SYNTHESIS

IL FARMACO E LA SUA CHIMICA

4

Direttore

Antonio Carta
Università di Sassari

Comitato scientifico

Daniela Barlocco
Università degli studi di Milano

Elisabetta Gavini
Università degli studi di Sassari

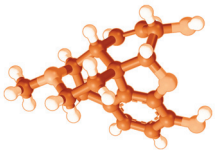
Sabrina Pricl
Università degli studi di Trieste

Gabriele Murineddu
Università degli studi di Sassari

Alessandra Peana
Università degli studi di Sassari

SYNTHESIS

IL FARMACO E LA SUA CHIMICA



La morfina è stata inventata per permettere ai medici di dormire tranquilli.

Sacha Guitry

La collana nasce con una vocazione interdisciplinare: pur essendo il farmaco il suo fulcro e la Chimica Farmaceutica la disciplina principale di riferimento, gli argomenti trattati spaziano trasversalmente, coinvolgendo altre fondamentali materie quali la Tecnica Farmaceutica, la Farmacologia, la Bioinformatica e la Biochimica che contribuiscono attivamente al raggiungimento dell'obiettivo. Nell'intento di coadiuvare i tre principali aspetti di una disciplina scientifica: divulgazione, didattica e approfondimento scientifico, la collana accoglie volumi che documentano tali aspetti. In particolare, ospita sia monografie che raccolte di argomenti indirizzati a studenti, colleghi e a un più vasto pubblico, sino ad arrivare a testi rivolti a dottorandi e specializzandi.

Luca Costantino
Daniela Barlocco

Laboratorio di preparazione estrattiva e sintetica dei farmaci

Prefazione di
Antonio Carta

Aracne editrice

www.aracneeditrice.it
info@aracneeditrice.it

Copyright © MMXVII
Gioacchino Onorati editore S.r.l. – unipersonale

www.gioacchinoonoratieditore.it
info@gioacchinoonoratieditore.it

via Vittorio Veneto, 20
00020 Canterano (RM)
(06) 45551463

ISBN 978-88-255-0653-2

I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica, di riproduzione e di adattamento anche parziale, con qualsiasi mezzo, sono riservati per tutti i Paesi.

Non sono assolutamente consentite le fotocopie senza il permesso scritto dell'Editore.

I edizione: settembre 2017

Indice

9 *Prefazione*
di Antonio Carta

11 *Introduzione*

13 Capitolo I
Procedure generali
1.1. Note introduttive, 13 – 1.2. Separazione di solidi da liquidi, 16 – 1.3. Cromatografia analitica su strato sottile (TLC), 18 – 1.3.1. *Esercitazione 1: separazione analitica di pigmenti vegetali mediante TLC*, 23 – 1.4. Estrazione con solventi, 24 – 1.4.1. Esercitazione 2. Uso dell'imbuto separatore, 25 – 1.5 Cromatografia su colonna, 27 – 1.6. Generazione del vuoto, 34 – 1.7 Riscaldamento e raffreddamento, 37 – 1.8. Purificazione di liquidi, 39 – 1.8.1. *Esercitazione 3. Distillazione del benzoato di metile*, 47 – 1.8.2. *Esercitazione 4. Distillazione semplice e frazionata di una miscela metanolo-acqua*, 48 – 1.9. Tecniche di agitazione, 48 – 1.10 Flow Chemistry, 49 – 1.11. Essiccamento di liquidi, gas e solidi, 52 – 1.12. Purificazione di solidi, 61 – 1.13. Aggiunta di liquidi e solidi a una miscela di reazione, 62 – 1.14. Estrattore di Soxhlet, 63.

