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 47.09%, H 2.77%, Br 31.33%

Trovato: C 47.11%, H 2.79%, Br 31.28%



## Sintesi di 3-bromo-8-formil-7-idrossi-4-metilcumarina



### METODO A

Una miscela di 3-bromo-7-idrossi-4-metilcumarina (3.0 g, 11.8 mmoli), urotropina (3.8 g, 27.1 mmoli) ed AcOH (50 ml) è stata riscaldata a riflusso per 2 ore (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata aggiunta di HCl dil. (30 ml) e portata a riflusso per 10 min. La soluzione è stata ripresa con acqua ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrata a secchezza, ed il residuo solido ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna con eluente CHCl<sub>3</sub>, ottenendo la **3-bromo-8-formil-7-idrossi-4-metilcumarina** (0.95 g, resa 28%), con p.f. 214°C.

### METODO B

Una miscela di 3-bromo-7-idrossi-4-metilcumarina (1.0 g, 3.9 mmoli), urotropina (1.26 g, 9.0 mmoli) ed AcOH (40 ml) è stata irradiata a 100W, mantenendo una temperatura di 120°C e per 15 minuti. Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata versata in acqua ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato trattato a caldo con MeOH ed il solido indisciolto è stato raccolto per filtrazione, ottenendo la **3-bromo-8-formil-7-idrossi-4-metilcumarina** (0.76 g, resa 69%).

### <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

11.92 (s, 1 H, -OH)

10.45 (s, 1 H, 8-CHO)

8.50 (d, J=9.2, 1 H, 5-H)

2.59 (d, J=9.2, 1 H, 6-H)

2.59 (s, 3 H, 4-Me)

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

193.11, 159.82, 158.78, 151.25, 149.62, 127.33, 112.40, 111.84, 108.21, 104.23, 19.34.

**HRMS** (ESI-TOF) per C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Br (M<sup>-</sup> -1)

(M <sup>-</sup> ) -1	280.9449 (calcolato)	280.9399 (trovato)
----------------------	----------------------	--------------------

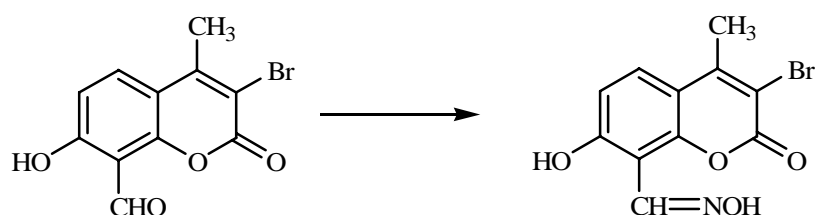
(M <sup>+2</sup> ) -1	282.9507 (calcolato)	282.9523 (trovato)
-----------------------	----------------------	--------------------

#### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 46.67%, H 2.49%, Br 28.23%

Trovato: C 46.69%, H 2.46%, Br 28.28%

### Sintesi di 3-bromo-7-idrossi-8-idrossiminometil-4-metilcumarina



Ad una soluzione di 3-bromo-8-formil-7-idrossi-4-metilcumarina (0.40 g, 1.4 mmoli) in MeOH (30 ml), sono state aggiunte 3 gocce di piridina ed una soluzione di idrossilamina cloridrato (0.12 g, 1.7 mmoli) in MeOH (15 ml). La miscela di reazione è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per 2 ore (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10) e successivamente concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato ripreso con acqua ed il solido indisciolto è stato raccolto per filtrazione, ottenendo la **3-bromo-7-idrossi-8-idrossiminometil-4-metilcumarina** (0.41 g, resa 98%), con p.f. 263°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

11.97 (s, 1 H, -CHNOH)

11.25 (s, 1 H, -OH)

8.52 (s, 1 H, -CHNOH)

7.79 (d, J=8.8, 1 H, 5-H)

6.99 (d, J=8.8, 1 H, 6-H)

2.57 (s, 3 H, 4-Me)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

159.83, 155.75, 152.06, 150.13, 143.62, 127.88, 113.50, 112.01, 108.13, 105.04, 19.47.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>NBrO<sub>4</sub> (M<sup>-</sup> -1)

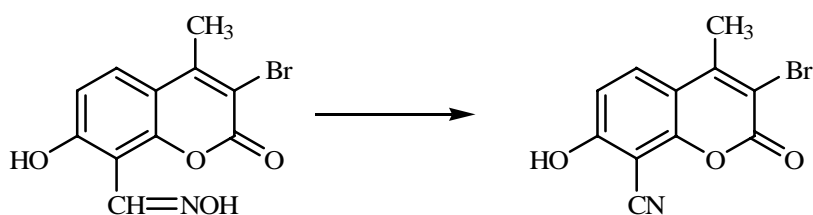
(M <sup>-</sup> +1)	295.9558 (calcolato)	295.9537 (trovato)
(M <sup>-</sup> + 2) -1	297.9616 (calcolato)	297.9657 (trovato)

### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 44.32%, H 2.71%, Br 26.81%, N 4.70%

Trovato: C 44.29%, H 2.73%, Br 26.77%, N 4.65%

### Sintesi di 3-bromo-8-ciano-7-idrossi-4-metilcumarina



Una miscela contenente 3-bromo-7-idrossi-8-idrossimminometil-4-metilcumarina (0.80 g, 2.7 mmoli) ed Ac<sub>2</sub>O (50 ml) è stata lasciata a riflusso per 50 minuti (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata diluita con acqua, neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub> ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrata a secchezza ed il residuo solido è stato ripreso con una miscela di AcOH (30 ml) ed H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (2 ml). La soluzione risultante è stata posta a riflusso per 2 ore (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata ripresa con acqua, neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub> ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a secchezza. Il solido ottenuto è stato solubilizzato nella minima quantità a caldo di EtOAc e fatto precipitare in forma cristallina per lenta aggiunta di CE, ottenendo la **3-bromo-8-ciano-7-idrossi-4-metilcumarina** (0.20 g, resa 27%), con p.f.>300°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

7.91 (d, J=8.9, 1 H, 5-H)

6.95 (d, J=8.9, 1 H, 6-H)

2.54 (s, 3 H, 4-Me)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

165.26 154.60, 151.63, 131.38, 113.71, 112.94, 110.78, 107.38, 87.76, 85.78, 19.38.

**HRMS (ESI-TOF) per  $C_{11}H_5BrNO_3$  ( $M^- -1$ )**

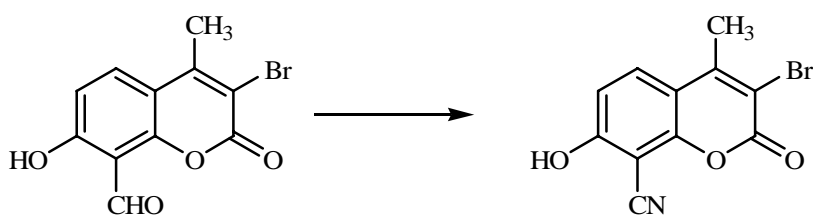
(M) -1	277.9458 (calcolato)	277.9485 (trovato)
(M+2) -1	279.9511 (calcolato)	279.9480 (trovato)

**ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 47.17%, H 2.16%, Br 28.53%, N 5.00%

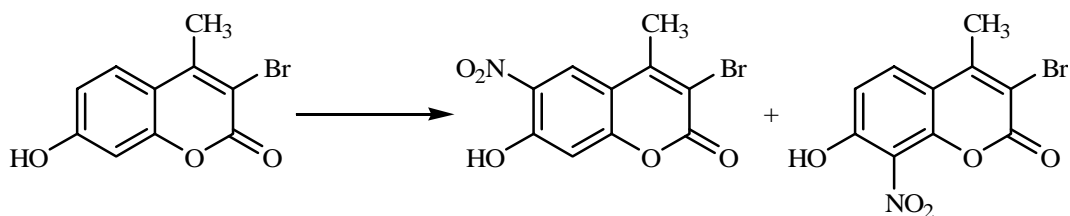
Trovato: C 47.15%, H 2.18%, Br 28.60%, N 5.02%

### Sintesi di 3-bromo-8-ciano-7-idrossi-4-metilcumarina



La miscela di 3-bromo-8-formil-7-idrossi-4-metilcumarina (0.12 g, 0.42 mmoli), idrossilamina cloridrato (0.04 g, 0.50 mmoli) e NMP (2.5 ml) è stata irradiata con una potenza di 100W, raggiungendo una temperatura di 140°C per 12 min (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata ripresa con acqua ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata lavata con acqua, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato purificato mediante cromatografia Flash Column con eluente EtOAc, ottenendo la **3-bromo-8-ciano-7-idrossi-4-metilcumarina** (0.08 g, resa 68%).

Sintesi di 3-bromo-7-idrossi-4-metil-6-nitrocumarina e 3-bromo-7-idrossi-4-metil-8-nitrocumarina



Una soluzione di 3-bromo-7-idrossi-4-metilcumarina (0.4 g, 1.6 mmoli) in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. (20 ml) è stata termostata a  $0^\circ\text{C}$  ed aggiunta, goccia a goccia, di una soluzione di  $\text{HNO}_3$  65% (1.0 ml) in 1 ml di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. mantenendo la temperatura della miscela di reazione a  $0^\circ\text{C}$ . Al termine dell'aggiunta la miscela di reazione è stata versata in acqua (80 ml) ed il precipitato formatosi è stato separato per filtrazione e purificato mediante cromatografia su colonna con eluente  $\text{CHCl}_3$ , isolando dapprima la **3-bromo-7-idrossi-4-metil-6-nitrocumarina** che è stata cristallizzata da MeOH (0.19 g, resa 40%), con p.f.  $234^\circ\text{C}$ , e successivamente, con eluente MeOH, la **3-bromo-7-idrossi-4-metil-8-nitrocumarina** che è stata solubilizzata a caldo in MeOH e fatta precipitare in forma cristallina per lenta aggiunta di CE (0.19 g, resa 40%), con p.f.  $245^\circ\text{C}$ .

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ) di 3-bromo-7-idrossi-4-metil-6-nitrocumarina

10.80 (s all., 1 H, -OH)

8.47 (s, 1 H, 5-H)

7.08 (s, 1 H, 8-H)

2.67 (s, 3 H, 4-Me)

**HRMS** (ESI-TOF) per  $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{BrNO}_5$  ( $M^- -1$ ) 3-bromo-7-idrossi-4-metil-6-nitrocumarina

( $M^-$ ) -1                      297.9357 (calcolato)                      297.9340 (trovato)

( $M^+2$ ) -1                      299.9337 (calcolato)                      299.9331 (trovato)



**ANALISI ELEMENTARE** di 3-bromo-7-idrossi-4-metil-6-nitrocumarina

Teorico: C 40.03%, H 2.02%, Br 26.63%, N 4.67%

Trovato: C 40.06%, H 1.98%, Br 26.67%, N 4.63%

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>) di 3-bromo-7-idrossi-4-metil-8-nitrocumarina

7.37 (d, J=9.5, 1 H, 5-H)

6.31 (d, J=9.5, 1 H, 6-H)

2.45 (s, 3 H, 4-Me)

**HRMS** (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>BrNO<sub>5</sub> (M<sup>-</sup> -1) di 3-bromo-7-idrossi-4-metil-8-nitrocumarina

(M <sup>-</sup> ) -1	297.9357 (calcolato)	297.9348 (trovato)
----------------------	----------------------	--------------------

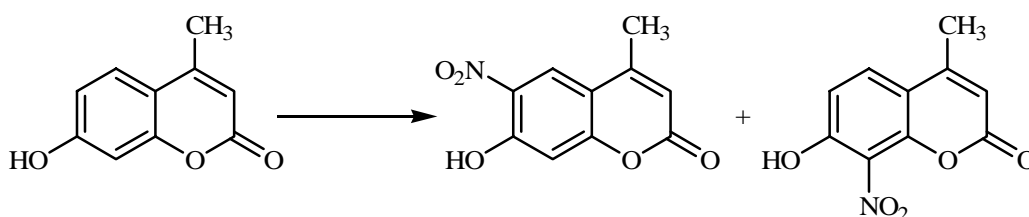
(M <sup>+2</sup> ) -1	299.9337 (calcolato)	299.9332 (trovato)
-----------------------	----------------------	--------------------

**ANALISI ELEMENTARE** di 3-bromo-7-idrossi-4-metil-8-nitrocumarina

Teorico: C 40.03%, H 2.02%, Br 26.63%, N 4.67%

Trovato: C 40.00%, H 1.96%, Br 26.71%, N 4.70%

Sintesi di 7-idrossi-4-metil-6-nitrocumarina e 7-idrossi-4-metil-8-nitrocumarina



Una soluzione di 7-idrossi-4-metilcumarina (5.0 g, 28.4 mmoli) in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (80 ml) è stata termostata a 0°C ed aggiunta, goccia a goccia, di una soluzione di HNO<sub>3</sub> 65% (1.8 ml) in 2 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. mantenendo la temperatura della miscela di reazione a 0°C.

Al termine dell'aggiunta la miscela di reazione è stata versata in 150 ml di acqua e ghiaccio ed il precipitato formatosi è stato separato per filtrazione e purificato mediante cromatografia su colonna con eluente CHCl<sub>3</sub>, isolando dapprima la **7-idrossi-4-metil-6-nitrocumarina** (2.7 g, resa 42%), con p.f. 262°C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

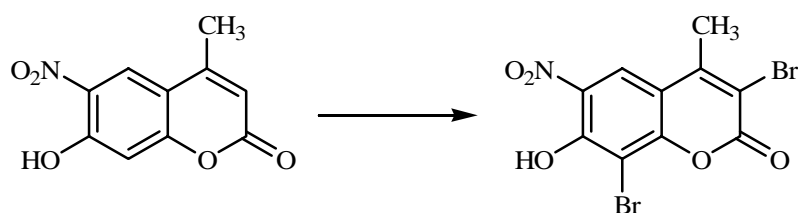
- 11.95 (s all., 1 H, -OH)
- 8.25 (s, 1 H, 5-H)
- 6.95 (s, 1 H, 8-H)
- 6.31 (q, J=1.1, 1 H, 3-H)
- 2.39 (d, J=1.1, 1 H, 4-Me)

e successivamente la **7-idrossi-4-metil-8-nitrocumarina** (2.6 g, resa 41%), con p.f. 255°C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

- 12.14 (s all., 1 H, -OH)
- 7.77 (d, J=9.0, 1 H, 5-H)
- 7.03 (d, J=9.0, 1 H, 6-H)
- 6.28 (q, J=1.3, 1 H, 3-H)
- 2.40 (d, J=1.3, 3 H, 4-Me)

### Sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-metil-6-nitrocumarina



Una soluzione di 7-idrossi-4-metil-6-nitrocumarina (0.30 g, 1.4 mmoli) in CH<sub>3</sub>CN è stata addizionata di NBS (0.71 g, 4.0 mmoli) e posta a riflusso per 30 minuti (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido è stato cristallizzato da MeOH, ottenendo la **3,8-dibromo-7-idrossi-4-metil-6-nitrocumarina** (0.45 g, resa 87%), con p.f. 252°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

8.41 (s, 1 H, 5-H)

2.60 (s, 3 H, 4-Me)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

155.08, 152.57, 152.12, 150.72, 134.60, 121.97, 112.35, 110.56, 101.26, 19.39.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>5</sub> (M<sup>-</sup>-1)

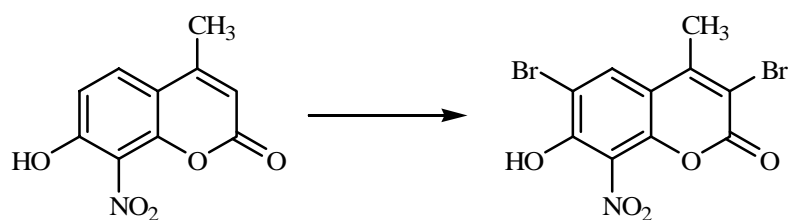
(M <sup>-</sup> ) -1	375.8462 (calcolato)	375.8518 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2) -1	377.8442 (calcolato)	377.8500 (trovato)
(M <sup>-</sup> +4) -1	379.8423 (calcolato)	379.8451 (trovato)

#### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 31.69%, H 1.33%, Br 42.17%, N 3.70%

Trovato: C 31.73%, H 1.29%, Br 41.98%, N 3.64%

### Sintesi di 3,6-dibromo-7-idrossi-4-metil-8-nitrocumarina



Una soluzione di 7-idrossi-4-metil-8-nitrocumarina (0.30 g, 1.4 mmoli) in CH<sub>3</sub>CN è stata addizionata di NBS (0.71 g, 4.0 mmoli) e posta a riflusso per 30 minuti (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 95/5). La miscela di reazione è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido è stato cristallizzato da MeOH, ottenendo la **3,6-dibromo-7-idrossi-4-metil-8-nitrocumarina** (0.49 g, resa 95%), con p.f. 251°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

8.42 (s, 1 H, 5-H)

2.60 (s, 3 H, 4-Me)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

156.52, 156.24, 155.78, 152.42, 133.75, 124.17, 115.51, 113.55, 102.13, 20.83.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>5</sub> (M<sup>-</sup>-1)

(M <sup>-</sup> )-1	375.8462 (calcolato)	375.8476 (trovato)
(M <sup>+2</sup> )-1	377.8442 (calcolato)	377.8469 (trovato)
(M <sup>+4</sup> )-1	379.8423 (calcolato)	379.8441 (trovato)

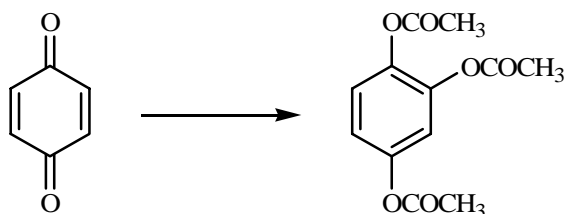
#### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 31.69%, H 1.33%, Br 42.17%, N 3.70%

Trovato: C 31.72%, H 1.32%, Br 42.21%, N 3.59%

## Sintesi di bromoderivati della 6,7-diidrossi-4-metilcumarina

### Sintesi di 1,2,4-triacetossibenzene

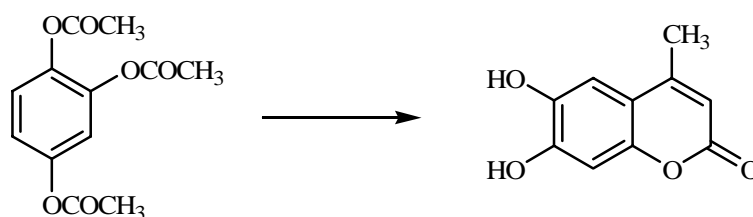


Ad una miscela di Ac<sub>2</sub>O (45.0 ml, 475.3 mmoli) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 ml) è stato aggiunto 1,4-benzochinone (15.0 g, 138.7 mmoli) e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione per 30 minuti alla temperatura di 45°C (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 95/5). La miscela di reazione è stata versata in 600 ml di acqua e ghiaccio ed il precipitato è stato separato per filtrazione, ottenendo il **1,2,4-triacetossibenzene** (10.3 g, resa 29%), con p.f. 97°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

- 7.19 (d, J=8.9, 1 H, 6-H)
- 7.05 (d, J=2.5, 1 H, 3-H)
- 7.01 (dd, J=8.9, J=2.5, 1 H, 5-H)
- 2.29 (s, 9 H, -Me)

### Sintesi della 6,7-diidrossi-4-metilcumarina

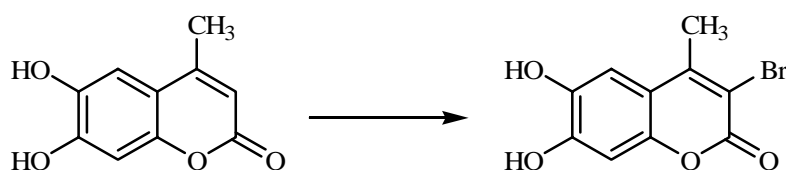


Una soluzione di 1,2,4-triacetossibenzene (3.0 g, 11.9 mmoli) in etile acetoacetato (1.8 ml, 14.3 mmoli) è stata aggiunta di 8 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc.. La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 90 minuti (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata versata in acqua (300 ml) ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a secchezza. Il residuo solido ottenuto è stato solubilizzato nella minima quantità a caldo di MeOH e fatto precipitare in forma cristallina per lenta aggiunta di acqua, ottenendo la **6,7-diidrossi-4-metilcumarina** (0.92 g, resa 40%), con p.f. 292°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