67 Capitolo II
Sintesi di prodotti chimici
2.1. Parte generale, 67 – 2.1.1. *Quaderno di laboratorio*, 67 – 2.1.2. *Monitoraggio di una reazione*, 68 – 2.1.3. *Caratterizzazione di un prodotto*, 70 – 2.1.3.1. Punto di fusione, 70 –. 2.1.3.2. Analisi elementare, 71 – 2.1.3.3. Grado di purezza, 72 - 2.1.3.4. Potere rotatorio ed eccesso enantiomerico, 73 – .2.2. Esercitazione 5: Sintesi dell'aspirina, 75 – 2.3. Nitrazione, 78 – 2.4. Riduzione, 80 – 2.5. Esercitazione 6. Sintesi del: paracetamolo, 86 – 2.5.1. *Step 1*, 88 – 2.5.2. *Step 2*, 93 – 2.5.3 *Step 3*, 96 - 2.6. Esercitazione 7. Sintesi del propranololo, 97 – 2.6.1. *Step 1*, 98 – 2.6.2. *Step 2*, 101 – 2.7 Esterificazione, 106 – 2.7.1. *Esercitazione 8. Sintesi del benzoato di metile*, 106 – 2.8. Reattivi di Grignard, 108 – 2.8.1. *Esercitazione 9. Sintesi del trifenilmetanolo*, 109 – 2.8.1.1. Step 1, 109 – 2.8.1.2. Step 2, 111 – 2.9. Reazioni di Friedel-Crafts, 114 – 2.10. Disidratazione di alcoli terziari, 116 – 2.11. Alogenazione, 116 – 2.12. Acetali, 119 – 2.13. Reazioni di accoppiamento catalizzate da Pd, 121 – 2.13.1. *Reazione di Stille*, 121 – 2.14. Reazione di idroborazione/ossidazione degli alcheni, 123 – 2.15 Reazioni di bioconiugazione, 125.

127 Capitolo III
La sintesi di un prodotto nella letteratura
3.1. Estrarre informazioni da articoli scientifici, 127 – 3.1.1. *Sintesi di derivati 1,1,2-tris(4-metossifenil)etenici*, 128 – 3.1.2. *Sintesi di derivati dell'estradiolo*, 131 3.2. Approccio razionale alla sintesi di un prodotto, 136 – 3.3. Scale-up, 139.

145 Capitolo IV
Creazione di librerie di composti
4.1. Preparazione di ammidi in soluzione mediante carbodiimmidi, 145 – 4.2. Sintesi peptidica in fase solida 148 – 4.3. Chimica combinatoriale in soluzione e in fase solida, 160 – 4.3.1. Sintesi in parallelo in soluzione, 161 – 4.3.2. Sintesi in parallelo in fase solida, 163.

171 *Bibliografia*

177 *Sitografia*

Prefazione

di Antonio Carta[1]

Il libro di testo proposto dai Proff. Costantino e Barlocco è intitolato: *Laboratorio di preparazione estrattiva e sintetica dei farmaci*; titolo che rispecchia appieno sia i contenuti che l'obiettivo che si sono posti gli autori. Infatti come loro stessi affermano nell'introduzione: "Il testo è stato calibrato in modo da soddisfare le esigenze di un Corso di Laboratorio di Preparazione Estrattiva e Sintetica dei Farmaci per il Corso di Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche".

Personalmente credo che il risultato del loro sforzo espositivo vada ben oltre questo obiettivo. Il libro, o sue parti opportunamente selezionate, possono essere validamente utilizzate come supporto didattico anche all'interno di altri corsi nei quali si impiegano tecniche di sintesi, separazione, purificazione, rapida identificazione, ecc. di sostanze chimiche. Con la sola esclusione della sintesi, a meno che si tratti di semisintesi, anche nel caso di sostanze naturali. In particolare mi riferisco al corso di base di Biotecnologie o ad alcuni dei suoi corsi magistrali. Oltre che naturalmente al corso di laurea in Farmacia. I due autori hanno perfettamente descritto tutte le procedure, le precauzioni da prendere per preservare la sicurezza di studenti e ambienti, la strumentazione da utilizzare, le buone regole per la registrazione delle operazioni effett[1]uate e delle osservazioni da annotare, per portare a compimento una buona esercitazione di sintesi o di estrazione di molecole biologicamente attive. Inoltre l'intero testo è correlato da eccellenti ed efficaci illustrazioni di vetrerie e strumenti utilizzati. Il libro è anche arricchito di utili tabelle su caratteristiche chimico-fisiche di solventi, miscele refrigeranti, agenti disidratanti, catalizzatori e molto altro.

Non mancano, naturalmente, formule chimiche e schemi di reazione (compresi, quando utili, gli aspetti stechiometrici) di tutti i protocolli sintetici descritti e utilizzati come efficaci esempi didattici.

---

[1] Professore Associato presso il Dip.to di Chimica e Farmacia, Università di Sassari.

Una tale brillante esposizione non sorprende se consideriamo lo spessore scientifico dei due Autori che da molti anni si occupano di progettare, sintetizzare e valutarne l'attività biologica e le applicazioni farmaceutiche di nuovi composti appartenenti a differenti classi chimiche.

Pertanto sono fermamente convinto che questo nuovo testo che in maniera così coerente, precisa e chiara illustra il non semplice processo di "portare per mano" lo studente lungo il percorso di apprendimento delle procedure sintetiche ed estrattive di sostanze chimiche, avrà un largo e positivo riscontro presso i docenti e gli studenti delle nostre università.

Introduzione

Questo testo si propone di fornire le conoscenze per eseguire praticamente la sintesi di un prodotto (v. Figura) o la sua estrazione da materiale vegetale. Per realizzare questi processi occorre familiarizzarsi con varie metodiche generali, che andranno poi applicate ai singoli casi in base a ragionamenti appropriati. Il testo è stato calibrato in modo da soddisfare le esigenze di un Corso di Laboratorio di Preparazione Estrattiva e Sintetica dei Farmaci per il Corso di Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche, in cui la parte pratica è svolta contemporaneamente alla parte teorica, e le conoscenze pratiche ("di laboratorio") dello studente sono limitate.

Esistono banche dati (ad esempio SciFinder) che possono indirizzare a pubblicazioni che contengono la via di sintesi di un composto noto, oppure possono suggerire una strategia di sintesi di composti non noti, ma sono solo il giudizio e l'esperienza individuali

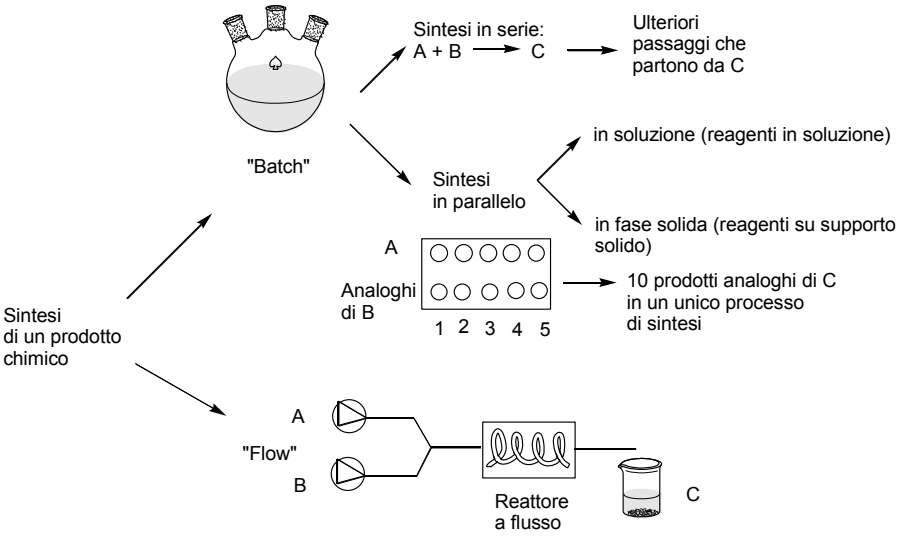


Figura. Approcci possibili per la sintesi di prodotti chimici: reazioni "Batch" e "Flow".

che hanno l'ultima parola, specialmente quando si tratta di sintetizzare o estrarre un prodotto ignoto (il caso più comune per chi fa ricerca).