- 9.98 (s all., 1 H, 6-OH o 7-OH)
- 9.13 (s all., 1 H, 6-OH o 7-OH)
- 7.02 (s, 1 H, 5-H)
- 6.73 (s, 1 H, 8-H)
- 6.08 (q, J=1.2, 1 H, 3-H)
- 2.32 (d, J=1.2, 3 H, 4-Me)

### Sintesi della 3-bromo-6,7-diidrossi-4-metilcumarina



Ad una soluzione di 6,7-diidrossi-4-metilcumarina (0.10 g, 0.52 mmoli) in acido acetico glaciale (15 ml) è stata aggiunta, a piccole porzioni, a temperatura di ambiente, una soluzione contenente bromo (0.03 ml, 0.52 mmoli) in AcOH glaciale. La miscela di reazione è stata mantenuta per 30 minuti a temperatura ambiente (TLC: CE/EtOAc, 50/50). Per raffreddamento si è formato nella miscela di reazione un precipitato che è stato dapprima separato per filtrazione e lavato abbondantemente con acqua e successivamente solubilizzato nella minima quantità a caldo di MeOH e fatto precipitare in forma cristallina per lenta aggiunta di acqua, ottenendo la **3-bromo-6,7-diidrossi-4-metilcumarina** (0.13 g, resa 92%), con p.f. 245°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

10.03 (s all., 2 H, 6-OH o 7-OH)

7.09 (s, 1 H, 5-H)

6.77 (s, 1 H, 8-H)

2.50 (s, 3 H, 4-Me)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

156.72, 151.67, 150.49, 146.07, 143.27, 111.21, 109.90, 107.56, 102.42, 19.40.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>BrO<sub>4</sub> (M<sup>-</sup> -1)

(M<sup>-</sup>) -1                      268.9540 (calcolato)                      268.9555 (trovato)

(M<sup>-</sup>+2) -1                      270.9501 (calcolato)                      270.9436 (trovato)

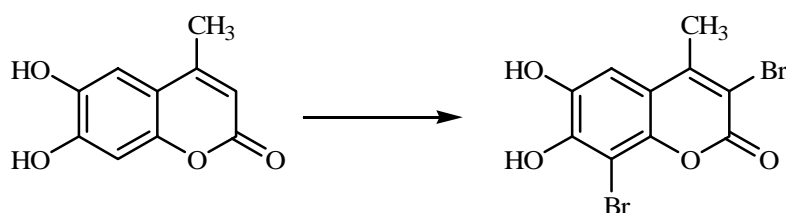
### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 44.31%, H 2.60%, Br 29.48%

Trovato: C 44.28%, H 2.70%, Br 29.54%



### Sintesi della 3,8-dibromo-6,7-diidrossi-4-metilcumarina



Ad una soluzione di 6,7-diidrossi-4-metilcumarina (0.20 g, 1.0 mmoli) in acido acetico glaciale (25 ml) è stata aggiunta, a piccole porzioni, alla temperatura di 60°C, una soluzione contenente bromo (0.15 ml, 3.0 mmoli) in AcOH glaciale. La miscela di reazione è stata termostata per 30 minuti a 60°C (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Per raffreddamento si è formato nella miscela di reazione un precipitato che è stato separato per filtrazione e lavato abbondantemente con acqua. Il solido ottenuto è stato cristallizzato da EtOAc, ottenendo la **3,8-dibromo-6,7-diidrossi-4-metilcumarina** (0.22 g, resa 61%), con p.f. 264°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

10.44 (s all., 2 H, 6-OH o 7-OH)

7.13 (s, 1 H, 5-H)

2.52 (s, 3 H, 4-Me)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

156.35, 151.53, 148.46, 143.38, 143.08, 111.54, 108.43, 108.34, 97.23, 19.62.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M<sup>-</sup>-1)

(M <sup>-</sup> ) -1	346.8560 (calcolato)	346.8610 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2) -1	348.8540 (calcolato)	348.8575 (trovato)
(M <sup>-</sup> +4) -1	350.8521 (calcolato)	350.8557 (trovato)

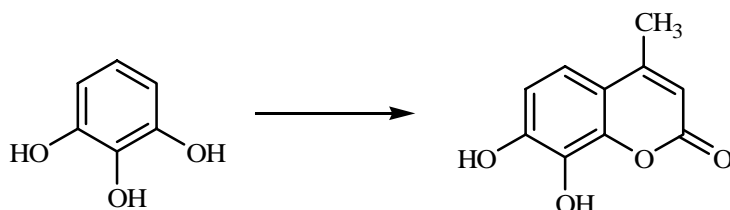
#### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 34.32%, H 1.73%, Br 45.66%

Trovato: C 34.36%, H 1.67%, Br 45.60%

## Sintesi di bromoderivati 7,8-diidrossi-4-metilcumarina

### Sintesi della 7,8-diidrossi-4-metilcumarina



Ad una miscela di pirogallolo (3.0 g, 23.8 mmoli) ed etile acetoacetato (3.6 ml, 28.5 mmoli) è stato aggiunto goccia a goccia, in bagno di ghiaccio, l' $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. (35 ml). Al termine dell'aggiunta (15 minuti) la miscela di reazione è stata versata in 200 ml di acqua e ghiaccio ed il precipitato formatosi è stato separato per filtrazione e cristallizzato da MeOH, ottenendo la **7,8-diidrossi-4-metilcumarina** (2.7 g, resa 59%), con p.f.  $236^\circ\text{C}$ .

#### $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ )

10.10 (s all., 1 H, 7-OH o 8-OH)

9.43 (s all., 1 H, 7-OH o 8-OH)

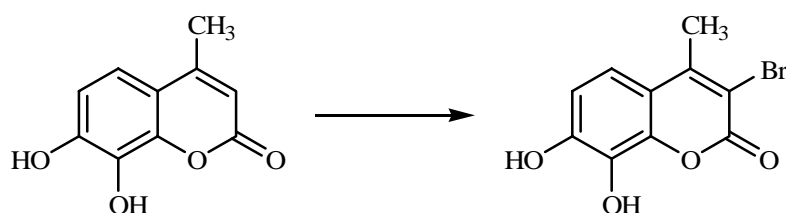
7.10 (d, 1 H, 5-H)

6.82 (d, 1 H, 6-H)

6.08 (q,  $J=1.4$ , 1 H, 3-H)

2.35 (d,  $J=1.4$ , 3 H, 4-Me)

### Sintesi della 3-bromo-7,8-diidrossi-4-metilcumarina



Ad una soluzione di 7,8-diidrossi-4-metilcumarina (0.20 g, 1.0 mmoli) in acido acetico glaciale (20 ml) è stata aggiunta, a piccole porzioni, alla temperatura di 60°C, una soluzione contenente bromo (0.05 ml, 1.0 mmoli) in AcOH glaciale. Nella miscela di reazione si ha l'immediata formazione di un precipitato che è stato separato per filtrazione e lavato abbondantemente con acqua ed il solido ottenuto è stato solubilizzato nella minima quantità a caldo di EtOAc e fatto precipitare in forma cristallina per lenta aggiunta di CE, ottenendo la **3-bromo-7,8-diidrossi-4-metilcumarina** (0.14 g, resa 51%), con p.f. 255°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

10.25 (s all., 1 H, 7-OH o 8-OH)

9.46 (s all., 1 H, 7-OH o 8-OH)

7.21 (d, J=8.9, 1 H, 5-H)

6.85 (d, J=8.9, 1 H, 6-H)

2.54 (s, 3 H, 4-Me)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

156.43, 152.45, 149.67, 141.72, 132.06, 116.22, 112.74, 112.57, 107.50, 19.44.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>BrO<sub>4</sub> (M<sup>-</sup>-1)

(M<sup>-</sup>)-1                                      268.9455 (calcolato)                                      268.9509 (trovato)

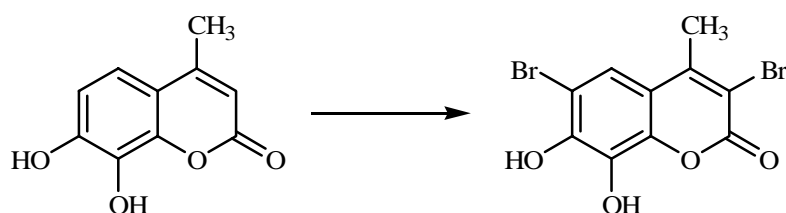
(M<sup>-</sup>+2)-1                                      270.9436 (calcolato)                                      270.9493 (trovato)

### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 44.31%, H 2.60%, Br 29.48%

Trovato: C 44.32%, H 2.63%, Br 29.45%

### Sintesi della 3,6 dibromo-7,8-diidrossi-4-metilcumarina



Ad una soluzione di 7,8-diidrossi-4-metilcumarina (0.20 g, 1.0 mmoli) in acido acetico glaciale (20 ml) è stata aggiunta, a piccole porzioni, alla temperatura di 60°C, una soluzione contenente bromo (0.16 ml, 3.0 mmoli) in AcOH glaciale. La miscela di reazione è stata termostata a 60°C per 1 ora (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Per raffreddamento si è formato nella miscela di reazione un precipitato che è stato separato per filtrazione e lavato abbondantemente con acqua. Il solido ottenuto è stato cristallizzato da MeOH, ottenendo la **3,6-dibromo-7,8-diidrossi-4-metilcumarina** (0.18 g, resa 52%), con p.f. 264°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

7.54 (s, 1 H, 5-H)

2.55 (s, 3 H, 4-Me)

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M<sup>-</sup> -1)

(M <sup>-</sup> ) -1	346.8560 (calcolato)	346.8656 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2) -1	348.8540 (calcolato)	348.8618 (trovato)
(M <sup>-</sup> +4) -1	350.8521 (calcolato)	350.8581 (trovato)

#### ANALISI ELEMENTARE

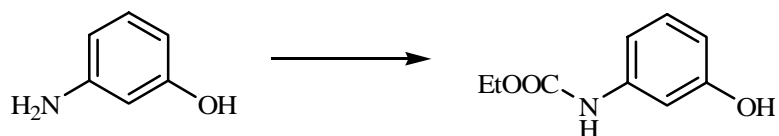
Teorico: C 34.32%, H 1.73%, Br 45.66%

Trovato: C 34.34%, H 1.69%, Br 45.63%

### 6.3.3.2 SINTESI DI BROMO-4-METILCUMARINE SOSTITUITE IN POSIZIONE 7

#### Sintesi di bromoderivati 7-amino-4-metilcumarinici

##### Sintesi di etile (3-idrossifenil)carbammato

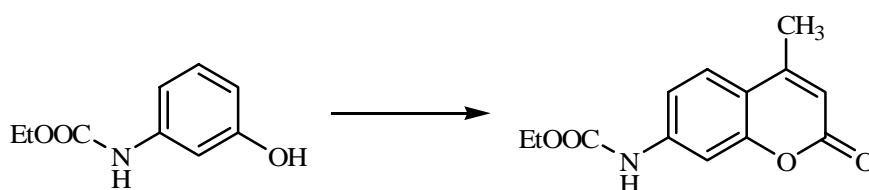


Ad una soluzione di 3-aminofenolo (5.0 g, 45.8 mmoli) in THF (32 ml), è stato aggiunto etile cloroformiato (11 ml, 115.6 mmoli). La miscela di reazione è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per 1 ora (TLC: CE/EtOAc, 50/50) e successivamente concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato ripreso con acqua ed estratto a fondo con  $\text{CHCl}_3$ . La fase organica è stata anidrificata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrata a secchezza, ottenendo l'etile (3-idrossifenil)carbammato (4.7 g, resa 56%) con p.f.  $97^\circ\text{C}$ .

##### $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{DMSO-}d_6$ )

9.44	(s, 1 H, -NH- o -OH)
9.29	(s, 1 H, -NH- o -OH)
7.04-6.99	(m, 2 H aromatici)
6.86-6.83	(m, 1 H aromatico)
6.40-6.36	(m, 1 H aromatico)
4.09	(q, $J=7.1$ , 2 H, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ )
1.22	(t, $J=7.1$ , 3 H, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ )

### Sintesi di etile (4-metilcumarin-7-il)carbammato



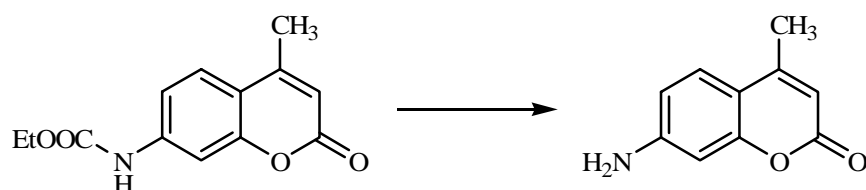
All'etile (3-idrossifenil)carbammato (3.0 g, 16.6 mmoli) sono stati aggiunti etile acetoacetato (2.5 ml, 19.9 mmoli) ed H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70% (80 ml). La miscela di reazione è stata posta in agitazione a temperatura ambiente per 5 ore (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). A reazione ultimata, la soluzione è stata versata in acqua e ghiaccio e mantenuta in agitazione, ottenendo la formazione di un precipitato che è stato recuperato mediante filtrazione e lavato abbondantemente con acqua.

Il residuo solido è stato cristallizzato da EtOH ottenendo così l'**etile (4-metilcumarin-7-il)carbammato** (3.5 g, resa 85%) con p.f. 195°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

- 10.18 (s, 1H, -NH-)
- 7.68 (d, J=8.7, 1 H, 5-H)
- 7.55 (d, J=2.1, 1 H, 8-H)
- 7.40 (dd, J=8.7, J=2.1, 1 H, 6-H)
- 6.22 (q, J=1.3, 1 H, 3-H)
- 4.17 (q, J=7.1, 2 H, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)
- 2.38 (d, J=1.3, 3 H, 4-CH<sub>3</sub>)
- 1.26 (t, J=7.1, 3 H, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

### Sintesi di 7-amino-4-metilcumarina



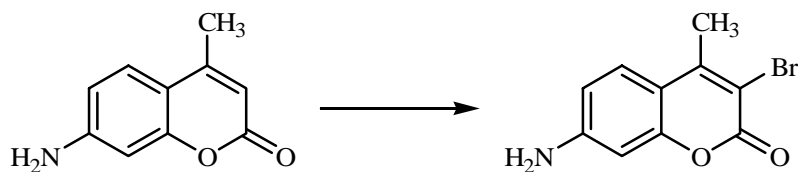
All'etile (4-metilcumarin-7-il)carbammato (2.0 g, 8.1 mmoli) sono stati aggiunti H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato (3.3 ml) ed acido acetico glaciale (10 ml). La miscela di reazione è stata posta a riflusso sotto agitazione per 5 ore (TLC: CE/EtOAc, 50/50). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata versata in acqua e ghiaccio e alcalinizzata con NaHCO<sub>3</sub>, ottenendo un abbondante precipitato che è stato recuperato per filtrazione, lavato con acqua e cristallizzato da EtOH, ottenendo la **7-amino-4-metilcumarina** (1.2 g, resa 83%) con p.f. 218°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

- 7.39 (d, J=8.6, 1 H, 5-H)
- 6.55 (dd, J=8.6, J=2.1, 1 H, 6-H)
- 6.39 (d, J=2.1, 1 H, 8-H)
- 6.08 (s, 2 H, -NH<sub>2</sub>)
- 5.89 (q, J=0.9, 1 H, 3-H)
- 2.29 (d, J=0.9, 3 H, 4-CH<sub>3</sub>)



### Sintesi di 7-amino-3-bromo-4-metilcumarina



Una soluzione di 7-amino-4-metilcumarina (0.10 g, 0.57mmoli) in acetonitrile (70 ml) è stata aggiunta, a piccole porzioni ed a temperatura ambiente, di NBS (0.1 g, 0.57 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata per 20 minuti sotto agitazione (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10), concentrata a secchezza, ed il residuo solido è stato cristallizzato da MeOH ottenendo la **7-amino-3-bromo-4-metilcumarina** (95 mg, resa 66%), con p.f. 206°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

7.52 (d, J=8.8, 1 H, 5-H)  
6.59 (dd, J=8.8, J=2.3, 1 H, 6-H)  
6.43 (d, J=2.3, 1 H, 8-H)  
6.27 (s, 2 H, -NH<sub>2</sub>)  
2.48 (s, 3 H, -4Me)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

156.17, 151.66, 149.25, 146.59, 128.40, 110.98, 106.94, 103.89, 93.52, 19.52.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>BrNO<sub>2</sub> (M<sup>+</sup>+1)

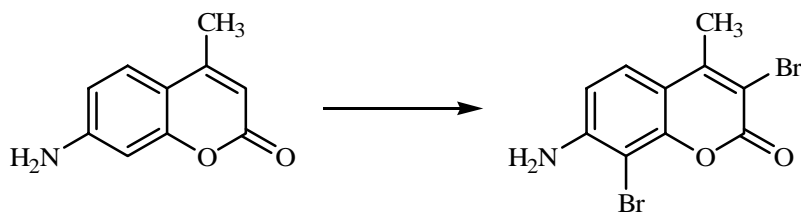
(M <sup>+</sup> ) +1	253.9811 (calcolato)	253.9823 (trovato)
(M <sup>+</sup> +2) +1	255.9791 (calcolato)	255.9834 (trovato)

#### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 47.27%, H 3.17%, Br 31.45%,N 5.51%

Trovato: C 47.25%, H 3.12%, Br 31.41%,N 5.52%

### Sintesi di 7-amino-3,8-dibromo-4-metilcumarina



La 7-amino-4-metilcumarina (0.30 g, 1.7 mmoli) è stata solubilizzata in AcOH glaciale (80 ml); alla soluzione è stata aggiunta, a piccole porzioni, alla temperatura di 60°C, una soluzione contenente bromo (0.91 g, 0.17 ml, 3.4 mmoli) in AcOH glaciale. La miscela di reazione è stata lasciata per 1 ora a 60°C (TLC: CE/EtOAc, 50/50). Per raffreddamento si è formato un precipitato che è stato raccolto per filtrazione e purificato per cristallizzazioni successive da EtOAc, ottenendo la **7-amino-3,8-dibromo-4-metilcumarina** (80 mg, resa 14%), con p.f. 218°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

7.57 (d, J=8.9, 1 H, 5-H)

6.79 (d, J=8.9, 1 H, 6-H)

6.47 (s, 2 H, -NH<sub>2</sub>)

2.51 (s, 3 H, 4-Me)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

156.40, 152.47, 150.34, 150.24, 125.70, 118.87, 109.64, 105.04, 92.51, 19.36.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> (M<sup>+</sup> +1)

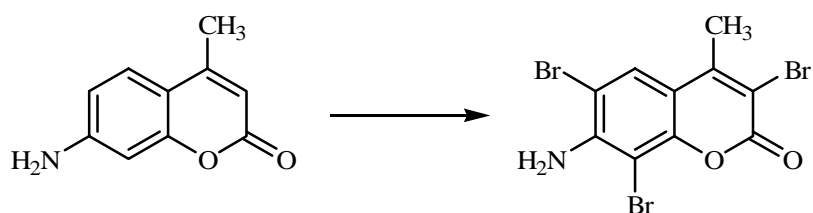
(M <sup>+</sup> ) +1	331.8922 (calcolato)	331.8889 (trovato)
(M <sup>+</sup> +2) +1	333.8901 (calcolato)	333.8870 (trovato)
(M <sup>+</sup> +4) +1	335.8881 (calcolato)	335.8827 (trovato)

### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 36.07%, H 2.12%, Br 47.99%, N 4.21%

Trovato: C 36.09%, H 2.14%, Br 47.91%, N 4.16%

## Sintesi di 7-amino-3,6,8-tribromo-4-metilcumarina



La 7-amino-4-metilcumarina (0.20 g, 1.1 mmoli) è stata solubilizzata in AcOH glaciale (80 ml); alla soluzione è stata aggiunta, a piccole porzioni, alla temperatura di 60°C, una soluzione contenente bromo (0.91 g, 0.17 ml, 3.4 mmoli) in AcOH glaciale. La miscela di reazione è stata lasciata per 3 ore a 60°C (TLC: CE/EtOAc, 50/50). Per raffreddamento si è formato un precipitato cristallino che è stato raccolto per filtrazione e lavato abbondantemente con acqua, ottenendo la **7-amino-3,6,8-tribromo-4-metilcumarina** (0.20 g, resa 44%), con p.f. 244°C.

### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

7.96 (s, 1 H, 5-H)

6.38 (s, 2 H, -NH<sub>2</sub>)

2.53 (s, 3 H, 4-Me)

### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

156.16, 151.66, 149.25, 146.58, 128.40, 110.98, 106.93, 103.87, 93.52, 19.52.

### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>Br<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> (M<sup>+</sup> +1)

(M <sup>+</sup> ) +1	409.8027 (calcolato)	409.7989 (trovato)
(M <sup>+</sup> +2) +1	411.8006 (calcolato)	411.8028 (trovato)
(M <sup>+</sup> +4) +1	413.7986 (calcolato)	413.8011 (trovato)
(M <sup>+</sup> +6) +1	415.7994 (calcolato)	415.8009 (trovato)

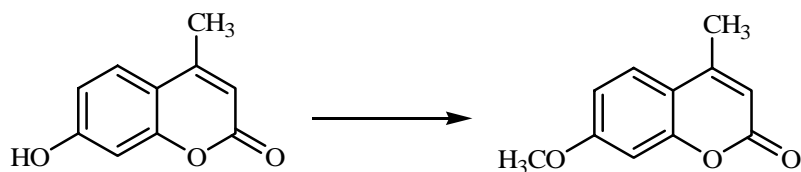
### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 29.16%, H 1.47%, Br 58.20%, N 3.40%

Trovato: C 29.19%, H 1.44%, Br 58.31%, N 3.39%

## Sintesi di 3,8-dibromo-7-metossi-4-metilcumarina

### Sintesi della 4-metil-7-metossicumarina

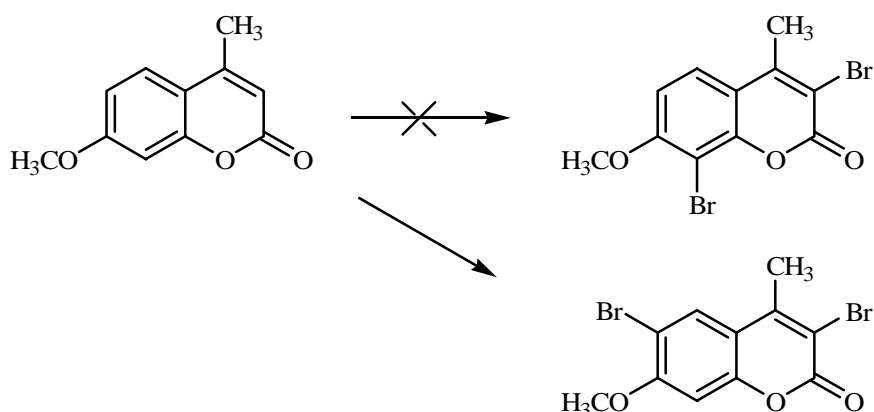


Una miscela di  $K_2CO_3$  (4.5 g, 32.6 mmoli) e 7-idrossi-4-metilcumarina (5.0 g, 28.4 mmoli) in acetone (120 ml) è stata addizionata di  $CH_3I$  (5.3 ml, 85.2 mmoli) e lasciata a temperatura ambiente 3 ore (TLC:  $CHCl_3/MeOH$ , 90/10). La miscela di reazione è stata filtrata e la soluzione organica è stata concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato trattato a caldo con MeOH ed il solido indisciolto è stato raccolto per filtrazione, ottenendo la **4-metil-7-metossicumarina** (5.4 g, resa quantitativa) con p.f. 170°C.

#### $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )

7.69	(d, J=9.2, 1 H, 5-H)
6.98-6.94	(m, 2 H, 6-H e 8-H)
6.20	(q, J=1.2, 1 H, 3-H)
3.86	(s, 3 H, -OCH <sub>3</sub> )
2.40	(d, J=1.2, 3 H, 4-Me)

### Tentativo di sintesi della 3,8-dibromo-7-metossi-4-metilcumarina



Ad una soluzione di 4-metil-7-metossicumarina (0.50 g, 2.6 mmoli) in acido acetico glaciale (15 ml) è stata aggiunta, a piccole porzioni, alla temperatura di 60°C, una soluzione contenente bromo (0.27 ml, 5.3 mmoli) in AcOH glaciale. La miscela di reazione è stata termostata a 60°C per 2 ore (TLC: CE/EtOAc, 50/50). Per lento raffreddamento si è formato nella miscela di reazione un precipitato che è stato separato per filtrazione e lavato abbondantemente con acqua. Il solido ottenuto è stato cristallizzato da EtOH, ottenendo la **3,6-dibromo-4-metil-7-metossicumarina** (0.50 g, resa 76%), con p.f. 239°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

8.08 (s, 1 H, 5-H)

7.25 (s, 1 H, 8-H)

3.96 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>)

2.58 (s, 3 H, 4-Me)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

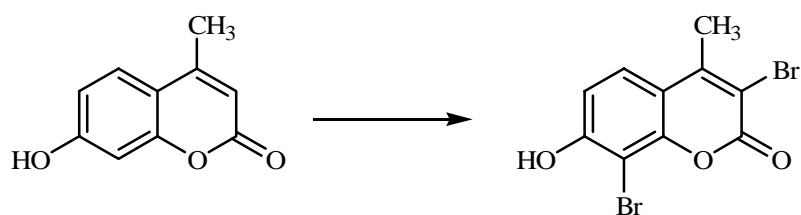
159.12, 156.58, 152.22, 147.40, 141.49, 133.22, 119.35, 113.65, 107.11, 58.20, 19.90.

#### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 37.97%, H 2.32%, Br 45.92%

Trovato: C 38.04%, H 2.29%, Br 46.02%

### Sintesi della 3,8-dibromo-7-idrossi-4-metilcumarina (DBC)



La 7-idrossi-4-metilcumarina (2.0 g, 11.3 mmoli) è stata sciolta nella minima quantità di AcOH glaciale (50 ml); alla soluzione è stata aggiunta, a piccole porzioni, alla temperatura di 60°C, una soluzione contenente bromo (3.6 g, 1.2 ml, 22.6 mmoli) in AcOH glaciale. La miscela di reazione è stata lasciata per 3 ore a 60°C (TLC: CE/EtOAc, 50/50). Per raffreddamento si è formato un precipitato che è stato raccolto per filtrazione e cristallizzato da EtOH, ottenendo la **3,8-dibromo-7-idrossi-4-metilcumarina** (1.4 g, resa 48%), con p.f. >300°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

11.44 (s all., 1 H, -OH)

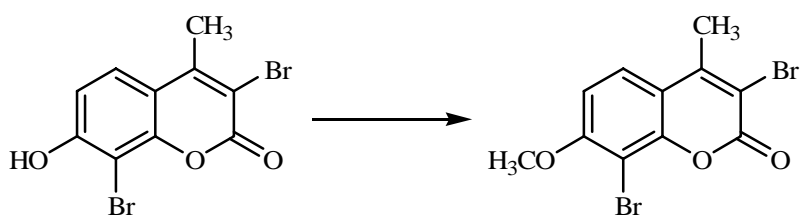
7.64 (d, J=9.0, 1 H, 5-H)

6.95 (d, J=9.0, 1 H, 6-H)

2.51 (s, 3 H, 4-Me)



### Sintesi della 3,8-dibromo-7-metossi-4-metilcumarina



Una miscela di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.20 g, 1.4 mmoli) e 3,8-dibromo-7-idrossi-4-metilcumarina (0.40 g, 1.2 mmoli) in acetone (120 ml) è stata addizionata di CH<sub>3</sub>I (0.22 ml, 3.6 mmoli) e lasciata a temperatura ambiente per una notte. La miscela di reazione è stata filtrata e la soluzione organica è stata concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato cristallizzato da EtOH, ottenendo la **4-metil-7-metossicumarina** (0.42 g, resa quantitativa) con p.f. 236°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

7.89 (d, J=9.1, 1 H, 5-H)

7.20 (d, J=9.1, 1 H, 6-H)

3.98 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>)

2.59 (s, 3 H, 4-Me)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

159.00, 156.23, 151.99, 149.75, 126.62, 114.59, 109.66, 109.44, 98.44, 57.49, 19.90.

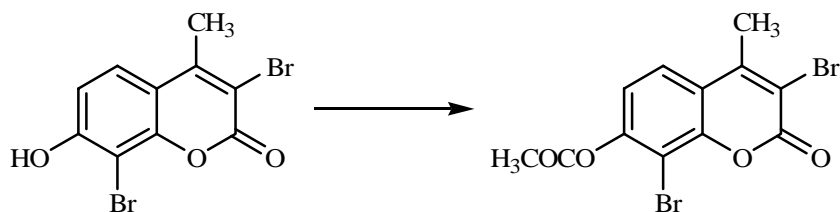
#### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 37.97%, H 2.32%, Br 45.92%

Trovato: C 38.93%, H 2.18%, Br 46.02%

## Sintesi di 3,8-dibromo-7-acetossi-4-metilcumarina

### Sintesi della 7-acetossi-3,8-dibromo-4-metilcumarina



Una soluzione di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-metilcumarina (0.20 g, 0.60 mmoli) in Ac<sub>2</sub>O (13 ml) è stata addizionata di acetato sodico fuso (0.05 g, 0.60 mmoli) e posta a riflusso per 1 ora (TLC: CE/EtOAc, 50/50). La miscela di reazione è stata ripresa a caldo cautamente con acqua (150 ml) per idrolizzare l'anidride acetica ed il precipitato formatosi è stato separato per filtrazione e cristallizzato da MeOH, ottenendo la **7-acetossi-3,8-dibromo-4-metilcumarina** (0.13 g, resa 58%) con p.f. 253°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

7.92 (d, J=8.9, 1 H, 5-H)

7.39 (d, J=8.9, 1 H, 6-H)

2.62 (s, 3 H, -OCOCH<sub>3</sub>)

2.39 (s, 3 H, 4-Me)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

167.90, 155.39, 150.97, 150.67, 149.09, 125.82, 119.97, 118.57, 112.29, 104.42, 20.46, 19.59.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M<sup>+</sup> +1)

(M<sup>+</sup>) +1                      374.8862 (calcolato)                      374.8802 (trovato)

(M<sup>+</sup>+2) +1                      376.8733 (calcolato)                      376.8703 (trovato)

(M<sup>+</sup>+4) +1                      378.8824 (calcolato)                      378.8843 (trovato)

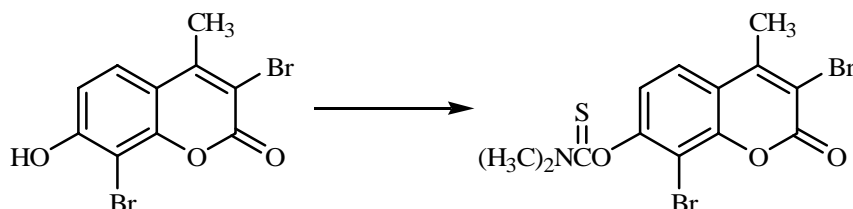
### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 38.33%, H 2.14%, Br 42.50%

Trovato: C 38.28%, H 2.13%, Br 42.61%

## Sintesi di 3,8-dibromo-4-metil-7-tiolcumarina

### Sintesi della 3,8-dibromo-4-metil-7-[(*N,N*-dimetil)tiocarbamoilossi]-cumarina



Una miscela di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.20 g, 1.4 mmoli) e 3,8-dibromo-7-idrossi-4-metilcumarina (0.20 g, 0.60 mmoli) in acetone (50 ml) è stata addizionata di dimetilcarbamoil cloruro (0.11 g, 0.90 mmoli) e posta a riflusso per 2 ore (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata filtrata e la soluzione organica è stata concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato cristallizzato da EtOH, ottenendo la **3,8-dibromo-4-metil-7-[(*N,N*-dimetil)tiocarbamoilossi]-cumarina** (0.47 g, resa 80%) con p.f. 232°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

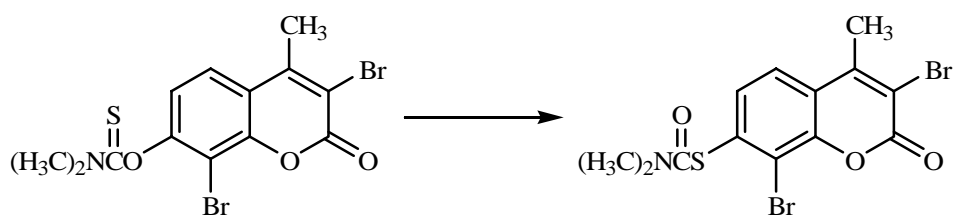
7.95 (d, J=8.8, 1 H, 5-H)

7.31 (d, J=8.8, 1 H, 6-H)

3.40 (s, 6 H, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

2.64 (s, 3 H, 4-Me)

Sintesi della 3,8-dibromo-4-metil-7-[(N,N-dimetil)carbamoilmercapto]-cumarina



La 3,8-dibromo-4-metil-7-[(N,N-dimetil)tiocarbamoilossi]-cumarina (0.60 g, 1.44 mmoli) è stata posta a fusione (232°C) per 10 minuti ottenendo la **3,8-dibromo-4-metil-7-[(N,N-dimetil)carbamoilmercapto]-cumarina** (0.60 g, resa quantitativa).

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

7.89 (d, J=8.5, 1 H, 5-H)

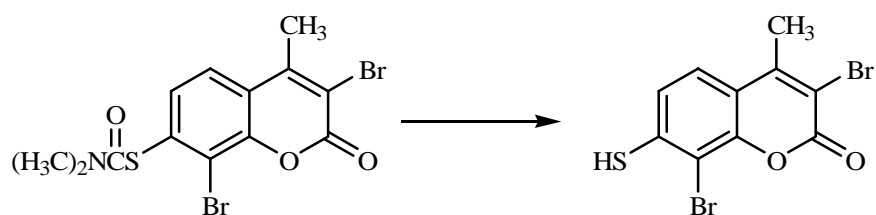
7.63 (d, J=8.5, 1 H, 6-H)

3.10 (s all., 3 H, -CH<sub>3</sub>)

2.95 (s all., 3 H, -CH<sub>3</sub>)

2.39 (s, 3 H, 4-Me)

### Sintesi della 3,8-dibromo-4-metil-7-tiolcumarina



Una soluzione di 3,8-dibromo-4-metil-7-[(*N,N*-dimetil)carbamoilmercapto]-cumarina (0.4 g, 0.90 mmoli) in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato (15 ml) ed AcOH glaciale (70 ml). La soluzione è stata posta a riflusso per 1 ora (TLC: Toluene/Etile formiato/Acido formico, 50/40/10). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata versata in acqua e ghiaccio (200 ml) ottenendo un abbondante precipitato che è stato recuperato per filtrazione, ottenendo la **3,8-dibromo-4-metil-7-tiolcumarina** (0.25 g, resa 79%) con p.f. 240°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

7.78 (d, J=8.4, 1 H, 5-H)

7.60 (d, J=8.4, 1 H, 6-H)

2.57 (s, 3 H, 4-CH<sub>3</sub>)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

155.39, 151.36, 148.57, 142.11, 124.91, 124.79, 117.08, 110.86, 107.60, 19.40.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>Br<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> (M<sup>-</sup>-1)

(M<sup>-</sup>)-1                                      346.8382 (calcolato)                                      346.8342 (trovato)

(M<sup>+2</sup>)-1                                      348.8362 (calcolato)                                      348.8364 (trovato)

(M<sup>+4</sup>)-1                                      350.8341 (calcolato)                                      350.8303 (trovato)

### **ANALISI ELEMENTARE**

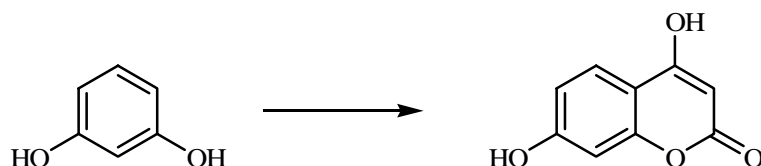
Teorico: C 34.31%, H 1.73%, Br 45.66%, S 9.16%

Trovato: C 34.28%, H 1.75%, Br 45.61%, S 9.18%

### 6.3.3.3 SINTESI DI BROMO-7-IDROSSICUMARINE SOSTITUITE IN POSIZIONE 4

#### Sintesi di bromoderivati della 4,7-diidrossicumarina

##### Sintesi di 4,7-diidrossicumarina



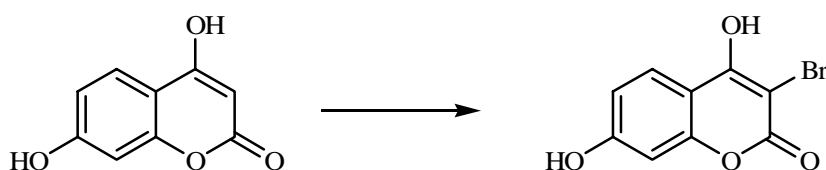
Una miscela di resorcina (20.0 g, 181.6 mmoli), acido malonico (19.8 g, 190.0 mmoli) e  $\text{ZnCl}_2$  (60 g, 440.3 mmoli) è stata aggiunta di  $\text{POCl}_3$  (40.64 ml, 436.0 mmoli) e termostata a  $75^\circ\text{C}$  per 3 ore (TLC:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 90/10). La miscela di reazione, dopo raffreddamento, è stata ripresa con 300 ml di una soluzione acquosa al 10 % di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e versata lentamente in acqua con formazione di un precipitato che è stato raccolto per filtrazione e solubilizzato nella minima quantità a caldo di MeOH e fatto precipitare in forma cristallina per lenta aggiunta di acqua, ottenendo la **4,7-diidrossicumarina** (6.0 g, resa 18%), con p.f.  $262^\circ\text{C}$ .

##### $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{DMSO-}d_6$ )

- 12.24 (s all., 1 H, 4-OH o 7-OH)
- 10.53 (s all., 1 H, 4-OH o 7-OH)
- 7.63 (d,  $J=8.6$ , 1 H, 5-H)
- 6.76 (dd,  $J=8.6$ ,  $J=2.2$ , 1 H, 6-H)
- 6.66 (d,  $J=2.2$ , 1 H, 8-H)
- 5.38 (s, 1 H, 3-H)



### Sintesi di 3-bromo-4,7-diidrossicumarina



La 4,7-diidrossicumarina (1.0 g, 5.6 mmoli) è stata solubilizzata in 50 ml di AcOH glaciale ed alla soluzione è stata aggiunta, a piccole porzioni, alla temperatura di 60°C, una soluzione contenente bromo (0.14 ml, 2.8 mmoli) in AcOH glaciale. La miscela di reazione è stata termostata per 3 ore a 60°C (TLC: CE/EtOAc, 50/50). Per raffreddamento si è formato un precipitato che è stato raccolto per filtrazione e lavato abbondantemente con acqua, ottenendo la **3-bromo-4,7-diidrossicumarina** (0.57 g, resa 43%), con p.f. 235°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

7.79 (d, J=8.8, 1 H, 5-H)

6.81 (dd, J=8.8, J=2.2, 1 H, 6-H)

6.71 (d, J=2.2, 1 H, 8-H)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

162.71, 161.77, 158.86, 153.50, 124.84, 113.02, 107.69, 101.92, 85.55.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>9</sub>H<sub>4</sub>BrO<sub>4</sub> (M<sup>-</sup> -1)

(M<sup>-</sup>) -1                      254.9444 (calcolato)                      254.9477 (trovato)

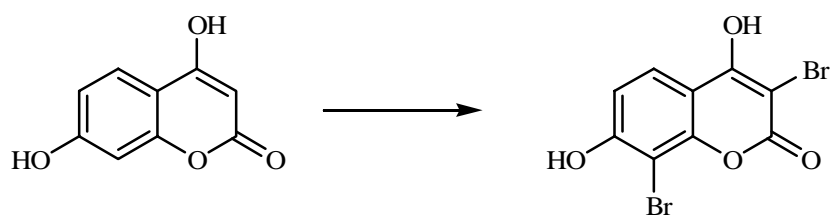
(M<sup>-</sup> +2) -1                      256.9424 (calcolato)                      256.9486 (trovato)

#### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 42.05%, H 1.96%, Br 31.09%

Trovato: C 42.01%, H 1.94%, Br 31.15%

## Sintesi di 3,8-dibromo-4,7-diidrossicumarina



La 4,7-diidrossicumarina (0.80 g, 4.5 mmoli) è stata solubilizzata in 40 ml di AcOH glaciale ed alla soluzione è stata aggiunta, a piccole porzioni, alla temperatura di 60°C, una soluzione contenente bromo (0.35 ml, 6.74 mmoli) in AcOH glaciale. La miscela di reazione è stata termostata per 2 ore a 50°C (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Per raffreddamento si è formato un precipitato che è stato dapprima raccolto per filtrazione e lavato abbondantemente con acqua e successivamente cristallizzato da DCE, ottenendo la **3,8-dibromo-4,7-diidrossicumarina** (0.25 g, resa 40%), con p.f. 240°C.

### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

11.45 (s all., 2 H, 4-OH e 7-OH)

7.78 (d, J=7.8, 1 H, 5-H)

6.97 (d, J=7.8, 1 H, 6-H)

### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

1162.55, 158.65, 158.33, 150.36, 123.37, 112.48, 108.96, 96.55, 85.88.

### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>9</sub>H<sub>3</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M<sup>-</sup>-1)

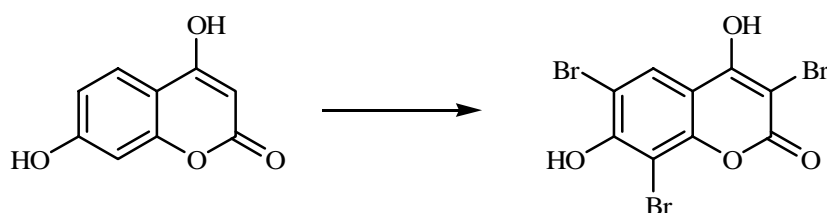
(M <sup>-</sup> ) -1	332.8404 (calcolato)	332.8447 (trovato)
(M <sup>+2</sup> ) -1	334.8384 (calcolato)	334.8405 (trovato)
(M <sup>+4</sup> ) -1	336.8364 (calcolato)	336.8432 (trovato)

### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 32.18%, H 1.20%, Br 47.57%

Trovato: C 32.43%, H 0.95%, Br 47.69%

### Sintesi di 3,6,8-tribromo-4,7-diidrossicumarina



La 4,7-diidrossicumarina (2.0 g, 11.2 mmoli) è stata solubilizzata in 60 ml di AcOH glaciale ed alla soluzione è stata aggiunta, a piccole porzioni, alla temperatura di 60°C, una soluzione contenente bromo (2.3 ml, 44.91 mmoli) in AcOH glaciale. La miscela di reazione è stata termostata per 3 ore a 60°C (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Nella miscela di reazione si ha la formazione di un precipitato che è stato dapprima raccolto per filtrazione e lavato abbondantemente con acqua e successivamente cristallizzato da MeOH, ottenendo la **3,6,8-tribromo-4,7-diidrossicumarina** (2.2 g, resa 47%), con p.f. 257°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

10.70 (s all., 2 H, 4-OH e 7-OH)

8.08 (s, 1 H, 5-H)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

161.82, 158.10, 154.47, 149.39, 125.75, 110.91, 106.97, 99.31, 86.72.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>9</sub>H<sub>2</sub>Br<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M<sup>-</sup> -1)

(M <sup>-</sup> ) -1	410.7509 (calcolato)	410.7547 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2) -1	412.7489 (calcolato)	412.7468 (trovato)
(M <sup>-</sup> +4) -1	414.7469 (calcolato)	414.7462 (trovato)
(M <sup>-</sup> +6) -1	416.7450 (calcolato)	416.7462 (trovato)

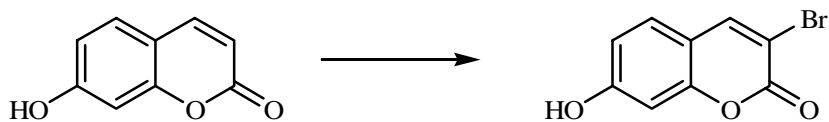
#### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 26.06%, H 0.73%, Br 57.79%

Trovato: C 25.99%, H 0.74%, Br 57.73%

## Sintesi di bromoderivati della 7-idrossicumarina

### Sintesi di 3-bromo-7-idrossicumarina



Ad una soluzione di 7-idrossicumarina (4.0 g, 24.7 mmoli) in AcOH glaciale (150 ml) termostata a 60°C è stata aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di Br<sub>2</sub> (1.3 ml, 24.7 mmoli) diluito in AcOH (30 ml) fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CE/EtOAc, 50/50). Il precipitato formatosi dopo raffreddamento è stato raccolto per filtrazione e cristallizzato da MeOH, ottenendo la **3-bromo-7-idrossi-cumarina** (2.4 g, resa 40%), con p.f. 247°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

- 10.76 (s all., 1 H, -OH)  
8.49 (s, 1 H, 4-H)  
7.52 (d, J=8.5, 1 H, 5-H)  
6.82 (dd, J=8.5, J=2.1, 1 H, 6-H)  
6.74 (d, J=2.1, 1 H, 8-H)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

161.66, 156.84, 154.67, 145.50, 129.21, 113.66, 111.82, 105.12, 102.01.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>9</sub>H<sub>4</sub>BrO<sub>3</sub> (M<sup>-</sup> -1)

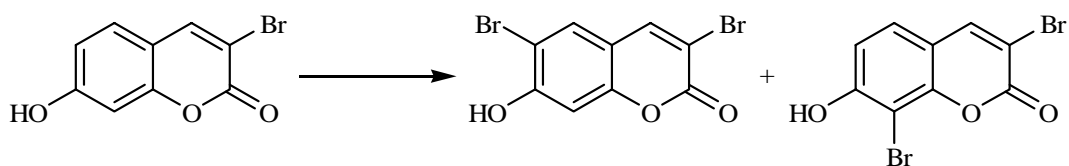
(M <sup>-</sup> ) -1	238.9349 (calcolato)	238.9339 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2) -1	240.9330 (calcolato)	240.9334 (trovato)

#### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 44.85%, H 2.09%, Br 33.15%

Trovato: C 44.82%, H 2.10%, Br 33.13%

### Sintesi di 3,6-dibromo-7-idrossicumarina e di 3,8-dibromo-7-idrossicumarina



Ad una soluzione di 3-bromo-7-idrossicumarina (1.2 g, 5.0 mmoli) in CH<sub>3</sub>CN (150 ml) termostata a 60°C è stata aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.52 ml, 10.1 mmoli) diluito in CH<sub>3</sub>CN (50 ml) fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CE/EtOAc, 50/50). La miscela di reazione è stata concentrata a secchezza ed il solido ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna con eluente CE/EtOAc 80/20, eluendo dapprima la **3,6-dibromo-7-idrossicumarina** che è stata ulteriormente purificata riprendendo il residuo solido con la minima quantità a caldo di EtOAc e fatto precipitare in forma cristallina per lenta aggiunta a caldo di CE (0.28 g, resa 18%), con p.f. 217°C. Successivamente è stata eluita la **3,8-dibromo-7-idrossicumarina** (0.24 g, resa 15%) la quale è stata ulteriormente purificata per cristallizzazione da MeOH, con p.f. 219°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) di 3,6-dibromo-7-idrossicumarina

11.62 (s all., 1 H, -OH)

8.44 (s, 1 H, 4-H)

7.91 (s, 1 H, 5-H)

6.89 (s, 1 H, 8-H)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) di 3,6-dibromo-7-idrossicumarina

157.71, 156.72, 153.65, 144.47, 131.44, 113.23, 106.74, 102.91.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>9</sub>H<sub>3</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (M<sup>-</sup>-1) di 3,6-dibromo-7-idrossicumarina

(M <sup>-</sup> ) -1	316.8454 (calcolato)	316.8446 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2) -1	318.8434 (calcolato)	318.8438 (trovato)
(M <sup>-</sup> +4) -1	320.8415 (calcolato)	320.8413 (trovato)

**ANALISI ELEMENTARE** di 3,6-dibromo-7-idrossicumarina

Teorico: C 33.79%, H 1.26%, Br 49.95%

Trovato: C 33.82%, H 1.24%, Br 49.96%

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>) di 3,8-dibromo-7-idrossicumarina

11.53 (s all., 1 H, 7-OH)

8.51 (s, 1 H, 4-H)

7.52 (d, J=8.6, 1 H, 5-H)

6.98 (d, J=8.6, 1-H, 6-H)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>) di 3,8-dibromo-7-idrossicumarina

158.66, 156.73, 151.68, 145.52, 127.99, 113.40, 113.03, 106.23, 96.73.

**HRMS** (ESI-TOF) per C<sub>9</sub>H<sub>3</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (M<sup>-</sup> -1) di 3,8-dibromo-7-idrossicumarina

(M <sup>-</sup> -1)	316.8454 (calcolato)	316.8458 (trovato)
---------------------	----------------------	--------------------

(M <sup>-</sup> +2) -1	318.8434 (calcolato)	318.8431 (trovato)
------------------------	----------------------	--------------------

(M <sup>-</sup> +4) -1	320.8415 (calcolato)	320.8404 (trovato)
------------------------	----------------------	--------------------

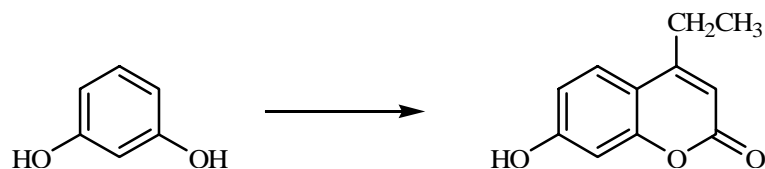
**ANALISI ELEMENTARE** di 3,8-dibromo-7-idrossicumarina

Teorico: C 33.79%, H 1.26%, Br 49.95%

Trovato: C 33.80%, H 1.28%, Br 49.93%

## Sintesi di bromoderivati della 4-etil-7-idrossicumarina

### Sintesi di 4-etil-7-idrossicumarina

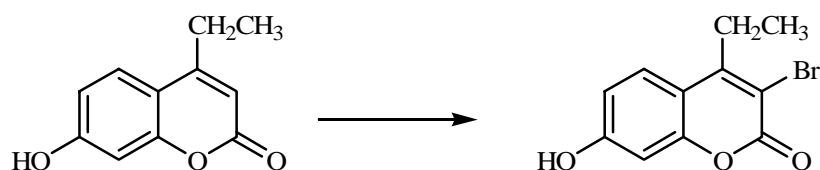


Ad una miscela di resorcinolo (1.5 g, 14.0 mmoli) ed etile propionilacetato (2.0 ml, 14.0 mmoli) è stato aggiunto, goccia a goccia, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato e la miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 1 ora fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata versata in acqua (150 ml) con formazione di un precipitato che è stato filtrato e lavato con acqua, ottenendo la **4-etil-7-idrossicumarina** (2.4 g, resa 90%), con p.f. 175°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

- 10.51 (s all., 1 H, -OH)
- 7.63 (d, J=8.7, 1 H, 5-H)
- 6.80 (dd, J=8.7, J=2.4, 1 H, 6-H)
- 6.71 (d, J=2.4, 1 H, 8-H)
- 6.08 (s, 1 H, 3-H)
- 2.37 (q, J=7.4, 2 H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)
- 1.21 (t, J=7.4, 3 H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

### Sintesi di 3-bromo-4-etil-7-idrossicumarina



Una soluzione di 4-etil-7-idrossicumarina (0.50 g, 2.6 mmoli) in AcOH glaciale (20 ml) è stata aggiunta, goccia a goccia, di una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.13 ml, 2.6 mmoli) diluito in AcOH (15 ml) e termostata a 60°C per 2 ore fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 95/5). La miscela di reazione è stata versata in 100 ml di acqua, neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub> e poi estratta con EtOAc. La fase organica è stata quindi anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato cristallizzato da EtOH, ottenendo la **3-bromo-4-etil-7-idrossicumarina** (0.41 g, resa 58%), con p.f. 174°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

- 11.69 (s all., 1 H, -OH)  
7.73 (d, J=8.9, 1 H, 5-H)  
6.85 (dd, J=8.9, J=2.4, 1 H, 6-H)  
6.76 (d, J=2.4, 1 H, 8-H)  
2.96 (q, J=7.6, 2 H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
1.16 (t, J=7.6, 3 H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

161.59, 157.12, 153.83, 127.25, 114.06, 110.82, 106.71, 102.54, 26.00, 12.46.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>BrO<sub>3</sub> (M<sup>-</sup> -1)

(M <sup>-</sup> ) -1	266.9662 (calcolato)	266.9709 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2) -1	268.9643 (calcolato)	268.9687 (trovato)

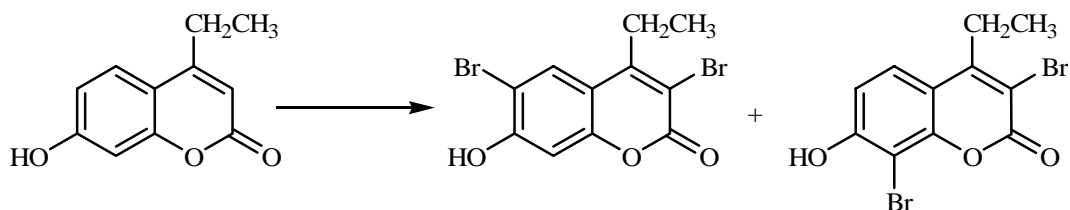


### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 49.10%, H 3.37%, Br 29.69%

Trovato: C 49.08%, H 3.36%, Br 29.66%

Sintesi di 3,6-dibromo-4-etil-7-idrossicumarina e di 3,8-dibromo-4-etil-7-idrossicumarina



Ad una soluzione di 4-etil-7-idrossicumarina (0.40 g, 2.1 mmoli) in AcOH glaciale (20 ml), termostata a 60°C, è stata aggiunta una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.22 ml, 4.2 mmoli) diluito in AcOH (2 ml) fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CE/EtOAc, 80/20). La miscela di reazione, versata in acqua e neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub>, è stata estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrata a secchezza. Il solido ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna con eluente CE/EtOAc, 95/5, eluendo dapprima la **3,6-dibromo-4-etil-7-idrossicumarina** (0.13 g, resa 18%), con p.f. 184°C, e successivamente la **3,8-dibromo-4-etil-7-idrossicumarina** (80 mg, resa 11%), con p.f. 166°C. I prodotti eluiti sono stati purificati mediante cristallizzazione da MeOH.

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>) di 3,6-dibromo-4-etil-7-idrossicumarina

- 11.58 (s all., 1 H, -OH)
- 8.04 (s, 1 H, 5-H)
- 6.92 (s, 1 H, 8-H)
- 2.98 (q, J=7.5, 2 H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)
- 1.15 (t, J=7.5, 3 H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) di 3,6-dibromo-4-etil-7-idrossicumarina

- 159.25, 154.89, 156.01, 154.36, 124.32, 115.18, 110.21, 106.34, 98.81, 26.40, 12.35.

**ANALISI ELEMENTARE** di 3,6-dibromo-4-etil-7-idrossicumarina

Teorico: C 37.97 %, H 2.32 %, Br 45.92 %

Trovato: C 37.98 %, H 2.30 %, Br 45.89 %

**HRMS** (ESI-TOF) per  $C_{11}H_7Br_2O_3$  ( $M^- -1$ ) di 3,6-dibromo-4-etil-7-idrossicumarina

( $M^- -1$ )	344.8767 (calcolato)	344.8900 (trovato)
( $M^- +2$ ) $-1$	346.8747 (calcolato)	346.8822 (trovato)
( $M^- +4$ ) $-1$	348.8728 (calcolato)	348.8796 (trovato)

**$^1H$ -NMR** (DMSO- $d_6$ ) di 3,8-dibromo-4-etil-7-idrossicumarina

11.50 (s all., 1 H, -OH)

7.77 (d, J=8.9; 1 H, 5-H)

7.02 (d, J=8.9, 1 H, 6-H)

2.98 (q, J=7.5, 2 H,  $-CH_2CH_3$ )

1.16 (t, J=7.5, 3 H,  $-CH_2CH_3$ )

**$^{13}C$ -NMR** (DMSO- $d_6$ ) di 3,8-dibromo-4-etil-7-idrossicumarina

161.60, 158.51, 156.92, 150.45, 125.84, 113.42, 112.06, 102.57, 97.27, 26.12, 12.54.

**HRMS** (ESI-TOF) per  $C_{11}H_7Br_2O_3$  ( $M^- -1$ ) di 3,8-dibromo-4-etil-7-idrossicumarina

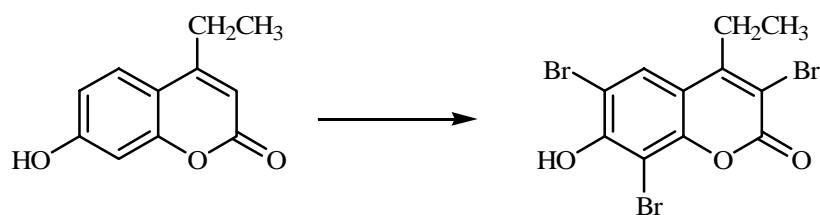
( $M^- -1$ )	344.8767 (calcolato)	344.8780 (trovato)
( $M^- +2$ ) $-1$	346.8747 (calcolato)	346.8717 (trovato)
( $M^- +4$ ) $-1$	348.8728 (calcolato)	348.8814 (trovato)

**ANALISI ELEMENTARE** di 3,8-dibromo-4-etil-7-idrossicumarina

Teorico: C 37.97%, H 2.32%, Br 45.92%

Trovato: C 37.95%, H 2.33%, Br 45.90%

### Sintesi di 3,6,8-tribromo-4-etil-7-idrossicumarina



Una soluzione di 4-etil-7-idrossicumarina (0.20 g, 1.1 mmoli) in AcOH glaciale (15 ml); è stata addizionata di una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.16 ml, 3.2 mmoli) diluito in AcOH (2 ml) e termostatata a 60°C per 1 ora fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 95/5). La miscela di reazione è stata versata in acqua (50 ml) con formazione di un precipitato che è stato filtrato, lavato con acqua e cristallizzato da DCE, ottenendo il **3,6,8-tribromo-4-etil-7-idrossicumarina** (0.42 g, resa 89%), con p.f. 235°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

8.10 (s, 1 H, 5-H)

3.00 (q, J=7.5, 2 H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

1.14 (t, J=7.5, 3 H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

155.77, 155.38, 154.21, 149.41, 127.68, 113.08, 108.94, 107.93, 99.59, 25.70, 12.06.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>Br<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (M<sup>-</sup> -1)

(M <sup>-</sup> -1)	422.7873 (calcolato)	422.7969 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2) -1	424.7852 (calcolato)	424.7937 (trovato)
(M <sup>-</sup> +4) -1	426.7833 (calcolato)	426.7915 (trovato)
(M <sup>-</sup> +6) -1	428.7814 (calcolato)	428.7931 (trovato)

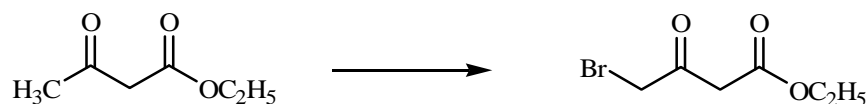
### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 30.95%, H 1.65%, Br 56.15%

Trovato: C 30.95%, H 1.63%, Br 56.17%

## Sintesi di bromoderivati della 4-bromometil-7-idrossicumarina

### Sintesi di 4-bromoacetoacetato di etile

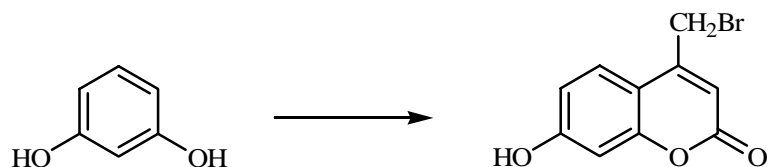


Ad una soluzione di etile acetoacetato (13.0 g, 100.0 mmoli) in CHCl<sub>3</sub> (90 ml) è stata aggiunta a temperatura ambiente, goccia a goccia, una soluzione di Br<sub>2</sub> (5.1 ml, 100.0 mmoli) in 30 ml di CHCl<sub>3</sub> (TLC: CE). La miscela di reazione è stata insufflata per 20 minuti con N<sub>2</sub>, versata in 100 ml di acqua e quindi estratta con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrata evaporando il solvente organico, ottenendo il **4-bromoacetoacetato di etile** (20.0 g, resa 96%).