Vari parametri (scala, disponibilità e prezzo dei prodotti di partenza, difficoltà di esecuzione della sintesi e rese attese) sono in grado di influenzare le strategie sintetiche e verranno quindi presi in considerazione per la scelta della via di sintesi. Il presente libro si occupa inizialmente, sia da un punto di vista teorico che pratico, di tecniche generali; quindi si passa alla descrizione ed esecuzione in laboratorio di sintesi di composti di interesse farmaceutico.

In particolare, verranno illustrati casi in cui l'ordine di aggiunta dei reattivi, la stechiometria o la presenza di altri composti (iniziatori, ecc.) possono modificare l'andamento di una reazione. Accanto alla procedura "classica" di sintesi, in cui si fa avvenire la reazione tra i composti A e B in un contenitore (pallone, reattore) per ottenere il prodotto C (sintesi in serie), verranno illustrate strategie innovative (Flow Chemistry) in cui la reazione viene condotta in tubi sottili, dove i reagenti fluiscono in continuo (v. Figura).

Per finire, verranno riportate tecniche di sintesi in parallelo (generazione di librerie di composti) in soluzione o in fase solida, e reazioni di bioconiugazione.

Capitolo I

Procedure generali

1.1. Note introduttive

Il Corso prevede che, accanto alla parte teorica, venga svolta una parte pratica in laboratorio. Le attività richiedono l'osservazione di varie regole.

L'uso del camice in cotone (perché brucia più lentamente di uno sintetico) e di occhiali di protezione sempre indossati; bisogna rimuovere le lenti a contatto prima di entrare in laboratorio. Per maneggiare le sostanze chimiche, usare guanti di protezione.

Tutte le sostanze chimiche devono essere maneggiate sotto cappa.

Tutte le bottiglie contenenti solventi e reagenti devono essere etichettate e chiuse (non "tappo appoggiato" ma "tappo avvitato").

Lo studente deve consultare le Schede di Sicurezza dei solventi e prodotti che dovrà manipolare, per rendersi conto del loro grado di pericolo e della loro gestione corretta. Occorrerà essere preparati in caso di bisogno per fronteggiare un imprevisto (rottura del contenitore, spandimento di polveri, ecc.).

Come procedura di sicurezza generale, in caso di contatto accidentale con un prodotto chimico, è essenziale per limitare i danni porre la parte colpita nel più breve tempo possibile sotto l'acqua corrente, quindi, solo successivamente, rimanendo sotto acqua corrente, si richiama l'attenzione dei compagni e dei docenti.

La vetreria va lavata con guanti per lavaggio (non quelli di protezione individuali, estremamente scivolosi se bagnati con acqua) subito dopo l'uso con acqua e detersivo. La vetreria non va quindi lasciata sporca per settimane sia perché lo sporco non viene più rimosso in modo efficace, sia perché le possibili esalazioni possono venire respirate. Essa va successivamente sciacquata con acqua deionizzata e quindi asciugata con acetone tecnico (un acetone non puro, più economico). Il solvente, come pure i residui di prodotti chimici vanno sempre raccolti in contenitori appositi destinati allo

smaltimento opportuno. Se necessario, come nel caso di reazioni da condurre in ambiente anidro, si asciuga la vetreria con phon oppure in stufa a 110°C (se non è vetreria tarata).

La vetreria da utilizzare in depressione deve essere priva di incrinature ("stelline") perché, lavorando in depressione, potrebbe verificarsi una implosione con proiezione di pezzi di vetro nell'ambiente circostante.

I rifiuti vanno smaltiti correttamente; rivolgiti al docente per il corretto smaltimento. Il vetro, anche se bonificato, va raccolto a parte. I frammenti di vetro non vanno mai gettati nei rifiuti comuni.

RICORDA: si aggiunge sempre l'acido solforico all'acqua per diluirlo, agitando con una bacchetta e raffreddando la soluzione con un bagno di ghiaccio esterno (la reazione di diluizione dell'acido solforico è estremamente esotermica). Le soluzioni di NaOH devono essere conservate chiuse con tappi di plastica, poiché gli smerigli di vetro si bloccano facilmente. I palloni non vanno mai riempiti per più di 1/3 del loro volume.

NOTA: se per qualche motivo lo studente non termina l'esperienza nell'orario previsto, deve, sentito il docente, accantonare il prodotto in lavorazione in modo sicuro ad uno stadio ben preciso per evitare reazioni collaterali o la decomposizione del prodotto, ed etichettarlo correttamente (non devono essere presenti in laboratorio recipienti contenenti prodotti non etichettati), quindi si termina l'esperienza la volta successiva, in modo autonomo e responsabile.

Quaderno di laboratorio: sua compilazione e cura. Il quaderno di laboratorio è fondamentale per annotare gli esperimenti effettuati che devono essere descritti nel modo più completo possibile per consentire a chi viene in futuro di poter agevolmente rifare l'esperimento. E' importante riportare anche gli esperimenti falliti: l'esame del quaderno può evitare di incorrere nello stesso errore. E' importante che in esso siano presenti, oltre a una descrizione di procedure e apparati, anche le osservazioni personali di come si presenta l'esperimento: ad esempio, se la miscela di reazione cambia di colore, svolge gas, si scalda oppure si forma un precipitato che poi si ridiscioglie, se la reazione si presenta come soluzione oppure sospensione. Per quanto riguarda i primi esperimenti (esperienze di laboratorio 1-4), lo studente dovrà fare una relazione scritta sul quaderno di laboratorio.

Regole di compilazione del quaderno di laboratorio:

a) Usare una penna.
b) Scrivere solo su un lato del foglio.
c) Non effettuare cancellature e non usare bianchetto. Se si commette un errore, tirare una riga sopra l'errore e scrivere la parte corretta a lato.
d) Non rimuovere nessuna pagina. Se l'intera pagina è sbagliata, tirare una riga di traverso e spiegare perché è sbagliata.
e) Cominciare una nuova pagina per ogni esperimento, anche se è fatto in giorni diversi (mettere la data sul pezzo aggiunto).
f) Scrivere il titolo dell'esperimento, la data e il numero progressivo al capo di ogni pagina.
g) Indicare se una pagina è la prosecuzione di una pagina precedente.
h) Scrivere tutti i dati, riportare le TLC con le relative didascalie chiare (natura del prodotto deposto, miscela eluente, ecc.). Non ci devono essere foglietti volanti in giro.
i) Non lasciare MAI uno spazio per aggiungere qualcosa in un secondo tempo.
j) Sii preciso e ordinato. Chi verrà dopo di te deve poter rifare l'esperimento seguendo quello che è riportato sul quaderno! Quindi si deve descrivere bene quello che succede perché chi legge il quaderno deve farsi una idea di quello che accadrebbe se rifacesse la reazione.
k) Descrivere la procedura e soprattutto le osservazioni personali.
l) Riportare l'aspetto, colore, odore e proprietà fisiche delle miscele oggetto di esperimento e dei prodotti.
m) Inserire schemi e disegni di apparati.
n) Descrivere le difficoltà incontrate.
o) Se si segue una procedura nota, inserire la bibliografia.

Modalità d'esame: La valutazione dell'esame terrà conto della corretta compilazione del quaderno di laboratorio (in base alla applicazione dei punti riportati nella parte relativa alle esercitazioni pratiche) per un 50%. Tale valutazione si basa anche sulla facilità di

comprensione di quanto riportato (chiarezza, ordine), come da esempio nel testo.