#### <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

- 4.23 (q, 2 H, J=7.2, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)
- 3.44 (s, 2 H alifatici)
- 2.25 (s, 2 H alifatici)
- 1.14 (t, J=7.2, 3 H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

### Sintesi di 4-bromometil-7-idrossicumarina

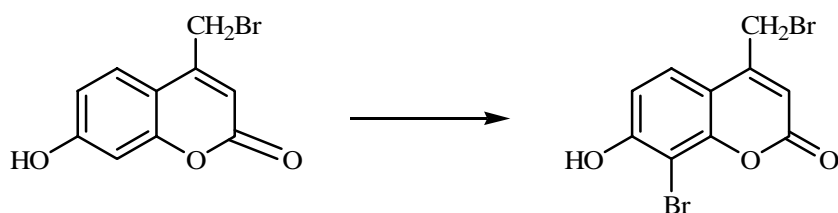


Ad una sospensione di resorcinolo (5.0 g, 45.4 mmoli) in 4-bromoacetoacetato di etile (10.5 g, 50.2 mmoli) è stato aggiunto H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato (20 ml) e la miscela di reazione è stata mantenuta a temperatura ambiente per 1 ora fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 95/05). La miscela di reazione è stata versata in acqua e ghiaccio (200 ml) ed il precipitato formatosi è stato recuperato mediante filtrazione e lavato con acqua. Il residuo solido è stato solubilizzato nella minima quantità a caldo di MeOH e fatto precipitare in forma cristallina per lenta aggiunta di acqua, ottenendo la **4-bromometil-7-idrossicumarina** (5.2 g, resa 45%), con p.f. 191°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

- 10.69 (s all., 1 H, -OH)
- 7.70 (d, J=8.8, 1 H, 5-H)
- 6.84 (dd, J=8.8, J=2.3, 1 H, 6-H)
- 6.74 (d, J=2.3, 1 H, 8-H)
- 6.45 (s, 1 H, 3-H)
- 4.79 (s, 2 H, -CH<sub>2</sub>Br)

## Sintesi di 8-bromo-4-bromometil-7-idrossicumarina



### METODO A

Ad una soluzione di 4-bromometil-7-idrossicumarina (0.50 g, 2.0 mmoli) in AcOH glaciale (30 ml) termostata a 60°C è stata aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.10 ml, 2.0 mmoli) diluito in AcOH (10 ml). Dopo 30 minuti (TLC: CE/EtOAc, 50/50) la miscela di reazione è stata fatta raffreddare fino a temperatura ambiente, versata in 100 ml di acqua e, dopo neutralizzazione con NaHCO<sub>3</sub>, estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata quindi anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a secchezza, ottenendo una miscela di prodotti complessa che è stata abbandonata.

### METODO B

Ad una soluzione di 4-bromometil-7-idrossicumarina (0.50 g, 2.0 mmoli) in AcOH glaciale (30 ml) è stata aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.10 ml, 2.0 mmoli) diluito in AcOH (10 ml) a temperatura ambiente fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CE/EtOAc, 50/50). La miscela di reazione è stata versata in acqua, neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub>, ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata e concentrata a secchezza. Da analisi <sup>1</sup>H-NMR il solido ottenuto è risultato una miscela complessa di prodotti che non sono stati identificati e separati.



## METODO C

Ad una soluzione di 4-bromometil-7-idrossicumarina (0.50 g, 2.0 mmoli) in CH<sub>3</sub>CN (50 ml) è stata aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.10 ml, 2.0 mmoli) diluito in CH<sub>3</sub>CN (20 ml) e la miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione ad una temperatura compresa tra 0°C e 5°C per 5 ore (TLC: CE/EtOAc, 50/50). La soluzione è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido è stato cristallizzato da DCE, ottenendo la **8-bromo-4-bromometil-7-idrossicumarina** (0.16 g, resa 24%), con p.f. 249°C.

### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

7.72 (d, J=8.8, 1 H, 5-H)

7.02 (d, J=8.8, 1 H, 6-H)

6.55 (s, 1 H, 3-H)

4.82 (s, 2 H, -CH<sub>2</sub>Br)

### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

159.44, 158.34, 152.04, 151.44, 125.17, 112.44, 111.86, 110.85, 97.14, 58.98.

### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (M<sup>-</sup> -1)

(M <sup>-</sup> ) -1	330.8611 (calcolato)	330.8680 (trovato)
----------------------	----------------------	--------------------

(M <sup>-</sup> +2) -1	332.8591 (calcolato)	332.8595 (trovato)
------------------------	----------------------	--------------------

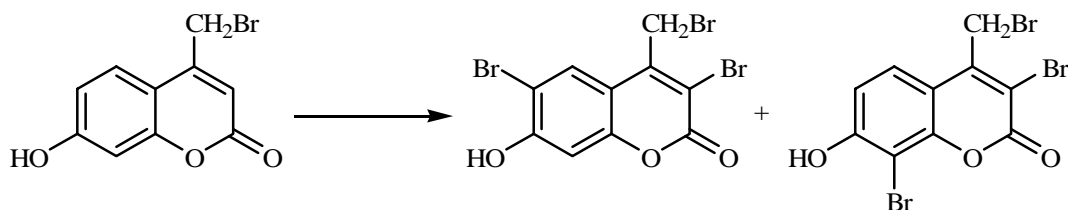
(M <sup>-</sup> +4) -1	334.8572 (calcolato)	334.8589 (trovato)
------------------------	----------------------	--------------------

### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 35.96%, H 1.81%, Br 47.85%

Trovato: C 35.94%, H 1.82%, Br 47.81%

Sintesi di 3,6-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina e di 3,8-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina



Ad una soluzione di 4-bromometil-7-idrossicumarina (0.50 g, 2.0 mmoli) in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (50 ml) è stata aggiunta a temperatura ambiente, goccia a goccia, una soluzione di  $\text{Br}_2$  (0.25 ml, 4.9 mmoli) diluito in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (210 ml) (TLC: CE/EtOAc, 50/50). La miscela di reazione è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido è stato purificato mediante cromatografia su colonna con eluente  $\text{CHCl}_3$ , eluendo dapprima la **3,6-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina** che è stata ulteriormente purificata per cristallizzazione a caldo da DCE (0.13 g, resa 17%), con p.f.  $213^\circ\text{C}$ , e successivamente la **3,8-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina**, che è stata ulteriormente purificata mediante cristallizzazione da MeOH (0.30 g, resa 25%), con p.f.  $217^\circ\text{C}$ .

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ) di 3,6-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina

8.10 (s, 1 H, 5-H)

6.63 (s, 1 H, 8-H)

4.90 (s, 2 H,  $-\text{CH}_2\text{Br}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ) di 3,6-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina

156.24, 155.18, 149.85, 146.34, 124.81, 113.60, 111.01, 109.67, 96.84, 60.93.

**HRMS** (ESI-TOF) per  $C_{10}H_4Br_3O_3$  ( $M^- -1$ ) di 3,6-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina

( $M^- -1$ )	408.7716 (calcolato)	408.7741 (trovato)
( $M^- +2$ ) $-1$	410.7696 (calcolato)	410.7689 (trovato)
( $M^- +4$ ) $-1$	412.7676 (calcolato)	412.7697 (trovato)
( $M^- +6$ ) $-1$	414.7657 (calcolato)	414.7694 (trovato)

**ANALISI ELEMENTARE** 3,6-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina

Teorico: C 29.09%, H 1.22%, Br 58.06%

Trovato: C 29.12%, H 1.23%, Br 58.08%

**$^1H$ -NMR** (DMSO- $d_6$ ) di 3,8-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina

11.62 (s all., 1 H, -OH)

7.82 (d, J=8.9, 1 H, 5-H)

7.05 (d, J=8.9, 1 H, 6-H)

4.89 (s, 2 H, -CH<sub>2</sub>Br)

**$^{13}C$ -NMR** (DMSO- $d_6$ ) di 3,8-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina

156.78, 155.39, 150.64, 149.47, 125.59, 113.30, 110.56, 109.70, 97.27, 60.74.

**HRMS** (ESI-TOF) per  $C_{10}H_4Br_3O_3$  ( $M^- -1$ ) di 3,8-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina

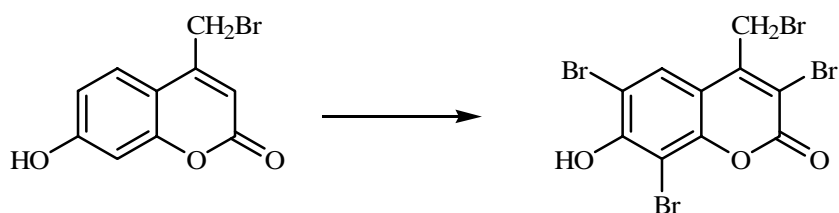
( $M^- -1$ )	408.7716 (calcolato)	408.7870 (trovato)
( $M^- +2$ ) $-1$	410.7696 (calcolato)	410.7831 (trovato)
( $M^- +4$ ) $-1$	412.7676 (calcolato)	412.7851 (trovato)
( $M^- +6$ ) $-1$	414.7657 (calcolato)	414.7852 (trovato)

**ANALISI ELEMENTARE** di 3,8-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina

Teorico: C 29.09%, H 1.22%, Br 58.06%

Trovato: C 29.07%, H 1.20%, Br 58.05%

### Sintesi di 3,6,8-tribromo-4-bromometil-7-idrossicumarina



Ad una soluzione di 4-bromometil-7-idrossicumarina (0.50 g, 1.96 mmoli) in AcOH glaciale (30 ml), termostata a 50°C, è stata aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.3 ml, 6.0 mmoli) in AcOH (35 ml) (TLC: CE/EtOAc, 50/50). Al termine dell'aggiunta la miscela di reazione è stata fatta raffreddare, quindi versata in 100 ml di acqua, ottenendo un precipitato che è stato separato per filtrazione e lavato abbondantemente con acqua. Il solido ottenuto è stato cristallizzato da MeOH, ottenendo la **3,6,8-tribromo-4-bromometil-7-idrossicumarina** (0.87 g, resa 89%), con p.f. 230°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

8.21 (s, 1 H, 5-H)

4.95 (s, 2 H, -CH<sub>2</sub>Br)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

156.96, 154.60, 151.27, 149.98, 129.31, 113.63, 110.06, 107.97, 99.42, 61.07.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>3</sub>Br<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (M<sup>-</sup> -1)

(M <sup>-</sup> ) -1	486.6821 (calcolato)	486.7071 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2) -1	488.6801 (calcolato)	488.7024 (trovato)
(M <sup>-</sup> +4) -1	490.6781 (calcolato)	490.6970 (trovato)
(M <sup>-</sup> +6) -1	492.6761 (calcolato)	492.6952 (trovato)
(M <sup>-</sup> +8) -1	494.6743 (calcolato)	494.6939 (trovato)

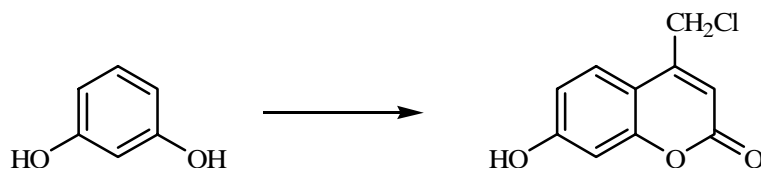
### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 24.42%, H 0.82%, Br 65.00%

Trovato: C 24.40%, H 0.85%, Br 65.03%

## Sintesi di bromoderivati della 4-clorometil-7-idrossicumarina

### Sintesi di 4-clorometil-7-idrossicumarina

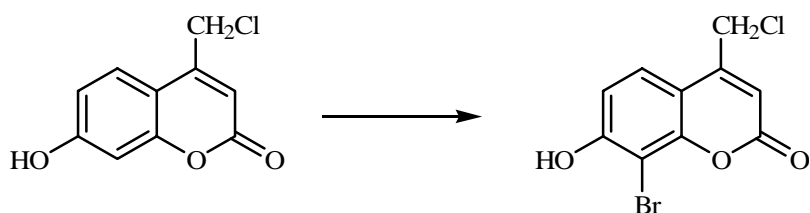


Ad una sospensione di resorcinolo (5.0 g, 45.4 mmoli) in 4-cloroacetoacetato di etile (6.1 ml, 45.4 mmoli) è stato aggiunto H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato (7 ml) e la soluzione ottenuta è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 1 ora fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata versata a filo in acqua e ghiaccio (400 ml) ottenendo un precipitato che è stato separato per filtrazione e lavato con acqua. Il residuo solido è stato cristallizzato da MeOH, ottenendo la **4-clorometil-7-idrossicumarina** (4.6 g, resa 48%), con p.f. 181°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>)

- 9.49 (s all., 1 H, -OH)
- 7.73 (d, J=8.8, 1 H, 5-H)
- 6.91 (dd, J=8.8, J=2.4, 1 H, 6-H)
- 6.79 (d, J=2.4, 1 H, 8-H)
- 6.40 (t, J=0.8, 1 H, 3-H)
- 4.92 (d, J=0.8, 2 H, -CH<sub>2</sub>Cl)

## Sintesi di 8-bromo-4-clorometil-7-idrossicumarina



### METODO A

Ad una soluzione di 4-clorometil-7-idrossicumarina (0.30 g, 1.4 mmoli) in AcOH glaciale (30 ml) termostata a 40°C è stata aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.07 ml, 1.4 mmoli) diluita in AcOH (30 ml) fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata versata in acqua (100 ml), neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub> ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata quindi anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrata a secchezza, ottenendo una miscela complessa di prodotti che non sono stati identificati e separati.

### METODO B

Ad una soluzione di 4-clorometil-7-idrossicumarina (0.30 g, 1.4 mmoli) in CH<sub>3</sub>CN (40 ml) è stata aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.17 ml, 3.3 mmoli) diluito in CH<sub>3</sub>CN (160 ml) fino a scomparsa del prodotto di partenza, mantenendo la temperatura compresa tra 0°C e 5°C (TLC: CE/EtOAc, 50/50). La miscela di reazione è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido è stato cristallizzato da MeOH, ottenendo la **8-bromo-4-clorometil-7-idrossicumarina** (0.16 g, resa 39%), con p.f. 247°C.

### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

- 11.48 (s all., 1 H, 7-OH)
- 7.70 (d, J=8.8, 1 H, 5-H)
- 7.01 (d, J=8.8, 1 H, 6-H)
- 6.51 (s, 1 H, 3-H)
- 4.97 (s, 2 H, -CH<sub>2</sub>Cl)

**$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ )**

160.47, 158.35, 152.43, 151.62, 124.36, 112.55, 111.21, 107.39, 96.84, 59.43.

**HRMS (ESI-TOF) per  $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{BrClO}_3$  ( $\text{M}^- -1$ )**

( $\text{M}^-$ ) -1	286.9116 (calcolato)	286.9126 (trovato)
---------------------	----------------------	--------------------

( $\text{M}^- +2$ ) -1	288.9094 (calcolato)	288.9097 (trovato)
------------------------	----------------------	--------------------

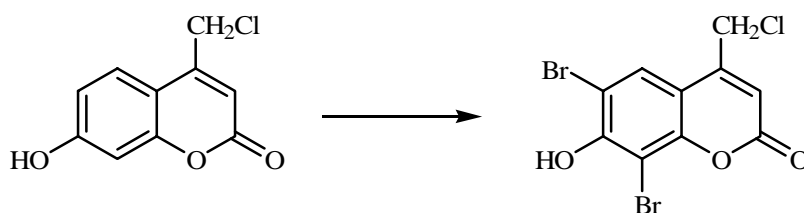
**ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 41.49%, H 2.09%, Br 27.60%, Cl 12.25%

Trovato: C 41.52%, H 2.08%, Br 27.57%, Cl 12.23%



## Sintesi di 6,8-dibromo-4-clorometil-7-idrossicumarina



Una soluzione di 4-clorometil-7-idrossicumarina (0.50 g, 2.4 mmoli) in  $\text{CHCl}_3$  (200 ml) è stata addizionata, goccia a goccia, di una soluzione di  $\text{Br}_2$  (0.30 ml, 5.9 mmoli) in  $\text{CHCl}_3$  (100 ml). La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CE/EtOAc, 10/90) e quindi concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato cristallizzato da MeOH, ottenendo la **6,8-dibromo-4-clorometil-7-idrossicumarina** (0.57 g, 65%), con p.f. 212°C.

### $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- $d_6$ )

8.08 (s, 1 H, 5-H)

6.57 (t,  $J=0.8$ , 1-H, 3-H)

5.02 (d,  $J=0.8$ , 2 H,  $-\text{CH}_2\text{Cl}$ )

### $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- $d_6$ )

160.58, 146.03, 153.42, 151.58, 129.49, 115.34, 114.29, 107.89, 100.81, 42.85.

### HRMS (ESI-TOF) per $\text{C}_{10}\text{H}_4\text{Br}_2\text{ClO}_3$ ( $M^- - 1$ )

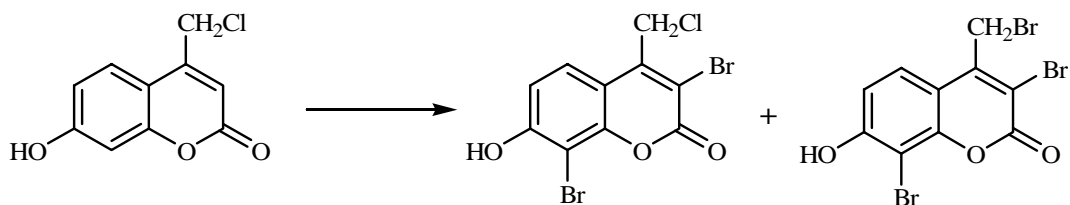
( $M^- - 1$ )	364.8221 (calcolato)	364.8247 (trovato)
( $M^- + 2$ ) $-1$	366.8200 (calcolato)	366.8197 (trovato)
( $M^- + 4$ ) $-1$	368.8178 (calcolato)	368.8189 (trovato)

### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 32.60%, H 1.37%, Br 43.38%, Cl 9.62%;

Trovato: C 32.62%, H 1.36%, Br 43.36%, Cl 9.64%.

Tentativo di sintesi di 3,8-dibromo-4-clorometil-7-idrossicumarina a partire dalla 4-clorometil-7-idrossicumarina.