Lo studente deve venire all'esame con le bibliografie [24,25,31,32]. Consultando tali bibliografie, dovrà illustrare il modo di procedere per ottenere i prodotti ivi descritti.

1.2. Separazione di solidi da liquidi

La separazione di solidi da liquidi si esegue mediante filtrazione, che può essere eseguita per gravità o in depressione.

Filtrazione per gravità: se interessa recuperare il liquido, si usano filtri a pieghe in carta da filtrazione (v. Fig. 1.1) da posizionare su un semplice imbuto, oppure si usano coni di carta da filtro da posizionare su di un imbuto per filtrazioni veloci (superficie interna dell'imbuto non piana, in modo che, evitando il contatto della maggior parte della carta col vetro, la superficie filtrante sia grande, per cui il solvente è in grado di passare per gravità, senza dover creare una depressione a valle dell'imbuto).

Filtrazione in depressione: tecnica di filtrazione che si usa principalmente quando si vuole recuperare il solido. Sono disponibili imbuti Buckner in ceramica, imbuti normali con piastra di Hirsch e imbuti con setto di vetro poroso sinterizzato (v. Fig. 1.1). Il supporto

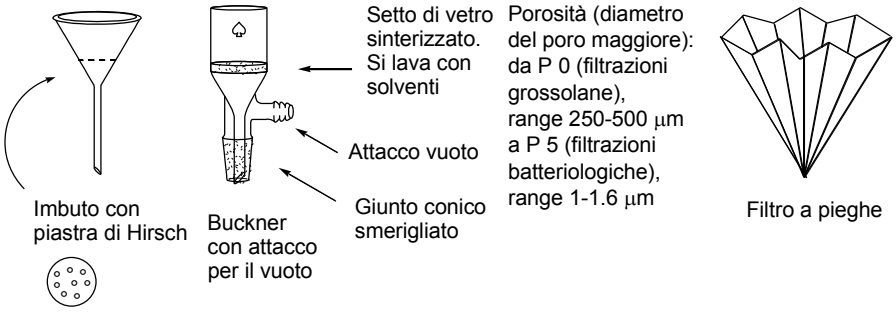


Figura 1.1. Strumenti di filtrazione.

deve essere ricoperto da carta da filtro, ritagliata a dimensione opportuna.

L'imbuto va poi montato su di una beuta da vuoto mediante anelli di gomma che ne assicurino la tenuta o con vetreria da vuoto con giunto smerigliato conico femmina, nel caso sia presente il cono maschio sull'imbuto. Il beccuccio laterale della beuta va quindi collegato a una linea da vuoto come descritto in Fig. 1.2 (generazione del vuoto: vedi avanti). La linea da vuoto dovrà contenere un rubinetto (sfiato) per consentire la rimozione del vuoto e il prelievo del contenuto dell'imbuto. Se la linea da vuoto è collegata ad una pompa rotativa ad olio, bisogna interporre tra l'apparato filtrante e la pompa trappole che sfruttano il freddo (v. Fig. 1.2) per evitare di inquinare l'olio della pompa.