#### METODO A

Ad una soluzione di 4-clorometil-7-idrossicumarina (0.50 g, 2.4 mmoli) in CH<sub>3</sub>CN (50 ml) è stata aggiunta lentamente (una settimana) una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.36 ml, 7.1 mmoli) diluito in CH<sub>3</sub>CN (300 ml) (TLC: CE/EtOAc, 10/90). Dopo aver concentrato a secchezza la miscela di reazione il residuo solido è stato cromatografato su colonna con eluente CHCl<sub>3</sub>, ottenendo però una miscela di **3,8-dibromo-4-clorometil-7-idrossicumarina** e di **3,8-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina**, che non è stato possibile separare ulteriormente ma identificare mediante NMR ed MS.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) di 3,8-dibromo-4-clorometil-7-idrossicumarina

11.62 (s all., 1 H, 7-OH)  
7.82 (d, J=8.9, 1 H, 5-H)  
7.05 (d, J=8.9, 1 H, 6-H)  
5.02 (s, 2 H, -CH<sub>2</sub>Cl)

HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>ClO<sub>3</sub> (M<sup>-</sup> -1)

(M <sup>-</sup> -1)	364.8220 (calcolato)	364.8386 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2) -1	366.8200 (calcolato)	366.8232 (trovato)
(M <sup>-</sup> +4) -1	368.8178 (calcolato)	368.8219 (trovato)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>) di 3,8-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina

11.62 (s all., 1 H, -OH)

7.82 (d, J=8.9, 1 H, 5-H)

7.05 (d, J=8.9, 1 H, 6-H)

4.89 (s, 2 H, -CH<sub>2</sub>Br)

**HRMS** (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>4</sub>Br<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (M<sup>-</sup> -1)

(M<sup>-</sup> -1)                      408.7716 (calcolato)                      408.7906 (trovato)

(M<sup>-</sup> +2) -1                      410.7696 (calcolato)                      410.7720 (trovato)

(M<sup>-</sup> +4) -1                      412.7676 (calcolato)                      412.7720 (trovato)

(M<sup>-</sup> +6) -1                      414.7656 (calcolato)                      414.7670 (trovato)

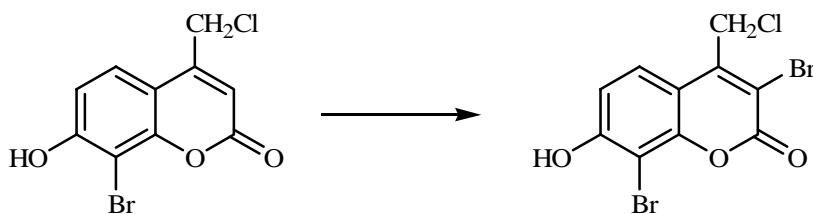
## METODO B

Una soluzione di 4-clorometil-7-idrossicumarina (0.50 g, 2.4 mmoli) in CH<sub>3</sub>CN (50 ml) è stata addizionata, goccia a goccia, di una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.36 ml, 7.1 mmoli) in CH<sub>3</sub>CN (300 ml). La miscela di reazione è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per 2 giorni (TLC: CE/EtOAc, 10/90). La miscela di reazione è stata concentrata a secchezza, ottenendo una miscela complessa di prodotti che non sono stati identificati e separati.

## METODO C

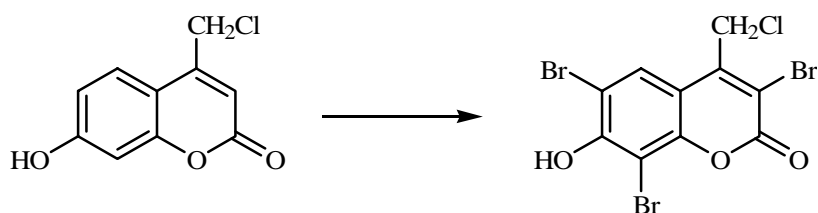
Ad una soluzione di 4-clorometil-7-idrossicumarina (0.50 g, 2.4 mmoli) in CH<sub>3</sub>CN (50 ml) è stata aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.36 ml, 7.1 mmoli) in CH<sub>3</sub>CN (300 ml). La miscela di reazione è stata mantenuta in agitazione ad una temperatura compresa fra 0°C e 5°C per 3 giorni fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CE/EtOAc, 10/90). La miscela di reazione è stata concentrata a secchezza. Da analisi <sup>1</sup>H-NMR il solido ottenuto è risultato una miscela complessa di prodotti che non sono stati identificati e separati.

Tentativo di sintesi di 3,8-dibromo-4-clorometil-7-idrossicumarina a partire dalla 8-bromo-4-clorometil-7-idrossicumarina.



Ad una miscela di 8-bromo-4-clorometil-7-idrossicumarina (0.30 g, 1.0 mmoli) ed CH<sub>3</sub>CN (400 ml) è stata aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.15 ml, 2.9 mmoli) in CH<sub>3</sub>CN (200 ml), mantenendo una temperatura compresa fra 0°C e 5°C fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CE/EtOAc, 10/90). La miscela di reazione è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido è stato purificato mediante cromatografia su colonna con eluente CHCl<sub>3</sub>, ottenendo la **6,8-dibromo-4-clorometil-7-idrossicumarina** (64 mg, resa 16%).

### Sintesi di 3,6,8-tribromo-4-clorometil-7-idrossicumarina



Una miscela di 4-clorometil-7-idrossicumarina (0.20 g, 1.0 mmoli) e di NBS (0.65 g, 3.6 mmoli) solubilizzata in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (200 ml) è stata posta a riflusso per 2 ore fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 80/20). La miscela di reazione è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido è stato trattato a caldo con acqua. Il residuo indisciolto è stato dapprima separato per filtrazione e successivamente purificato mediante cromatografia su colonna con eluente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , ottenendo la **3,6,8-tribromo-4-clorometil-7-idrossicumarina** (0.58 g, resa 92%), con p.f. 215°C.

#### $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{DMSO-}d_6$ )

8.21 (s, 1 H, 5-H)

5.08 (s, 2 H,  $-\text{CH}_2\text{Cl}$ )

#### $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{DMSO-}d_6$ )

155.98, 154.70, 149.69, 147.61, 127.90, 112.12, 108.10, 99.72, 60.80.

#### HRMS (ESI-TOF) per $\text{C}_{10}\text{H}_3\text{Br}_3\text{ClO}_3$ ( $\text{M}^- -1$ )

( $\text{M}^-$ ) -1                      442.7326 (calcolato)                      442.7413 (trovato)

( $\text{M}^- +2$ ) -1                      444.7305 (calcolato)                      444.7365 (trovato)

( $\text{M}^- +4$ ) -1                      446.7284 (calcolato)                      446.7321 (trovato)

( $\text{M}^- +6$ ) -1                      448.7262 (calcolato)                      448.7325 (trovato)

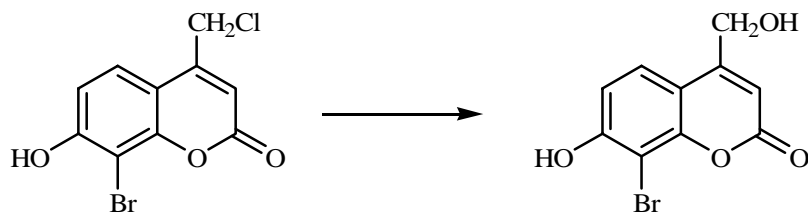
#### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 26.85%, H 0.90%, Br 53.59%, Cl 7.93%

Trovato: C 26.87%, H 0.92%, Br 53.55%, Cl 7.90%

## Sintesi di bromoderivati della 4-idrossimetil-7-idrossicumarina

### Sintesi di 8-bromo-7-idrossi-4-idrossimetilcumarina



Una sospensione di 8-bromo-4-clorometil-7-idrossicumarina (0.10 g, 0.35 mmoli) in acqua (20 ml) è stata irradiata per 15 minuti a 100 W, mantenendo la temperatura a 150°C (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 95/5). Il solido indisciolto cristallino è stato separato per filtrazione, ottenendo la **8-bromo-7-idrossi-4-idrossimetilcumarina** (94 mg, resa quantitativa), con p.f. >300.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

11.32 (s all., 1 H, -OH)  
7.54 (d, J=8.8, 1 H, 5-H)  
6.95 (d, J=8.8, 1 H, 6-H)  
6.30 (s, 1 H, 3-H)  
5.64 (s all., 1 H, -CH<sub>2</sub>OH)  
4.71 (s, 2 H, -CH<sub>2</sub>OH)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

160.07, 158.01, 157.00, 151.59, 124.09, 112.49, 110.66, 106.99, 97.05, 59.11.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>BrO<sub>4</sub> (M<sup>-</sup>-1)

(M <sup>-</sup> ) -1	268.9455 (calcolato)	268.9483 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2) -1	270.9436 (calcolato)	270.9458 (trovato)

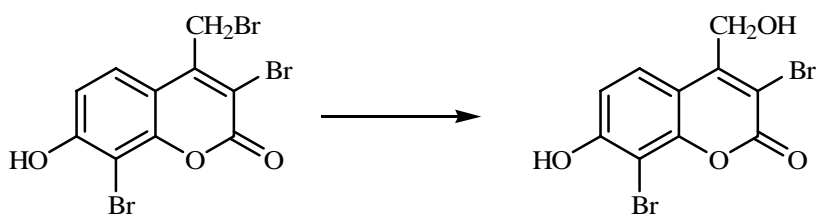
### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 44.31%, H 2.60%, Br 29.48%

Trovato: C 44.34%, H 2.63%, Br 29.47%



### Sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-idrossimetilcumarina



Una sospensione di 3,8-dibromo-4-bromometil-7-idrossicumarina (50 mg, 0.12 mmoli) in acqua (30 ml) è stata irradiata per 15 minuti a 100 W, mantenendo la temperatura a 150°C (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 95/5). Il solido indisciolto cristallino è stato separato per filtrazione, ottenendo la **3,8-dibromo-7-idrossi-4-idrossimetilcumarina** (42 mg, resa quantitativa), con p.f. 219°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

11.49 (s all., 1 H, 7-OH)  
7.87 (d, J=8.9, 1 H, 5-H)  
7.02 (d, J=8.9, 1 H, 6-H)  
5.74 (s, 1 H, -CH<sub>2</sub>-OH)  
4.82 (s, 2 H, -CH<sub>2</sub>-OH)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

158.50, 157.16, 152.40, 150.50, 126.86, 113.37, 112.27, 108.64, 96.98, 60.91.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M<sup>-</sup> -1)

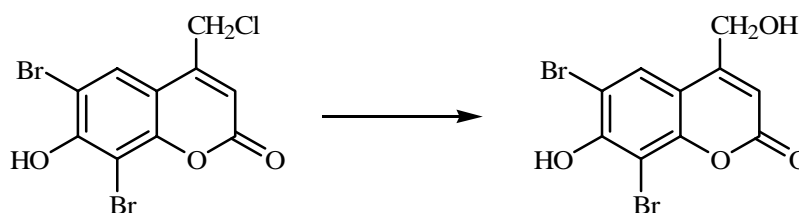
(M <sup>-</sup> -1)	346.8560 (calcolato)	346.8565 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2) -1	348.8540 (calcolato)	348.8576 (trovato)
(M <sup>-</sup> +4) -1	350.8521 (calcolato)	350.8530 (trovato)

#### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 34.32%, H 1.73%, Br 45.66%

Trovato: C 34.33%, H 1.75%, Br 45.69%

### Sintesi di 6,8-dibromo-7-idrossi-4-idrossimetilcumarina



Una sospensione di 6,8-dibromo-4-clorometil-7-idrossicumarina (0.50 ml, 1.4 mmoli) in acqua (40 ml) è stata irradiata per 15 minuti a 100W, mantenendo la temperatura a 150°C (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 95/5). Il solido indisciolto è stato separato per filtrazione, ottenendo la **6,8-dibromo-7-idrossi-4-idrossimetilcumarina** (0.49 g, resa quantitativa) con p.f. 222°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>)

7.92 (s, 1 H, 5-H)

6.46 (t, J=1.5, 1 H, 3-H)

4.92 (d, J=1,5, 2 H, -CH<sub>2</sub>-OH)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

158.24, 155.18, 149.85, 146.34, 124.81, 113.60, 111.01, 109.67, 96.84, 60.93.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M<sup>-</sup> -1)

(M<sup>-</sup> -1) 346.8560 (calcolato) 346.8521 (trovato)

(M<sup>-</sup> +2) -1 348.8540 (calcolato) 348.8596 (trovato)

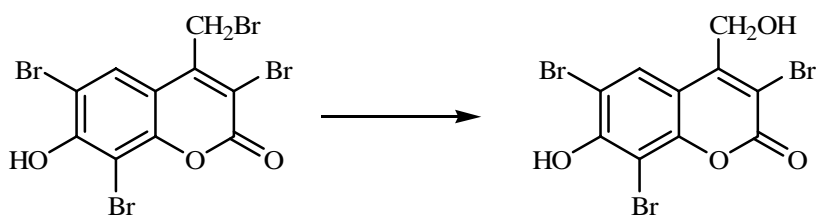
(M<sup>-</sup> +4) --1 350.8521 (calcolato) 350.8548 (trovato)

#### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 34.32%, H 1.73%, Br 45.66%

Trovato: C 34.30%, H 1.72%, Br 45.62%

### Sintesi di 3,6,8-tribromo-7-idrossi-4-idrossimetilcumarina



Una sospensione di 3,6,8-tribromo-4-bromometil-7-idrossicumarina (0.15 g, 0.30 mmoli) in acqua (40 ml) è stata irradiata per 15 minuti a 100 W, mantenendo la temperatura a 150°C (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 95/5). Il solido indisciolto ottenuto è stato separato per filtrazione, ottenendo la **3,6,8-tribromo-7-idrossi-4-idrossimetilcumarina** (0.13 g, resa quantitativa), con p.f. 226°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

8.20 (s, 1 H, 5-H)

4.82 (s, 2 H, -CH<sub>2</sub>-OH)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

156.21, 154.51, 150.89, 149.45, 128.99, 113.58, 109.61, 107.55, 99.30, 60.84.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>4</sub>Br<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M<sup>-</sup> -1)

(M <sup>-</sup> ) -1	424.7665 (calcolato)	424.7745 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2) -1	426.7645 (calcolato)	426.7706 (trovato)
(M <sup>-</sup> +4) -1	428.7625 (calcolato)	428.7693 (trovato)
(M <sup>-</sup> +6) -1	430.7607 (calcolato)	430.7685 (trovato)

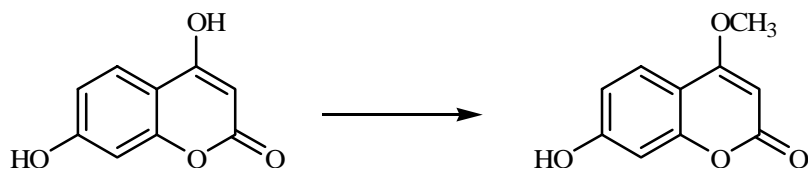
#### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 28.01%, H 1.18%, Br 55.90%

Trovato: C 28.03%, H 1.19%, Br 55.87%

## Sintesi di bromoderivati della 7-idrossi-4-metossicumarina

### Sintesi di 7-idrossi-4-metossicumarina

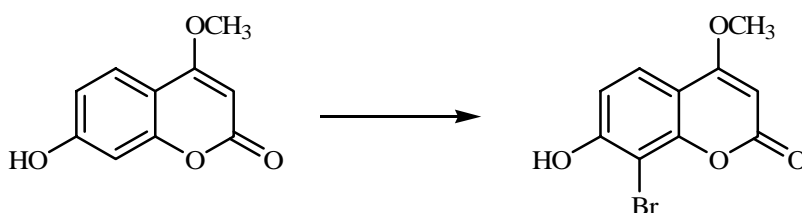


Una soluzione di 4,7-diidrossicumarina (1.0 g, 5.6 mmoli), in MeOH (56 ml) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato (5.6 ml) è stata posta a riflusso per 3 ore fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 80/20). Dopo raffreddamento si è formato nella miscela di reazione un precipitato che è stato separato per filtrazione e lavato abbondantemente con acqua, ottenendo la **7-idrossi-4-metossicumarina** (0.65 g, resa 60%), con p.f. 259°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>)

- 10.56 (s all., 1 H, -OH)
- 7.61 (d, J=8.7, 1 H, 5-H)
- 6.79 (dd, J=8.7, J=2.4, 1 H, 6-H)
- 6.69 (d, J=2.4, 1 H, 8-H)
- 5.67 (s, 1 H, 3-H)
- 3.96 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>)

### Sintesi di 8-bromo-7-idrossi-4-metossicumarina



Ad una soluzione di 7-idrossi-4-metossicumarina (0.30 g, 1.6 mmoli) in AcOH glaciale (130 ml), termostata a 60°C, è stata aggiunta una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.12 ml, 2.3 mmoli) diluito in AcOH (50 ml) e la soluzione è stata mantenuta a questa temperatura per 2 ore fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Dopo raffreddamento la miscela di reazione, versata in acqua e neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub>, è stata estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata quindi anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato cristallizzato da EtOAc, ottenendo la **8-bromo-7-idrossi-4-metossicumarina** (73 mg, resa 19%), con p.f. 259°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>)

7.69 (d, J=8.8, 1 H, 5-H)

7.02 (d, J=8.8, 1 H, 6-H)

5.66 (s, 1 H, 3-H)

4.07 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>)

#### <sup>13</sup>C-NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>)

163.38, 159.21, 157.60, 149.82, 124.13, 113.71, 111.08, 97.81, 95.23, 61.34.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>BrO<sub>4</sub> (M<sup>-</sup>-1)

(M<sup>-</sup>-1)                      268.9455 (calcolato)                      268.9487 (trovato)

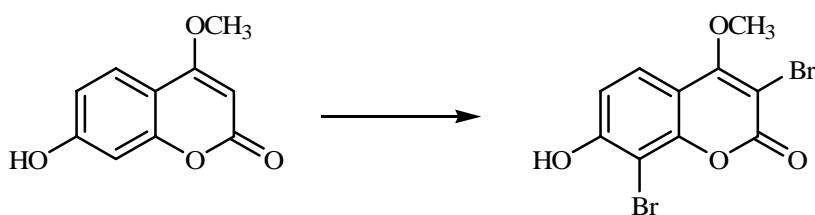
(M<sup>-</sup>+2)-1                      270.9436 (calcolato)                      270.9462 (trovato)

### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 44.31%, H 2.60%, Br 29.48%

Trovato: C 44.33%, H 2.63%, Br 29.45%

## Sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-metossicumarina



### METODO A

Ad una soluzione di 7-idrossi-4-metossicumarina (0.20 g, 1.0 mmoli) in AcOH glaciale (70 ml), termostata a 60°C, è stato aggiunto Br<sub>2</sub> (0.10 ml, 2.0 mmoli) diluito in AcOH (20 ml). Dopo 2 ore a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10) la miscela di reazione è stata fatta raffreddare, quindi versata in acqua e neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub>. La miscela di reazione è stata estratta a fondo con EtOAc e la fase organica, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, è stata concentrata a secchezza, ottenendo una complessa miscela di prodotti. La reazione è stata abbandonata.

### METODO B

Ad una soluzione di 7-idrossi-4-metossicumarina (0.50 g, 2.6 mmoli) in AcOH glaciale (150 ml) è stata aggiunta una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.27 ml, 5.2 mmoli) in AcOH (60 ml) e la soluzione è stata mantenuta a temperatura ambiente per 2 ore fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata versata in acqua, neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub> ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a secchezza ed il residuo solido è stato purificato mediante cromatografia su colonna con eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ottenendo la **3,8 dibromo-7-idrossi-4-metossicumarina** (0.21 g, resa 23%), con p.f. 222°C.

### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

11.58 (s all., 1 H, -OH)

7.67 (d, J=8.8, 1 H, 5-H)

7.02 (d, J=8.8, 1 H, 6-H)

4.11 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

165.53, 159.09, 158.64, 150.58, 123.61, 113.13, 110.13, 96.88, 95.02, 62.07.

**HRMS** (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M<sup>-</sup> -1)

(M <sup>-</sup> ) -1	346.8560 (calcolato)	346.8635 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2) -1	348.8540 (calcolato)	348.8594 (trovato)
(M <sup>-</sup> +4) -1	350.8521 (calcolato)	350.8571 (trovato)

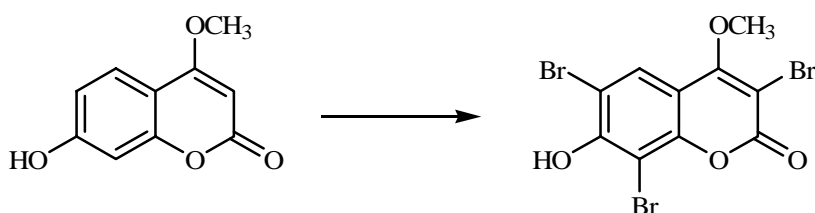
#### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 34.32%, H 1.73%, Br 45.66%

Trovato: C 34.31%, H 1.75%, Br 45.68%



## Sintesi di 3,6,8-tribromo-7-idrossi-4-metossicumarina



Una miscela di 7-idrossi-4-metossicumarina (0.20 g, 1.0 mmoli) ed NBS (0.73 g, 4.1 mmoli) solubilizzata in CH<sub>3</sub>CN (200 ml) è stata mantenuta a temperatura ambiente per 1 ora (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido è stato cristallizzato da DCE, ottenendo la **3,6,8-tribromo-7-idrossi-4-metossicumarina** (0.40 g, resa 88%), con p.f. 227°C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (Acetone-*d*<sub>6</sub>)

8.03 (s, 1 H, 5-H)

4.28 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR** (Acetone-*d*<sub>6</sub>)

166.13, 159.75, 156.89, 151.75, 127.76, 113.80, 108.63, 100.32, 97.69, 63.57.

**HRMS** (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>4</sub>Br<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M<sup>-</sup> -1)

(M <sup>-</sup> -1)	424.7665 (calcolato)	424.7774 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2) -1	426.7645 (calcolato)	426.7725 (trovato)
(M <sup>-</sup> +4) -1	428.7625 (calcolato)	428.7714 (trovato)
(M <sup>-</sup> +6) -1	430.7607 (calcolato)	430.7705 (trovato)

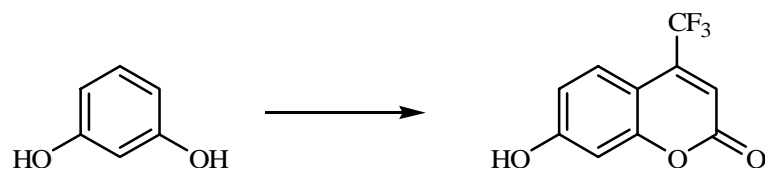
### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 28.01%, H 1.18%, Br 55.90%

Trovato: C 28.03%, H 1.20%, Br 55.91%

## Sintesi di bromoderivati della 7-idrossi-4-trifluorometilcumarina

### Sintesi di 7-idrossi-4-trifluorometilcumarina

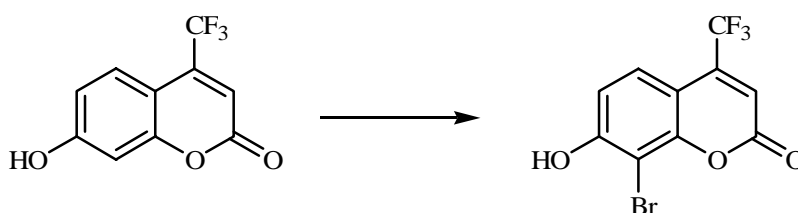


Una soluzione di resorcina (4.0 g, 36.3 mmoli) in etile trifluorometilacetoacetato (6.4 ml, 43.59 mmoli) e TFA (10 ml) è stata posta a riflusso per 3 ore (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata versata in acqua (100 ml) con formazione di un precipitato che è stato separato per filtrazione, solubilizzato a caldo in MeOH e fatto precipitare in forma cristallina per lenta aggiunta d'acqua, ottenendo la **7-idrossi-4-trifluorometilcumarina** (4.8 g, resa 56%), con p.f. 180°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

- 10.98 (s, 1 H, -OH)
- 7.54 (dq, J=9.0, J=1.9, 1 H, 5-H)
- 6.89 (dd, J=9.0, J=2.4, 1 H, 6-H)
- 6.82 (d, J=2.4, 1 H, 8-H)
- 6.73 (s, 1 H, 3-H)

## Sintesi di 8-bromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina



Ad una soluzione di 7-idrossi-4-trifluorometilcumarina (0.50 g, 2.2 mmoli) in AcOH glaciale (50 ml) è stata aggiunta una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.16 ml, 3.3 mmoli) in AcOH (60 ml) e la soluzione è stata mantenuta a temperatura ambiente per 2 ore fino a scomparsa del prodotto di partenza (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata versata in acqua, neutralizzata con NaHCO<sub>3</sub> ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrata a secchezza, ed il residuo solido è stato purificato mediante cromatografia su colonna con eluente CHCl<sub>3</sub>, ottenendo la **8-bromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina** (0.20 g, resa 30%), con p.f. 214°C.

### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

11.75 (s, 1 H, -OH)  
7.57 (dq, J=8.9, J=1.9, 1 H, 5-H)  
7.08 (d, J=8.9, 1 H, 6-H)  
6.85 (s, 1 H, 3-H)

### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

159.03, 158.20, 152.46, 139.40 (q, J=32.1), 124.55, 121.54 (q, J=275.6), 113.27, 112.69 (q, J=5.7), 106.36, 97.69.

### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>3</sub>BrF<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (M<sup>-</sup> -1)

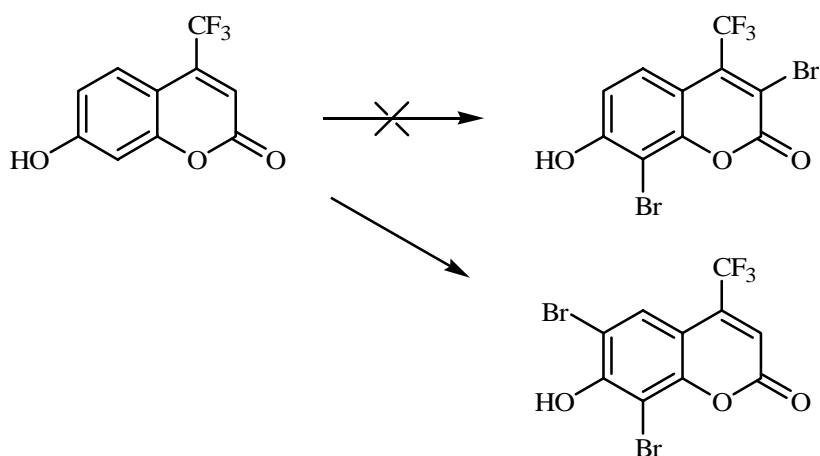
(M <sup>-</sup> -1)	306.9223 (calcolato)	306.9229 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2) -1	308.9204 (calcolato)	308.9233 (trovato)

### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 38.87%, H 1.30%, Br 25.86%, F 18.44%

Trovato: C 38.90%, H 1.34%, Br 25.88%, F 18.48%

Tentativo di sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina



La 7-idrossi-4-trifluorometilcumarina (0.3 g, 1.3 mmoli) è stata solubilizzata in AcOH glaciale (20 ml) ed alla soluzione è stata aggiunta, a piccole porzioni, alla temperatura di 60°C, una soluzione contenente bromo (0.35 ml, 4.2 mmoli) in AcOH glaciale. La miscela di reazione è stata lasciata per 1 ora a 60°C (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata versata in acqua (50 ml) ed il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione ed il solido ottenuto è stato sciolto a caldo in EtOAc e fatto precipitare in forma cristallina per lenta aggiunta di CE, ottenendo la **6,8-dibromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina** (0.28 g, resa 55%), con p.f. 216°C.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

7.72 (q, J=1.5, 1 H, 5-H)

6.94 (s, 1 H, 3-H)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

157.76, 155.23, 151.57, 138.13 (q, J=138.13), 126.26, 121.34 (q, J=275.61), 114.64, 107.80, 107.85, 100.42.

**HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>F<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (M<sup>-</sup> -1)**

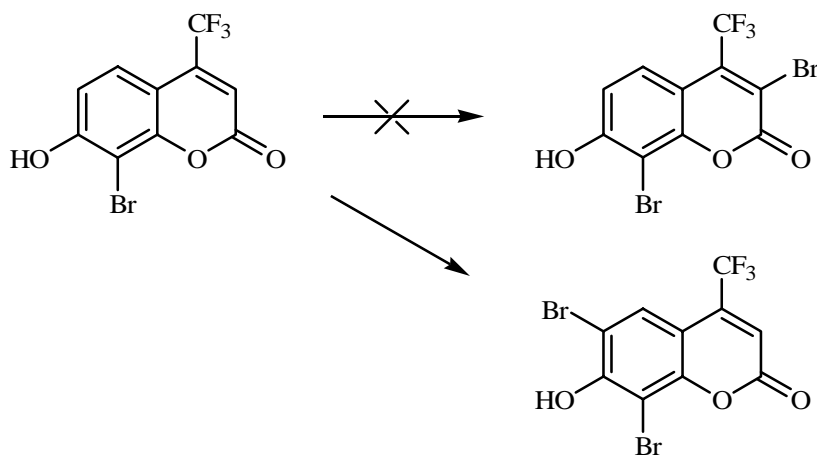
(M) -1	384.8323 (calcolato)	384.8297 (trovato)
(M+2) -1	386.8302 (calcolato)	386.8382 (trovato)
(M+4) -1	388.8282 (calcolato)	386.8400 (trovato)

**ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 30.96%, H 0.78%, Br 41.19%, F 12.80%

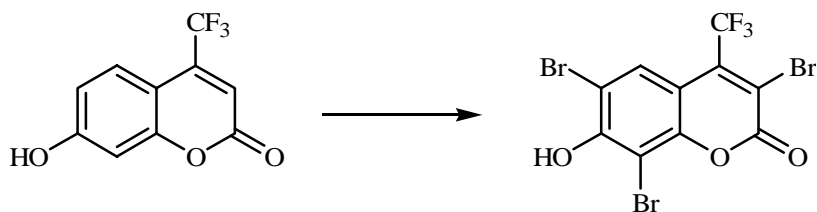
Trovato: C 40.01%, H 0.76%, Br 41.23%, F 12.75%

Tentativo di sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina da 8-bromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina



La 8-bromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina (0.30 g, 0.97 mmoli) è stata solubilizzata in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (30 ml) ed alla soluzione è stata aggiunta, goccia a goccia, a temperatura ambiente, una soluzione contenente bromo (0.05 ml, 0.97 mmoli) in  $\text{CH}_3\text{CN}$ . La miscela di reazione è stata lasciata per 1 ora a temperatura ambiente (TLC:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 90/10). La miscela di reazione, concentrata a secchezza, è stata ripresa con acqua (50 ml) ed estratta con EtOAc. La fase organica è stata anidrificata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , concentrata a secchezza, ed il residuo solido è stato sciolto a caldo in EtOAc e fatto precipitare in forma cristallina per lenta aggiunta di CE, ottenendo la **6,8-dibromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina** (0.24 g, resa 77%).

### Sintesi di 3,6,8-tribromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina



Una miscela di 7-idrossi-4-trifluorometilcumarina (0.51 g, 2.2 mmoli) ed NBS (1.2 g, 6.6 mmoli) solubilizzata in CH<sub>3</sub>CN (200 ml) è stata posta a riflusso per 2 ore (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata concentrata a secchezza, ripresa con acqua ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido è stato cristallizzato da DCE, ottenendo la **3,6,8-tribromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina** (0.86 g, resa 83%), con p.f. 185°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

7.81 (q, J=1.8, 1 H, 5-H)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

164.85, 156.40, 155.70, 153.45, 141.27, 114.77, 109.86, 108.60, 102.51, 100.59.

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>HBr<sub>3</sub>F<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (M<sup>-</sup>-1)

(M <sup>-</sup> )-1	462.7433 (calcolato)	462.7489 (trovato)
(M <sup>-</sup> +2)-1	464.7413 (calcolato)	464.7489 (trovato)
(M <sup>-</sup> +4)-1	466.7393 (calcolato)	466.7403 (trovato)
(M <sup>-</sup> +6)-1	468.7375 (calcolato)	468.7420 (trovato)

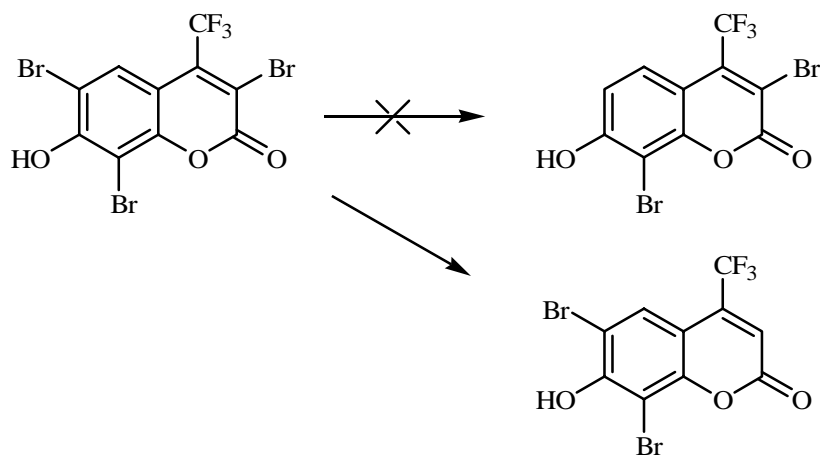
#### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 25.73%, H 0.43%, Br 51.35%, F 12.21%

Trovato: C 25.71%, H 0.44%, Br 51.32%, F 12.18%



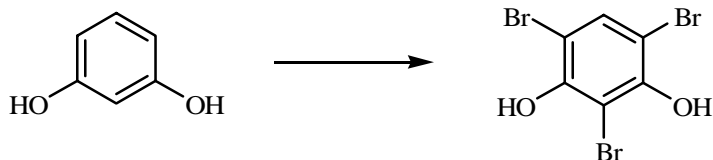
Tentativo di sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina da 3,6,8-tribromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina



Una sospensione di 3,6,8-tribromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina (0.40 g, 0.86 mmoli) in acqua (20 ml) e MeOH (30 ml) è stata aggiunta di una soluzione di Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (11 mg, 0.86 mmoli), NaOH (4 mg, 0.86 mmoli) in acqua (5 ml) e mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La miscela di reazione è stata quindi acidificata con HCl 4M, ottenendo la formazione di un precipitato che è stato separato per filtrazione, ottenendo la **6,8-dibromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina** (0.34 g, resa quantitativa).

## Tentativo di sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina da 2-bromoresorcinolo

### Sintesi di 2,4,6-tribromoresorcinolo



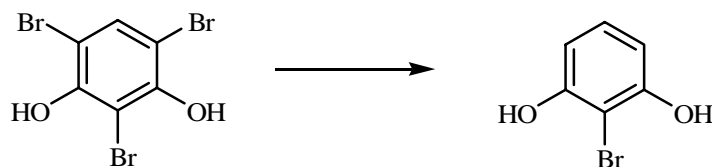
Una soluzione di resorcina (6.0 g, 54.5 mmoli)  $\text{Br}_2$  (8.4 ml, 163.5 mmoli) in AcOH (100 ml) è stata termosatata a 60 °C per 4 ore (TLC: CE/EtOAc, 50/50). Per raffreddamento si è ottenuto un precipitato che è stato separato per filtrazione e lavato abbondantemente con acqua, ottenendo il **2,4,6-tribromoresorcinolo** (13.5 g, resa 71%) con p.f. 111°C.

**$^1\text{H-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ )

9.98 (s all., 2 H, -OH)

7.68 (s, 1 H, 5-H)

### Sintesi di 2-bromoresorcinolo

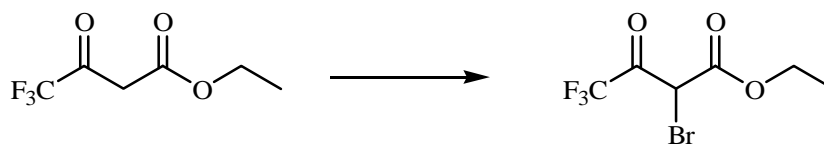


Ad una soluzione di NaOH (2.8 g, 69.2 mmoli) e Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (8.7 g, 69.2 mmoli) in acqua (125 ml) e MeOH (25 ml) è stato addizionato il 2,4,6-tribromoresorcinolo (12 g, 34.6 mmoli). La miscela di reazione è stata mantenuta a temperatura ambiente per 15 minuti (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10) e successivamente è stata acidificata con HCl 4M. Dalla soluzione è stato rimosso per evaporazione il MeOH e la fase acquosa è stata estratta a fondo con dietil etere. La fase organica, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido è stato cristallizzato da CHCl<sub>3</sub>, ottenendo il **2-bromoresorcinolo** (12.0 g, resa 92%), con p.f. 102°C.

#### <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

- 7.11 (d, J=8.2, 1 H, 5-H)
- 6.60 (d, J=8.2, 2 H, 4-H e 6-H)
- 5.42 (s, 2 H, -OH)

### Sintesi di etile 2-bromotrifluoroacetacetato



Una sospensione di NaH (0.26 g, 11 mmoli) in THF è stata termostata a 0°C ed aggiunta lentamente di trifluoroacetato d'etile (2.0 g, 10.9 mmoli). Al termine dell'aggiunta la miscela di reazione è stata portata a temperatura ambiente ed aggiunta di una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.56 ml, 10.86 mmoli) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml) e lasciata a tale temperatura per 3 ore (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 85/15). La miscela di reazione è stata filtrata su gel di silice e successivamente concentrata per evaporazione, ottenendo l' **etile 2-bromotrifluoroacetacetato** (2.7 g, resa 94%).

#### <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

4.54 (s, 1 H, H-2)

4.31 (q, J=7.1, 2 H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

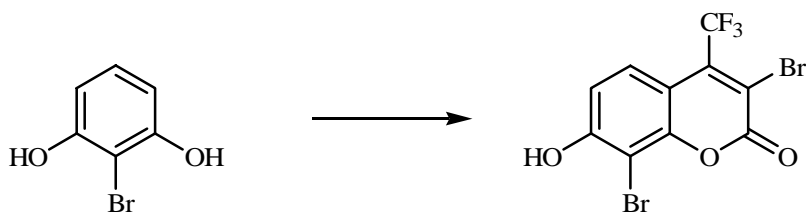
1.32 (t, J=7.1, 3 H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

#### HRMS (ESI-TOF) per C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>BrF<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (M<sup>-</sup> -1)

(M<sup>-</sup>) -1                      260.9380 (calcolato)                      260.9387 (trovato)

(M<sup>+2</sup>) -1                      262.9360 (calcolato)                      262.9358 (trovato)

### Tentativo di sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina



#### METODO A

Una soluzione di 2-bromoresorcinolo (0.4 g, 2.1 mmoli), etile 2-bromotrifluoroacetato (0.6 g, 2.2 mmoli) in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (10 ml) è stata lasciata overnight a temperatura ambiente e successivamente la temperatura è stata incrementata di 10°C ogni 30 minuti fino a raggiungere i 95°C (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La reazione è stata abbandonata in quanto nella miscela di reazione si è osservata la sola presenza dei reattivi di partenza.

#### METODO B

Una soluzione di 2-bromoresorcinolo (0.4 g, 2.1 mmoli), etile 2-bromotrifluoroacetato (0.6 g, 2.2 mmoli) in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (10 ml) è stata irradiata con microonde a 100 W, raggiungendo la temperatura di 80°C in 1 minuto. Tale temperatura è stata mantenuta, fornendo microonde con contemporaneo raffreddamento, per 10 minuti (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La reazione è stata abbandonata in quanto nella miscela di reazione si è osservata la sola presenza dei reattivi di partenza.

#### METODO C

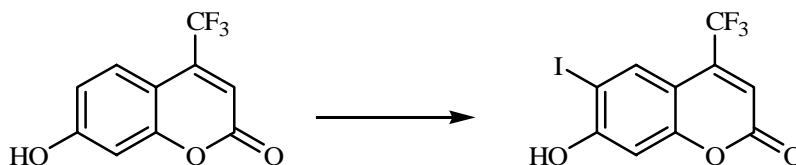
Una soluzione di 2-bromoresorcinolo (0.4 g, 2.1 mmoli), etile 2-bromotrifluoroacetato (0.6 g, 2.2 mmoli) in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (10 ml) ed EtOH assoluto (20 ml) è stata irradiata con microonde a 150 W, raggiungendo la temperatura di 130°C in 2 minuti. Tale temperatura è stata mantenuta, fornendo microonde con contemporaneo raffreddamento, per 10 minuti (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90/10). La reazione è stata abbandonata in quanto nella miscela di reazione si è osservata la sola presenza dei reattivi di partenza.

#### METODO D

Una sospensione di 2-bromoresorcinolo (0.4 g, 2.1 mmoli), etile 2-bromotrifluoroacetato (0.6 g, 2.2 mmoli) e  $\text{ZnCl}_2$  anidro (0.84 g, 6.2 mmoli) in EtOH assoluto (20 ml) è stata irradiata con microonde a 150 W, raggiungendo la temperatura di 130°C in 2 minuti. Tale temperatura è stata mantenuta, fornendo microonde con contemporaneo raffreddamento, per 20 minuti (TLC:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 90/10). La reazione è stata abbandonata in quanto nella miscela di reazione si è osservata la sola presenza dei reattivi di partenza.

**Tentativo di sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina da 7-idrossi-4-trifluorometilcumarine 6 sostituite**

Sintesi di 7-idrossi-6-iodo-4-trifluorometilcumarina



Una soluzione di 7-idrossi-4-trifluorometilcumarina (0.50 g, 2.17 mmoli) in  $\text{NH}_4\text{OH}$  20% (40 ml) è stata aggiunta di  $\text{I}_2$  (0.27 g, 1.09 mmoli) solubilizzato in una soluzione acquosa 10% di KI (30 ml). La miscela di reazione è stata mantenuta a temperatura ambiente per 1 ora (TLC: EtOc) ed è stata quindi acidificata con HCl 4M ottenendo la formazione di un precipitato che è stato raccolto per filtrazione e lavato con acqua, ottenendo la **7-idrossi-6-iodo-4-trifluorometilcumarina** (0.33 g, resa 43%), con p.f. 156°C.

**$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )**

8.01 (q,  $J=1.6$ , 1 H, H-5)

7.02 (s, 1 H, H-8)

6.64 (s, 1 H, H-3)

**HRMS (ESI-TOF) per  $\text{C}_{10}\text{H}_3\text{IF}_3\text{O}_3$  ( $M^- - 1$ )**

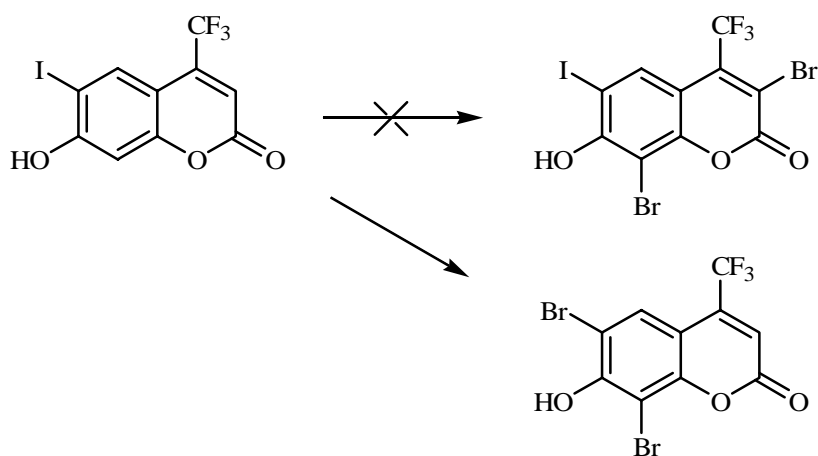
( $M^- - 1$ )                      354.9072 (calcolato)                      354.8960 (trovato)

**ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 33.73%, H 1.13%, I 35.64%, F 16.01%

Trovato: C 33.71%, H 1.14%, I 35.60%, F 16.02%

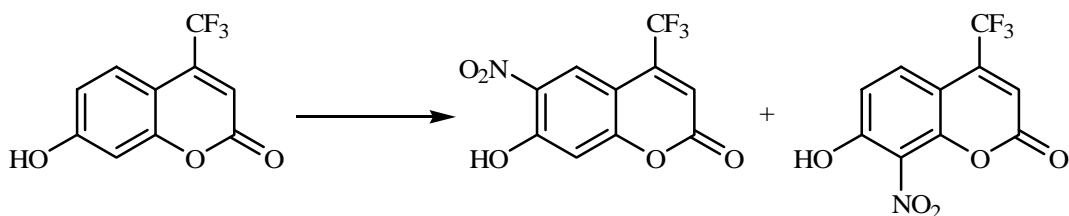
Tentativo di sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-6-iodo-4-trifluorometilcumarina



Una soluzione di 7-idrossi-6-iodo-4-trifluorometilcumarina (0.20 g, 0.56 mmoli) in AcOH (25 ml) è stata mantenuta a temperatura ambiente ed addizionata, goccia a goccia, di una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.06 ml, 1.2 mmoli). Al termine dell'aggiunta (TLC: EtOAc) la miscela di reazione è stata versata in acqua (60 ml) ed il precipitato formatosi è stato separato per filtrazione e lavato abbondantemente con acqua, ottenendo la **6,8-dibromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina** (0.18 g, resa 83%).



Sintesi di 7-idrossi-6-nitro-4-trifluorometilcumarina e 7-idrossi-8-nitro-4-trifluorometilcumarina



Una soluzione di 7-idrossi-4-trifluorometilcumarina (4.0 g, 17.4 mmoli) in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (70 ml) è stata termostata a 0°C ed aggiunta, goccia a goccia, di una soluzione di HNO<sub>3</sub> 65% (1.0 ml) in 6 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. mantenendo la temperatura della miscela di reazione a 0°C.

Al termine dell'aggiunta la miscela di reazione è stata versata in acqua (200 ml) ed il precipitato formatosi è stato separato per filtrazione e purificato mediante cromatografia su colonna con eluente EtOAc/CE 80/20, eluendo dapprima la **7-idrossi-6-nitro-4-trifluorometilcumarina** che è stata cristallizzata da MeOH (1.9 g, resa 40%), con p.f. 181°C, e successivamente la **7-idrossi-8-nitro-4-trifluorometilcumarina** che è stata solubilizzata a caldo in MeOH e fatta precipitare in forma cristallina per lenta aggiunta di CE (1.5 g, resa 31%), con p.f. 208°C.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) di 7-idrossi-6-nitro-4-trifluorometilcumarina

8.15 (q, J=1.6, 1 H, 5-H)

8.48 (s, 1 H, 8-H)

7.08 (s, 1 H, 3-H)

**HRMS** (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>3</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>5</sub> (M<sup>-</sup> -1) di 7-idrossi-6-nitro-4-trifluorometilcumarina

(M<sup>-</sup>) -1

273.9963 (calcolato)

273.9921 (trovato)

**ANALISI ELEMENTARE** di 7-idrossi-6-nitro-4-trifluorometilcumarina

Teorico: C 43.65%, H 1.47%, F 20.72%, N 5.09%

Trovato: C 43.63%, H 1.43%, F 20.75%, N 5.06%

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>) di 7-idrossi-8-nitro-4-trifluorometilcumarina

7.73 (dq, J=9.0, J=1.6, 1 H, 5-H)

7.10 (d, J=9.0, 1 H, 6-H)

67.03 (s, 1 H, 3-H)

**HRMS** (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>3</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>5</sub> (M<sup>-</sup> -1) di 7-idrossi-8-nitro-4-trifluorometilcumarina

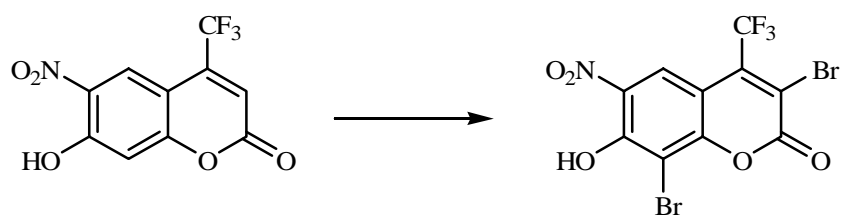
(M) -1	273.9963 (calcolato)	274.0058 (trovato)
--------	----------------------	--------------------

**ANALISI ELEMENTARE** di 7-idrossi-8-nitro-4-trifluorometilcumarina

Teorico: C 43.65%, H 1.47%, F 20.72%, N 5.09%

Trovato: C 43.62%, H 1.49%, F 20.74%, N 5.11%

### Sintesi di 3,8-dibromo-7-idrossi-6-nitro-4-trifluorometilcumarina



Una soluzione di 7-idrossi-6-nitro-4-trifluorometilcumarina (0.40 g, 1.5 mmoli)  $\text{Br}_2$  (0.22 ml, 4.2 mmoli) in AcOH (15 ml) è stata termosatata a 60 °C per 1 ore (TLC: CE/EtOAc, 50/50). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata versata in acqua (100 ml) ed il precipitato formatosi è stato separato per filtrazione e lavato abbondantemente con acqua, ottenendo la **3,8-dibromo-7-idrossi-6-nitro-4-trifluorometilcumarina** (0.44 g, resa 94%) con p.f. 178°C.

**$^1\text{H-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ )

8.28 (q,  $J=1.4$ , 1 H, 5-H)

**HRMS** (ESI-TOF) per  $\text{C}_{10}\text{HBr}_2\text{F}_3\text{NO}_5$  ( $\text{M}^- -1$ )

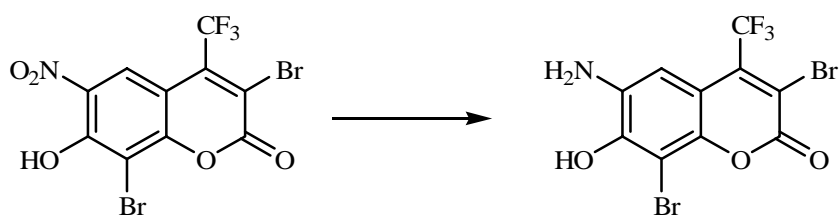
( $\text{M}^-$ ) -1	429.8174 (calcolato)	429.8102 (trovato)
( $\text{M}^-+2$ ) -1	431.8153 (calcolato)	431.7984 (trovato)
( $\text{M}^-+4$ ) -1	433.8133 (calcolato)	433.8189 (trovato)

### **ANALISI ELEMENTARE**

Teorico: C 27.74%, H 0.47%, Br 36.91, F 13.17%, N 3.24%

Trovato: C 27.73%, H 0.47%, Br 36.93, F 13.15%, N 3.22%

### Tentativo di sintesi di 6-amino-3,8-dibromo-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina



#### METODO A

Una soluzione di 3,8-dibromo-7-idrossi-6-nitro-4-trifluorometilcumarina (0.20 g, 0.62 mmoli), SnCl<sub>2</sub> (0.28 g, 1.3 mmoli), in EtOH (15 ml) è stata posta a riflusso per 1 ora (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 80/20). La miscela di reazione è stata concentrata a secchezza e versata in acqua (50 ml). La soluzione è stata alcalinizzata con NaHCO<sub>3</sub> ed estratta a fondo con EtOAc. La fase organica, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido da spettroscopia <sup>1</sup>H-NMR è risultato essere una miscela complessa di prodotti per cui la reazione è stata abbandonata.

#### METODO B

Una miscela di 3,8-dibromo-7-idrossi-6-nitro-4-trifluorometilcumarina (0.20 g, 0.62 mmoli), Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (0.11 g, 0.62 mmoli) solubilizzato in una soluzione acquosa di NH<sub>4</sub>OH al 10%, e MeOH (30 ml) è stata posta a riflusso per 1 ora (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 80/20). Nella miscela di reazione, diluita con acqua (100 ml), per raffreddamento si è ottenuto un precipitato che è stato separato per filtrazione ottenendo la **6-amino-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina** in miscela con il prodotto di partenza.

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

7.51 (s all., 1 H, 5-H)

6.97 (s, 1 H, 8-H)

6.85 (s, 1 H, 3-H)

**HRMS** (ESI-TOF) per  $C_{10}H_7F_3NO_3$  ( $M^+ + 1$ )

( $M^+$ ) +1

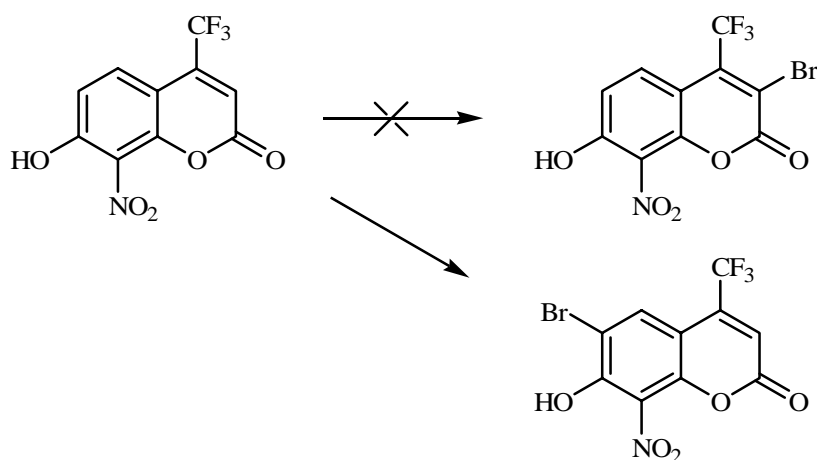
246.0378 (calcolato)

246.0415 (trovato)

#### METODO C

Una sospensione di Pd/C (10 mg) in EtOH assoluto è stata saturata in flusso di  $H_2$ . Alla sospensione è stata aggiunta una soluzione di 3,8-dibromo-7-idrossi-6-nitro-4-trifluorometilcumarina (0.20 g, 0.62 mmoli) in EtOH assoluto. Al termine dell'aggiunta (TLC:  $CHCl_3/MeOH$ , 80/20) la miscela di reazione è stata filtrata e concentrata a secchezza, ottenendo con resa quantitativa la **6-amino-7-idrossi-4-trifluorometilcumarina**.

### Tentativo di sintesi di 3-bromo-7-idrossi-8-nitro-4-trifluorometilcumarina



Una soluzione di 7-idrossi-8-nitro-4-trifluorometilcumarina (0.50 g, 1.8 mmoli) in AcOH (25 ml) è stata addizionata di una soluzione di Br<sub>2</sub> (0.09 ml, 1.8 mmoli) in AcOH (3 ml) e termostata a 50°C per 2 ore (TLC: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 80/20). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata versata in acqua (120 ml) ed il precipitato formatosi è stato separato per filtrazione, lavato abbondantemente con acqua, e cristallizzato da MeOH, ottenendo il **6-bromo-7-idrossi-8-nitro-4-trifluorometilcumarina** (0.40 g, resa 62%) con p.f. 172°C.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

7.69 (q, J=1.7, 1 H, 5-H)

6.64 (s, 1 H, 3-H)

HRMS (ESI-TOF) per C<sub>10</sub>H<sub>2</sub>BrF<sub>3</sub>NO<sub>5</sub> (M<sup>-</sup>-1)

(M) -1                      351.9064 (calcolato)                      351.9011 (trovato)

(M+2) -1                      353.9044 (calcolato)                      353.8988 (trovato)

#### ANALISI ELEMENTARE

Teorico: C 33.93%, H 0.85%, Br 22.57, F 16.10%, N 3.96%

Trovato: C 33.95%, H 0.86%, Br 22.59, F 16.07%, N 3.97%



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. J.L. Nitiss, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1400**, 63-81 (1998).
2. J.C. Wang, *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 635-692 (1996).
3. L. Stewart, M.R. Redinbo, X. Qui, W.G.J. Hol, J.J. Champoux, *Science*, **279**, 1535-1540 (1998).
4. J.M. Berger, S.J. Gamblin, S.C. Harrison, J.C. Wang, *Nature*, **379**, 225-232 (1996).
5. J.L. Nitiss, W.T. Beck, *Eur. J. Cancer*, **32A**, 958-966 (1996).
6. Z. Topcu, *J. Clin. Pharm. Therap.*, **26**, 405-416 (2001).
7. S. Moro , G.L. Beretta , D. Dal Ben , J. Nitiss , M. Palumbo, G. Capranico, *Biochemistry*, **43**, 7503-7513 (2004).
8. F. Meggio, M.A. Pagano, S. Moro, G. Zagotto, M. Ruzzene, S. Sarno, G. Cozza, J. Bain, M. Elliott, A. A.D. Deana, A.M. Brunati and L. Pinna, *Biochem.*, **43**, 12931-12936 (2004).
9. D.W. Litchfield, *Biochem J.*, **369**, 1-15 (2003).
10. S. Sarno, S. Moro, F. Meggio, G. Zagotto, D. Dal Ben, P. Ghibellini, R. Battistutta, G. Zanotti, L.A. Pinna, *Pharmacol. Ther.*, **93**, 159-168 (2002).
11. K. Ahmed, D.A. Gerber, C. Cochet, *Trends in Cell Biology*, **12**, (2002).
12. G. Unger, A. Davis, J.W. Slaton, K. Ahmed, *Curr. Cancer Drug Targets*, **4**, 77-84 (2004).
13. a) K. Bojanowski, O. Filhol, C. Cochet, E.M. Chambaz, A.K. Larsen, *J. Biol. Chem.*, **268**, 30, 22920-22926 (2003), b) N.J. Wells, C.M. Addison, A.M. Fry, R. Ganapathi, I.D. Hickson, *J. Biol. Chem.*, **269**, 47, 29746-29751 (1994).
14. H. Yim, Y.H. Lee, C.H. Lee, S.K. Lee, *Planta Med.*, **65**, 9-13 (1999).
15. S. Sarno, H. Reddy, F. Meggio, M. Ruzzene, S.P. Davies, A. Donella-Deana, D. Shugar, L.A. Pinna, *FEBS Letters*, **496**, 44-48 (2001).
16. R. Battistutta, E. De Moliner, S. Sarno, G. Zanotti, L.A. Pinna, *Protein Sci.*, **10**, 2200-2206 (2001).



17. a) C.O.Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 6250-6284 (2004), b) C.O.Kappe, A. Stadler, *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*, 2005, c) B. Wathey, J. thierney, P. Lindstrom, J. Westman, *Drug discovery Today*, **7**, 373-380 (2002).
18. S.T. Brennan, N.L. Colbry, R.L. Leeds, B. Leja, S.R. Priebe, M.D. Reilj, H.D. Hollis Showalter, S.E. Uhlenford, *J. Heterocyclic Chem.*, **26**, 1469-1476 (1989).
19. a) A. Chilin, G. Marzaro, S. Zanatta, V. Barbieri, G. Pastorini, P. Manzini, A. Guiotto, *Tetrahedron*, **62**, 12351-12356 (2006). b) G. Marzaro, A. Chilin, G. Pastorini, A. Guiotto, *Org. Lett.*, **8**, 255-256 (2006).
20. V. Barbieri, Tesi di Dottorato in Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Padova (2006).
21. A. Chilin, P. Rodighiero, G. Pastorini, G. Pastorini, A. Guiotto, *Org. Chem.*, **56**, 3, 980-983 (1991).
22. Adriana Chilin, Roberto Battistutta, Andrea Bortolato, Giorgio Cozza, Samuele Zanatta, Giorgia Poletto, Giuseppe Zagotto, Eugenio Uriarte, Adriano Guiotto, Lorenzo A. Pinna, Flavio Meggio and Stefano Moro, *J. Med. Chem*, *accepted* (2007).
23. G. Zagotto, O. Gia, F. Baccichetti, E. Uriarte, M. Palumbo, *Photochem. Photobiol.*, **58**, 4, 486-491 (1993).
24. Y. Takeuchi, L. Xie. L.M. Casentino, K.H. Lie, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 20, 2573-2578 (1997).
25. U. Luning, M. Abbass, F. Fahrenkrug, *Eur. J. Org. Chem.*, **19**, 3294-3303 (2002).
26. D.T. Vistica, P. Skehan, D.A. Scudiero, A. Monks, A. Pittman, M.R. Boyd, *Cancer Res.*, **51**, 2515 (1991).