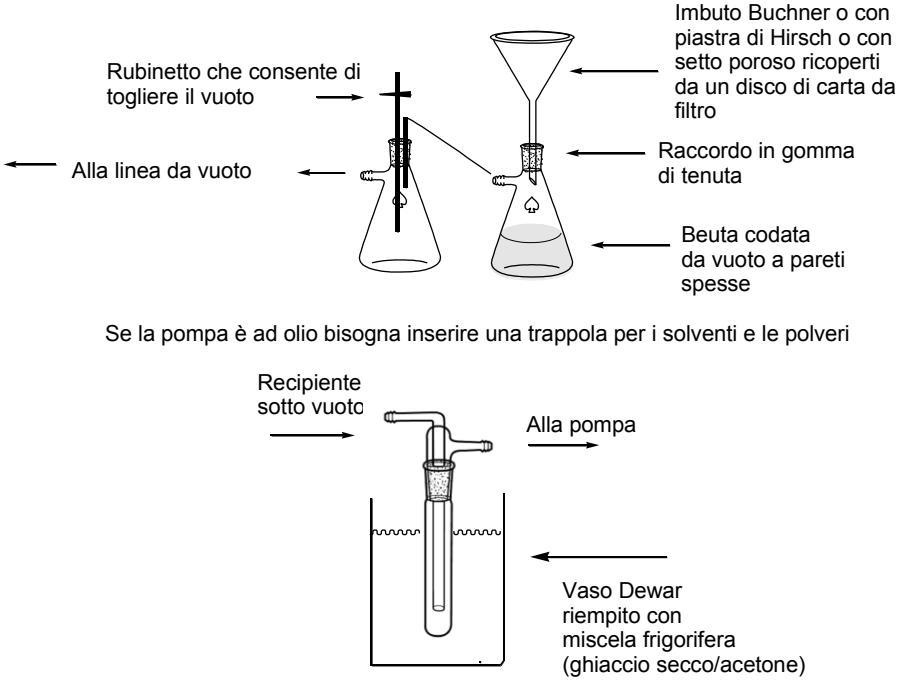


Figura 1.2 Settaggio della vetreria per filtrazione in depressione.

1.3. Cromatografia analitica su strato sottile (TLC)

La TLC è una tecnica analitica cromatografica che sfrutta la diversa capacità dei composti di interagire con una fase stazionaria mentre sono trascinati da una fase mobile (solvente o miscela di solventi solubili tra loro) che sale per capillarità.

Modo di operare (v. Fig. 1.3): si segna con una matita il punto di deposizione, si depone una piccola quantità di sostanza su di una fase stazionaria (lastrina) al di sopra del livello del solvente della camera, e la si immerge in un contenitore richiudibile (camera cromatografica) all'interno del quale è posta la fase mobile (eluente) che salirà per capillarità. *Perché una matita e non una penna?*

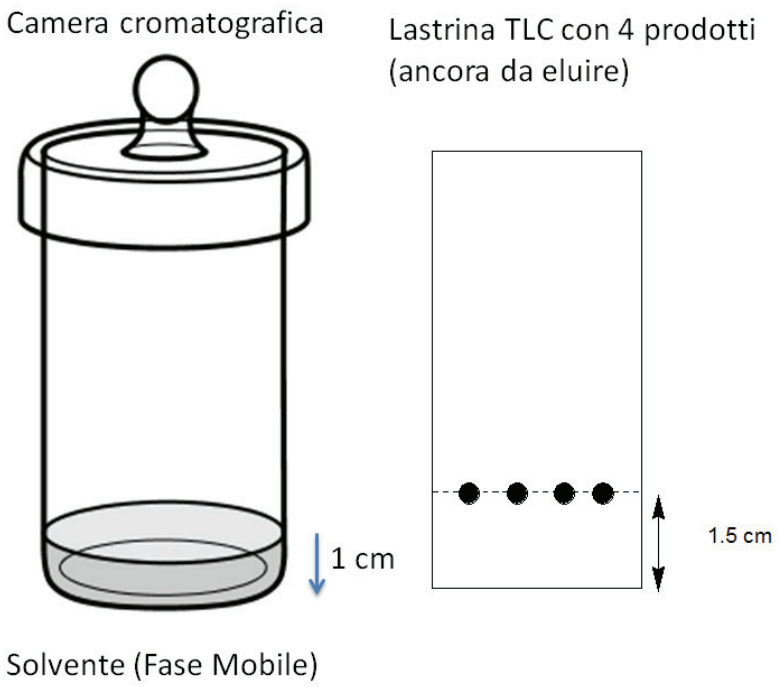


Figura1.3. Cromatografia su strato sottile (TLC).

Il contenitore deve essere saturo di vapori della fase mobile per cui la camera deve essere aperta il meno possibile e per brevissimi periodi di tempo. Le caratteristiche dei principali solventi sono riportate in Tabella 1.1.

Quale parametro caratterizza il composto? L'Rf, numero sempre minore di 1. Esso è il rapporto tra la distanza percorsa dal composto (centro della macchia) e la distanza percorsa dal fronte del solvente. A fine eluizione, si deve quindi segnare fin dove era arrivato il solvente.

Le tecniche cromatografiche sono di due tipi, in funzione della polarità della fase stazionaria e della fase mobile: fase Normale e fase Inversa.

Fase Normale: fase stazionaria più polare della fase mobile (ad esempio, gel di silice come fase stazionaria, e fase mobile costituita da solventi organici relativamente apolari).

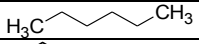
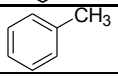
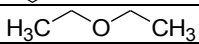
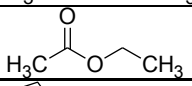
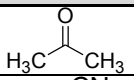
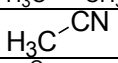
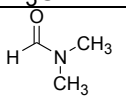
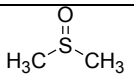
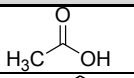
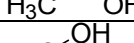
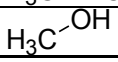
Fase Inversa: fase stazionaria meno polare della fase mobile (es. gel di silice che lega sulla superficie catene idrocarburiche, che costituiscono la reale fase stazionaria; fase mobile: solventi polari come acqua, alcoli, acetonitrile).

Se si vuole che un composto migri con un Rf maggiore in presenza di una fase normale (fase stazionaria piu' polare della fase mobile, caso del gel di silice che si utilizza più spesso in laboratorio) si deve aumentare la polarità della fase mobile. Questo comporta, se si ha come eluente una miscela di solventi, la necessità di aumentare la percentuale del solvente più polare. In presenza di una fase inversa, si deve invece diminuire la polarità della fase mobile (v. Tab. 1.1).

Che tipo di fase stazionaria si utilizza maggiormente in un laboratorio di sintesi (e che useremo in laboratorio per le TLC)? Il gel di silice (quindi, fase diretta), steso su un supporto inerte (nel nostro caso è un foglio di alluminio, ma può essere costituito da vetro o plastica).

Il gel di silice è una fase stazionaria polare e quindi richiede una fase mobile apolare (solventi organici) facilmente rimuovibili.

Tabella 1.1. Caratteristiche dei principali solventi organici. a): punto di ebollizione; b): polarità; c): densità; d): solubilità in acqua (p/p).

Solvente	**Struttura**	**P.eb. °C[a]**	**P.[b]**	**D.[c]**	**S. H_2O[d]**
Solventi apolari					
Esano		69	0.2	0.655	0.001
Cicloesano		81	0.3	0.655	0.01
Toluene		111	2.4	0.867	0.051
Etere etilico		35	2.8	0.713	6.89
Etile acetato		77	4.4	0.897	8.70
Tetraidrofurano		66	4.0	0.886	100
Diclorometano	CH_2Cl_2	40	3.1	1.326	1.600
Solventi polari aprotici					
Acetone		56	5.1	0.786	100
Acetonitrile		82	5.8	0.786	100
N,N-dimetilformammide (DMF)		153	6.4	0.944	100
Dimetilsolfossido (DMSO)		189	7.2	1.092	100
Solventi polari protici					
Acido acetico		118	6.2	1.049	100
Alcool etilico		79	5.2	0.789	100
Alcool metilico		65	5.1	0.791	100
Acqua	H_2O	100	9.0	0.998	100

Fase mobile (in fase normale o diretta): che solventi si possono usare? Solventi organici puri o miscele di solventi miscibili tra loro: