



Università
Ca'Foscari
Venezia

Dipartimento di Scienze Molecolari e Nanosistemi

Corso di laurea magistrale in Chimica e Tecnologie Sostenibili

Tesi di Laurea

Sintesi e caratterizzazione di steril-D-glucosidi altamente funzionalizzati

Relatore

Prof. Fabrizio Fabris

Correlatore

Dott. Borsato Giuseppe

Laureando

Tommaso Chinellato

Matricola 887157

Anno accademico

2025/2026

Abstract

I colesteril-D-glucosidi sono lipidi bioattivi il cui coinvolgimento nei meccanismi patologici delle malattie neurodegenerative è da tempo oggetto di studio e risulta di crescente interesse. Tuttavia, l'identificazione dei loro target proteici e la loro localizzazione all'interno dei neuroni rimangono sfide estremamente complesse. In questo lavoro di tesi viene presentata la sintesi stereoselettiva di una sonda molecolare bifunzionale basata sull'anomero beta del colesteril-D-glucosio, la quale verrà utilizzata per studiare il sito di interazione di questo glicolipide nei neuroni, grazie alla collaborazione con il dipartimento di Biologia dell'Università di Padova che si prefigge di indagare sul comportamento degli steril-D-glucosidi associati alle malattie neurodegenerative come Parkinson e SLA. La ricerca si pone l'obiettivo di funzionalizzare gli steril-D-glucosidi in posizione C6 del carboidrato con la 3-(but-3-in-1-il)-3-(2-iodoetil)-3H-diazirina, un linker contenente un gruppo diazirinico fotoattivabile e un alchino terminale. Questa doppia funzionalizzazione consente di identificare le proteine interagenti tramite *photoaffinity labelling*, sfruttando la generazione in situ di un intermedio carbenico altamente reattivo ed eseguendo successivamente un saggio di *pull-down*. Inoltre, l'alchino terminale permette di utilizzare la tecnica di *bioimaging* cellulare fluorescente accoppiando *in situ* all'alchino un fluoroforo tramite reazioni di *click chemistry*. La strategia sintetica ha previsto la protezione ortogonale del D-glucosio a partire dall'inserimento di un gruppo tritile in C6, seguito dalla benzoilazione delle restanti posizioni idrossiliche. La successiva deprotezione selettiva del carbonio anomero ha permesso la sintesi dell'intermedio tricloroacetimidato, rivelatosi un eccellente donatore per il *coupling* con il colesterolo, portando alla formazione dell'anomero beta con elevata stereoselettività. La successiva rimozione del gruppo tritile in C6 mediante acido trifluoroacetico (TFA) ha liberato l'ossidrile primario. Infine, la formazione dell'alcolato dello zucchero mediante l'utilizzo di sodio idruro (NaH) ha consentito la reazione di alchilazione con il derivato recante l'unità diazirino-alchinica, portando a termine la sintesi della sonda. Nel complesso, la via sintetica sviluppata permette la sintesi di sonde avanzate, fornendo un potente strumento chimico per mappare la localizzazione degli steril glucosidi nei neuroni e cercare di isolare e identificare la proteina con cui essi interagiscono,

aprendo nuove prospettive nello studio a livello molecolare delle patologie neurodegenerative.

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	1
1.1 I DISTURBI NEURODEGENERATIVI	1
1.2 GLI STERIL-D-GLUCOSIDI	4
1.3 BIOIMAGING MOLECOLARE	10
1.4 PHOTOAFFINITY LABELING	12
1.5 CONTROLLO DELLA STEREOSELETTIVITÀ NELLA SINTESI GLUCOSIDICA	15
1.6 I LAVORI DI TESI PRECEDENTI	20
2. SCOPO DELLA TESI.....	23
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	25
3.1 SINTESI DEL 1,2,3,4-TETRA-O-BENZOIL-6-O-TRITIL-D-GLUCOPIRANOSIO	25
3.2 SINTESI DI A- E B-2,3,4-TRI-O-BENZOIL-6-O-TRIFENILMETIL-D- GLUCOPIRANOSIO	30
3.3 SINTESI DI A-2,3,4-TRI-O-BENZOIL-6-O-TRIFENILMETIL-D-GLUCOPIRANOSIO TRICLOROACETIMMIDATO.....	34
3.4 SINTESI DI β -COLESTERIL-2,3,4-TRI-O-BENZOIL-6-O-TRIFENILMETIL-D- GLUCOPIRANOSIDE	37
3.5 SINTESI DI β -COLESTERIL- 2,3,4-TRI-O-BENZOIL-D-GLUCOPIRANOSIDE	41
3.6 SINTESI DI β -COLESTERIL-2,3,4-TRI-O-BENZOIL-6-O-3-(BUT-3-IN-1-IL)-3-(2- ETIL)-3H-DIAZIRINA-D-GLUCOPIRANOSIDE.....	44
3.7 SINTESI DI β -COLESTERIL-6-O-[3-(BUT-3-IN-1-IL)-3-(2-ETIL)-3H-DIAZIRINA]- D-GLUCOPIRANOSIDE	48
4. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE	52
5. PARTE SPERIMENTALE	54
5.1 METODI GENERALI	54
5.2 PROCEDURE SPERIMENTALI.....	55
6. BIBLIOGRAFIA.....	63
7. SPETTRI.....	71

Dichiarazione del ricorso a strumenti di Intelligenza Artificiale (IA)

Il sottoscritto Tommaso Chinellato, matricola numero 887157, iscritto presso Ca' Foscari al corso di Laurea magistrale in Chimica e Tecnologie sostenibili, autore della tesi di laurea "Sintesi e caratterizzazione di steril-glucosidi altamente funzionalizzati", relatore Fabrizio Fabris, consapevole delle sanzioni previste dall'art. 76 del Testo unico, D.P.R. 28/12/2000 n.445, e della decadenza dei benefici prevista dall'art. 75 del medesimo Testo unico in caso di dichiarazioni false o mendaci, sotto la propria personale responsabilità ai sensi degli artt. 46 e 47 del D.P.R. 28/12/2000 n. 445,

DICHIARA

di aver fatto ricorso a tecnologie di intelligenza artificiale generativa per supportare vari aspetti della ricerca e della scrittura della mia tesi di laurea, in particolare "Gemini Pro" è stato utilizzato per la ricerca di fonti bibliografiche, la revisione e l'ottimizzazione dei testi e la generazione della "Figura 10" (Capitolo "Introduzione"). Tutto il materiale è stato verificato attraverso la lettura delle fonti bibliografiche.

DICHIARA INOLTRE

che tutto il materiale generato dall'IA è stato attentamente verificato, rivisto e rielaborato dall'autore, che si assume la piena responsabilità per la qualità, l'accuratezza e l'integrità scientifica del lavoro

1. INTRODUZIONE

1.1 I disturbi neurodegenerativi

I disturbi neurodegenerativi costituiscono un gruppo ampio ed eterogeneo di patologie caratterizzate dalla progressiva e inesorabile perdita di struttura e funzione dei neuroni, le cellule fondamentali del sistema nervoso.¹ Questo processo di degenerazione cellulare, spesso innescato o accompagnato dall'accumulo di proteine anomale, stress ossidativo e disfunzioni degli organelli intracellulari (come i lisosomi), porta a un graduale declino delle capacità cognitive e motorie.^{2,3} Tra le malattie neurodegenerative più note e con il maggiore impatto sociosanitario figurano la malattia di Alzheimer, la malattia di Huntington, la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e il morbo di Parkinson⁴. Comprendere i complessi meccanismi molecolari, genetici e ambientali alla base di queste patologie rappresenta oggi una delle più grandi sfide della medicina moderna⁵.

Il morbo di Parkinson (PD) si distingue come uno dei disturbi neurodegenerativi progressivi e debilitanti più diffusi a livello globale. La prima descrizione clinica della patologia fu fornita da James Parkinson nel 1817 nel saggio "An Essay on the Shaking Palsy", dove venne definita "paralisi agitante".⁶ Oggi, oltre 10 milioni di persone nel mondo convivono con questa malattia; soltanto negli Stati Uniti i pazienti affetti sono circa un milione, con 60.000 nuovi casi diagnosticati ogni anno.⁷ Sebbene la causa scatenante rimanga sconosciuta, si ritiene che l'insorgenza sia dettata da una combinazione di fattori ambientali (la dieta, i farmaci e l'esposizione a sostanze tossiche), fattori di rischio anagrafici e di genere (maggiore prevalenza maschile e a partire da 60 anni) e predisposizione genetica.⁸ Nel tentativo di chiarire la patogenesi del Parkinson, la ricerca ha recentemente fatto passi da gigante nell'identificazione di specifici determinanti genetici, che si ritiene essere responsabili per il 5-10% dei casi, evidenziando in particolare il ruolo cruciale delle disfunzioni lisosomiali.⁹ Molteplici studi hanno dimostrato una forte associazione tra il parkinsonismo e le mutazioni nel gene GBA, che codifica per l'enzima lisosomiale glucocerebrosidasi.¹⁰ Questo enzima risulta carente nella malattia di Gaucher, un raro disturbo da accumulo lisosomiale.¹¹ A livello genetico, sono state identificate quasi 300

diverse mutazioni del gene GBA.¹² Fisiopatologicamente, la malattia è caratterizzata da una ridotta attività dopaminergica, causata dalla degradazione dei neuroni del mesencefalo, specificamente nella substantia nigra.¹³ La degenerazione di questi neuroni e il conseguente abbassamento dei livelli di dopamina provocano un'attività cerebrale anormale che si traduce in un quadro sintomatologico complesso e impattante. I sintomi motori tipici includono tremori, rigidità, bradicinesia, postura instabile e una caratteristica andatura strascicata.¹⁴ A questi si sommano sintomi non motori che inficiano profondamente la qualità della vita, quali disturbi dell'umore e cognitivi (ansia, depressione), disfunzioni autonome (incontinenza, costipazione, disfagia, ipotensione ortostatica) e disturbi del sonno.¹⁵ Non conoscendo esattamente le cause della PD i rimedi ed i trattamenti proposti si concentrano principalmente sull'alleviare i sintomi della stessa: il principale trattamento per la patologia attualmente in uso è la somministrazione di Levodopa (Figura 1), l'isomero levogiro presente in natura della diidrossifenilalanina, un amminoacido in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e successivamente venire convertita in dopamina attraverso una decarbossilazione catalizzata dall'enzima L-dopa decarbossilasi presente nei neuroni dopaminergici.¹⁶

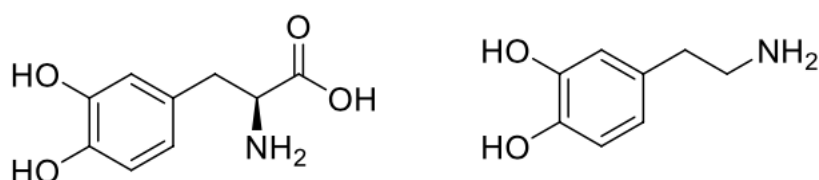


Figura 1: Struttura chimica di L-dopa (sx) e della dopamina (dx).

Un modello di studio fondamentale per indagare l'intricata eziologia di queste patologie è il complesso sclerosi laterale amiotrofica/parkinsonismo-demenza (SLA/PDC).¹⁷ Si tratta di una sindrome neurodegenerativa fatale riscontrata storicamente in popolazioni specifiche, in particolare nel popolo Chamorro dell'isola di Guam, in alcune famiglie giapponesi della penisola di Kii e nelle popolazioni Auyu e Jakai della Nuova Guinea.¹⁸ Dal punto di vista neuropatologico, la malattia è caratterizzata dalla presenza di ammassi neurofibrillari (NFT)

nel cervello e nel midollo spinale.¹⁹ A livello clinico, il PDC condivide diverse caratteristiche con il morbo di Parkinson, distinguendosi tuttavia per una forma di demenza precoce e progressiva.¹⁷ L'epidemiologia di questa sindrome a Guam ha mostrato tendenze storiche peculiari: dopo un picco di incidenza negli anni '50, i tassi hanno subito variazioni che suggeriscono l'influenza di fattori ambientali mutevoli unitamente a fattori genetici²⁰. Risulta da tempo oggetto di studio la sospetta incidenza da parte di una categoria di molecole note come steril-D-glucosidi (**SG**), contenute nella farina prodotta dai semi della pianta *Cycas micronesica*, la quale si pone alla base delle loro abitudini alimentari.²¹ Esiste un recente caso di studio che riporta una correlazione tra la manifestazione della ALS-PDC (Amyotrophic Lateral Sclerosis - Parkinson - Dementia Complex), e l'accumulo all'interno del Sistema Nervoso Centrale (SNC) di **SG**.²² Testando l'attività neurologica in laboratorio *in vivo* su delle cavie nutrite con i semi della pianta, è stata osservata l'insorgenza di sintomi attribuibili ad una forma di sclerosi e/o parkinsonismo e sono stati isolati tre diversi steril- β -D-glucosidi (**β -SG**) che potrebbero essere correlati ai sintomi manifestati (Figura 2).

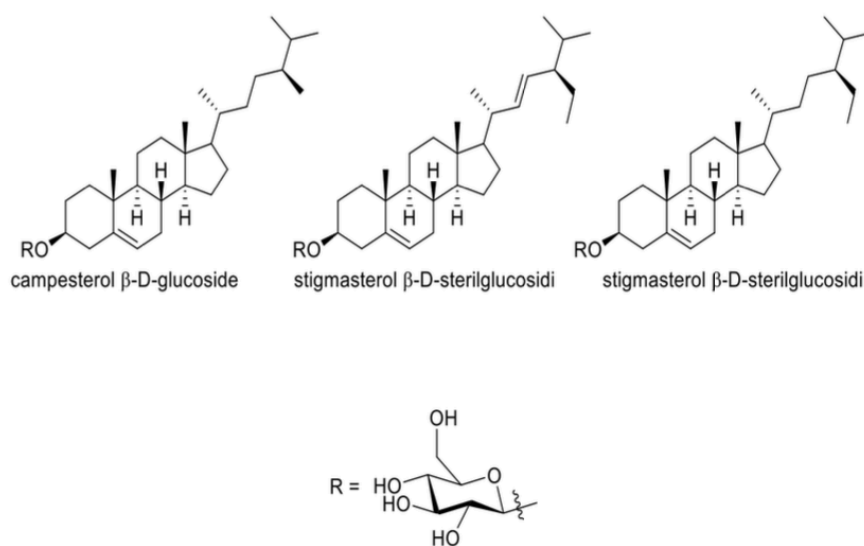


Figura 2: Strutture chimiche dei β -SG isolati dai semi della pianta *Cycas micronesica*.

Inoltre, numerosi studi in vitro hanno utilizzato **SG** isolati dai semi di *chicas* e hanno dimostrato che molti di questi sono neurotossici, in particolare, un certo numero di glucosidi di fitosterolo insolubili in acqua, tra i quali il β -sitosterolo-D-glucoside (**BSSG**) costituisce la frazione più grande.²³

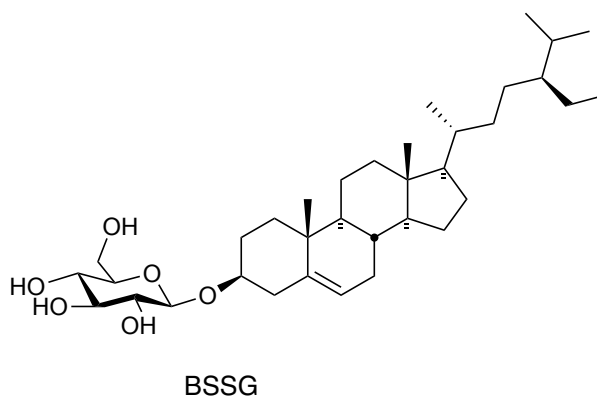


Figura 3: Struttura chimica del β -sitosterolo-D-glucoside (BSSG).

In conclusione, l'indagine di specifiche disfunzioni genetiche e lisosomiali, unita allo studio di modelli epidemiologici complessi come la SLA/PDC, rappresenta una chiave di lettura fondamentale per decifrare i meccanismi patogenetici dei disturbi neurodegenerativi. Questa integrazione di conoscenze offre prospettive inedite non solo per una comprensione più profonda della malattia di Parkinson, ma anche per lo sviluppo futuro di terapie mirate e strategie di intervento sempre più efficaci.

1.2 Gli steril-D-glucosidi

Gli **SG** rappresentano una classe fondamentale di glicolipidi costituiti dall'unione covalente di una molecola di sterolo con un residuo zuccherino. Dal punto di vista strutturale, il legame O-glicosidico si instaura tra il gruppo ossidrilico in posizione C3 dello sterolo e la porzione anomERICA C1 del D-glucosio portando a una configurazione O-(1'→3)- α - or β -.²⁴ In natura, queste molecole si riscontrano sia in forma libera sia in forma acilata, in cui l'ossidrile in posizione C-6 del residuo glicosilico risulta esterificato con una catena acilica.²⁵ Negli organismi vegetali, nelle alghe e nei funghi, i glucosidi sterolici sono stati storicamente caratterizzati come componenti abbondanti e strutturali delle membrane cellulari.²⁶ A livello cellulare, l'inserimento della componente glucosilica altera l'impaccamento lipidico, la

fluidità e la permeabilità delle membrane plasmatiche, svolgendo una funzione protettiva essenziale nella risposta agli stress abiotici, inclusi gli sbalzi termici e i processi di congelamento.²⁷ Sebbene per lungo tempo i glucosidi sterolici siano stati ritenuti un'esclusiva dei regni vegetale e fungino, evidenze sperimentali hanno dimostrato la presenza naturale di colesteril-glucoside (**CG**) anche nei tessuti dei mammiferi e nel plasma umano.²⁸ La conversione del colesterolo in **CG** comporta una significativa modifica delle sue proprietà chimico-fisiche, trasformando una molecola fortemente idrofobica in un composto anfifilico in grado di riorganizzarsi nella membrana plasmatica cellulare.²⁹ Negli organismi superiori, la produzione endogena di **CG** viene marcatamente indotta da eventi di stress cellulare, come lo shock termico.³⁰ Inoltre, i glucosidi sterolici assumono un ruolo rilevante nella modulazione della risposta immunitaria, agendo come molecole di segnalazione in grado di attivare recettori dell'immunità innata o di innescare e regolare cascate infiammatorie.³¹

1.2.1 Biosintesi e presenza negli organismi viventi

La biosintesi dei **SG** e dei loro derivati acilati nei tessuti vegetali rappresenta una via metabolica che avviene sul lato citosolico delle membrane cellulari, dove è guidata dal trasferimento diretto di un'unità di D-glucosio da una molecola donatrice idrosolubile, l'uridin-difosfato glucosio (UDP-glucosio), al gruppo ossidrilico libero in posizione C3-OH dei principali fitosteroli di membrana, tra cui il β -sitosterolo, lo stigmasterolo e il campesterolo, mediante l'azione catalitica delle sterolo glucosiltrasferasi (SGT).³² A differenza del regno vegetale, i mammiferi non possiedono enzimi omologhi alle SGT né utilizzano direttamente l'UDP-glucosio come donatore di zucchero per glicosilare gli steroli, ma articolano la biosintesi endogena del β -colesteril-D-glucoside (**β -CG**) attraverso un peculiare meccanismo di transglicosilazione reversibile in cui il glucosilceramide agisce come donatore del gruppo glucosilico e il colesterolo libero funge da accettore.²⁸ Questa reazione catalitica è finemente coordinata da due distinte β -glucosidasi cellulari: la glucocerebrosidasi lisosomiale (GBA1), che opera all'interno del compartimento endolisosomiale acido e catalizza la transglicosilazione prevalentemente in condizioni di accumulo patologico di substrato o durante il turnover lipidico³³, e la β -glucosidasi citosolica (GBA2), ancorata alla superficie citosolica del reticolo endoplasmatico e

dell'apparato di Golgi, responsabile della produzione costitutiva di **β -CG** in condizioni fisiologiche e in risposta a stimoli di stress cellulare.³⁴

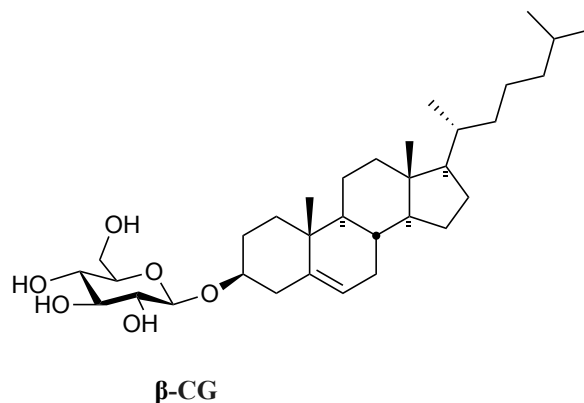


Figura 4: Struttura chimica del β -colesteril-D-glucoside (β -CG).

Oltre alla via endogena, nei mammiferi si riscontrano glucosidi sterolici di origine esogena e batterica. In particolare, l' α -colesteril-D-glucoside (**α -CG**) è sintetizzato dal batterio patogeno *Helicobacter pylori*, noto per colonizzare la mucosa gastrica umana e fortemente implicato nell'insorgenza di gastriti croniche, ulcere peptiche e adenocarcinoma gastrico.³⁵

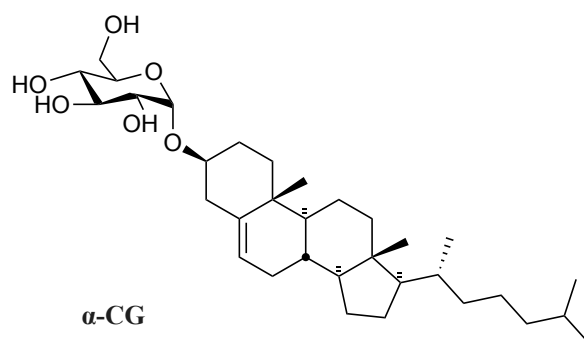


Figura 5: Struttura chimica del α -colesteril-D-glucoside (α -CG).

Poiché *H. pylori* è privo del corredo enzimatico per la sintesi degli steroli, esso estrae il colesterolo direttamente dalle membrane dell'ospite e lo modifica tramite l'enzima colesterolo- α -glucosiltransferasi, il quale trasferisce un residuo di α -D-glucosio sul colesterolo per produrre α -CG, una modificazione essenziale che permette al batterio di integrarsi nei *lipid rafts* dell'ospite, eludere il riconoscimento da parte dei macrofagi e neutralizzare la risposta immunitaria.³⁶

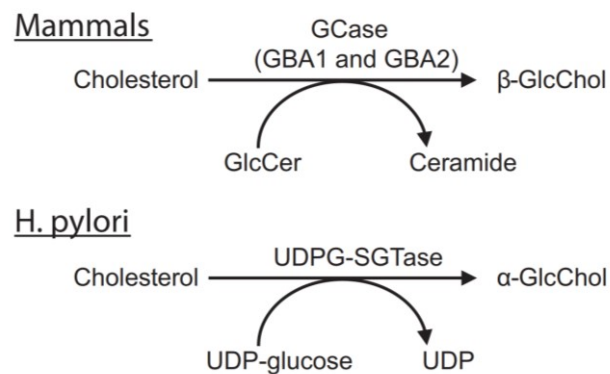


Figura 6: Schema della via sintetica dei SG nei mammiferi e nell' *H. pylori*.

1.2.2 Ruolo nei disturbi neurodegenerativi

L'alterazione funzionale dei geni GBA1 e GBA2 compromette profondamente l'omeostasi lipidica cellulare, perturbando il delicato equilibrio tra il glucosilceramide (GlcCer) e il β -CG²⁸. Tale discontrollo metabolico gioca un ruolo patogenetico centrale in diverse patologie neurodegenerative³⁰. In particolare, le mutazioni a carico del gene GBA1, codificante per l'enzima lisosomiale glucocerebrosidasi 1, sono tradizionalmente note come causa della malattia da accumulo lisosomiale di Gaucher (GD) e rappresentano oggi il principale fattore di rischio genetico per lo sviluppo del morbo di Parkinson (PD) e di altre sinucleinopatie³⁷. In questi contesti, l'accumulo incontrollato di β -SG o l'alterazione della loro via sintetica sembrano promuovere la neurotossicità, favorendo i processi di *misfolding* e l'aggregazione patologica dell' α -sinucleina.³⁸ Parallelamente, le mutazioni nel gene GBA2, che codifica per la glucocerebrosidasi non lisosomiale, sono responsabili di una forma di paraplegia spastica ereditaria (HSP) associata ad atassia.³⁹ In entrambi i disordini, sia nei modelli animali sia nei

tessuti dei pazienti, è stato riscontrato un significativo sovvertimento dei livelli fisiologici di β -CG.²⁸

L'impatto patogenetico dei β -SG non si limita tuttavia ai soli meccanismi endogeni, ma trova un riscontro cruciale anche nell'esposizione a composti esogeni strutturalmente analoghi.²¹ Un esempio emblematico è rappresentato dal **BSSG**, un fitosterolo la cui struttura molecolare rispecchia fedelmente quella del β -CG.²² Il BSSG è ampiamente presente nei semi della pianta *Cycas micronesica*, storicamente compresi nella dieta della popolazione autoctona Chamorro dell'arcipelago di Guam, dove è stata documentata un'incidenza insolitamente elevata di una complessa patologia neurodegenerativa nota come complesso sclerosi laterale amiotrofica-parkinsonismo-demenza (ALS-PDC).²² In vivo, la somministrazione orale di **BSSG** (1.000 μ g/giorno per 15 settimane) nei topi CD-1 ha determinato un incremento dei livelli sierici di SG (+66%), accompagnato da evidenti deficit motori ed esplorativi, da una perdita del 35% dei motoneuroni spinali lombari e da un'intensa astrogliosi reattiva (GFAP +82%) con contestuale riduzione del trasportatore del glutammato GLT-1B e compromissione della via dopaminergica.²³ Parallelamente, il trattamento con dosi variabili (10–1.000 μ g/giorno per 10 settimane) ha comportato una perdita di motoneuroni progressiva e autosostenuta che è proseguita fino a 22 settimane dalla sospensione della dieta tossica, pur in assenza di sintomi motori immediatamente visibili.⁴⁰ Questo dato evidenzia come il BSSG inneschi una cascata neurodegenerativa latente i cui deficit clinici affiorano solo al superamento di una soglia critica di danno cellulare. Nel loro insieme, tali evidenze dimostrano la capacità del **BSSG** di riprodurre isolatamente le alterazioni dell'ALS-PDC, avvalorando l'ipotesi che l'esposizione agli **SG**, sia di origine dietetica e ambientale, sia derivanti da sintesi cellulare endogena in risposta allo stress, svolga un ruolo primario nell'insorgenza delle patologie neurodegenerative.⁴¹

Un ulteriore studio ha approfondito il coinvolgimento dell'asse gastrointestinale nella fase d'innescio delle patologie degenerative. Le indagini condotte *in vivo* su modelli di *zebrafish* e di topo hanno rivelato che l'esposizione al BSSG determina innanzitutto una severa risposta infiammatoria a livello enterico.⁴² Fisiologicamente, il trattamento con **BSSG** induce una marcata dismotilità intestinale, un ritardo significativo nel transito gastrointestinale, ipercontrattilità della muscolatura liscia ed ipereccitabilità colinergica *ex vivo*,

accompagnate da una profonda ristrutturazione della composizione del microbiota indicativa di un quadro di disbiosi. Dal punto di vista molecolare e meccanicistico, è stato dimostrato che il **BSSG** interagisce direttamente con il recettore dei glucocorticoidi (GR), compromettendone la canonica attività antinfiammatoria e la traslocazione nucleare.⁴² Nel loro insieme, questi dati provano per la prima volta che l'assunzione dietetica di **BSSG** causa primariamente una disfunzione e un'infiammazione intestinale mediate dall'interferenza con la segnalazione del GR, identificando nella compromissione dell'omeostasi enterica e dell'asse intestino-cervello un evento patogenetico precoce e pre-sintomatico, in grado di innescare e predisporre alla successiva neurodegenerazione centrale.

Per quanto riguarda **α -GC**, una causa di accumulo è rappresentata dall'infezione da *Helicobacter pylori*, patogeno primariamente responsabile dell'insorgenza di gastriti, ulcere peptiche e neoplasie gastriche.⁴³ Recenti indagini epidemiologiche hanno evidenziato una correlazione tra l'infezione da *H. pylori* e la malattia di Parkinson, oltre ad altre patologie di natura neurologica, cardiovascolare, ematologica e dermatologica; nello specifico, è stato osservato che i pazienti affetti da Parkinson presentano una probabilità circa tre volte maggiore di risultare sieropositivi al batterio.⁴⁴ Poiché *H. pylori* è auxotrofo per il colesterolo, esso è costretto ad acquisire tale sterolo dalle cellule della mucosa gastrica dell'ospite, sintetizzando successivamente **α -GC** come fondamentale meccanismo di evasione dalla risposta immunitaria.³⁶ Dal punto di vista biochimico, la sintesi procede attraverso una reazione di trans-glucosilazione catalizzata dall'enzima UDP-glucosio steril glucosiltransferasi (UDPG-SGTase), il quale impiega l'uridina difosfato glucosio (UDP-glucosio) come donatore.³⁵ Oltre a indurre l'accumulo di **SG**, l'infezione da *H. pylori* compromette l'efficacia terapeutica di L-DOPA, il farmaco d'elezione per il controllo sintomatologico del Parkinson, a causa di un'interferenza con l'assorbimento sistemico del principio attivo a livello gastroduodenale, i cui precisi meccanismi molecolari e fisiologici rimangono tuttora oggetto di approfondita indagine.⁴⁵

In conclusione, nonostante gli studi abbiano permesso di ampliare drasticamente le conoscenze riguardanti gli **SG**, la comprensione di questi glicolipidi presenta ancora significativi margini di incertezza. Per esempio, i meccanismi molecolari attraverso cui **β -GC** viene trasportato, trafficato e compartimentalizzato nei diversi distretti neuronali, così

come la sua precisa funzione fisiologica e il suo ruolo nell'omeostasi cellulare del sistema nervoso centrale e periferico, rimangono tuttora in gran parte sconosciuti.²⁸

1.3 Bioimaging molecolare

L'imaging molecolare (o bioimaging molecolare) è una tecnica di analisi non invasiva che consente l'osservazione ripetuta nel tempo delle macromolecole e dei processi biologici in cui queste sono coinvolte. Tale approccio richiede l'impiego di sonde molecolari, ovvero specifiche molecole la cui concentrazione o le cui proprietà spettrali subiscono un'alterazione in risposta al processo biologico in esame. Tipicamente, queste sonde sono costituite da fluorofori che emettono nel campo del visibile o del vicino infrarosso, oppure da composti marcati con radioisotopi.

Negli studi di imaging molecolare, le sonde si suddividono principalmente in due categorie: le sonde a legame diretto, le quali riflettono la concentrazione locale di un bersaglio molecolare specifico, e le sonde indirette, volte a misurarne l'attività metabolica o enzimatica⁴⁶. Un esempio significativo di sonda a legame diretto è costituito dagli analoghi della dopamina emettitori di positroni, come il 3-(2-[¹⁸F]fluoroetil)spiperone ([¹⁸F]FESP), ampiamente impiegati per la mappatura e il monitoraggio dei recettori dopaminergici D₂ a livello dello striato⁴⁷. Al contrario, un classico esempio di sonda indiretta, comunemente utilizzata nelle indagini neurologiche, cardiovascolari e oncologiche, è il 2-[¹⁸F]fluoro-2-deossi-D-glucosio ([¹⁸F]FDG)⁴⁸. Una volta introdotta all'interno della cellula, questa molecola viene fosforilata dall'enzima esochinasi; tuttavia, poiché il gruppo ossidrilico in posizione C-2 è sostituito dal radioisotopo Fluoro-18, il composto fosforilato non può proseguire lungo la via glicolitica e rimane intrappolato nel citoplasma⁴⁹. Il decadimento per emissione di positroni del Fluoro-18 genera il segnale radiologico rilevabile tramite PET, consentendo di quantificare direttamente l'attività dell'esochinasi e il tasso di metabolismo glucidico della cellula: quanto più una cellula è metabolicamente attiva, tanto maggiore sarà il suo accumulo di glucosio e, di conseguenza, di [¹⁸F]FDG.⁵⁰

Al fine di studiare la localizzazione del β -GC nei tessuti animali e per indagare sui potenziali effetti e meccanismi d'azione nelle malattie neurodegenerative, risulta fondamentale la funzionalizzazione di queste molecole mediante l'inserimento di gruppi che possano legarsi

a un fluoroforo direttamente nella cellula. Utilizzando un approccio derivante dalla *click chemistry*, è possibile rilevare in modo specifico dei biomarcatori modificati contenenti gruppi azidici o alchini terminali⁵¹. Sfruttando questa metodologia, sono state sintetizzate delle sonde molecolari di **SG** recanti un alchino terminale sulla catena in posizione 17 dell'unità sterolica, la quale può essere funzionalizzata con diversi fluorofori azidici disponibili in commercio. Questo approccio ha permesso di testare i composti bersaglio direttamente nelle cellule neuronali, evitando di alterare le proprietà fisiche della molecola attraverso eventuali funzionalizzazioni preliminari.⁵²

Un approccio versatile e altamente selettivo per coniugare queste sonde alle molecole target sfrutta la reazione di cicloaddizione 1,3-dipolare. In particolare, la cicloaddizione azide-alchino catalizzata da Cu(I) (CuAAC) rappresenta un esempio paradigmatico delle reazioni di Click Chemistry⁵³ (Figura 7). La reazione CuAAC procede a temperatura ambiente e in maniera rigorosamente regiospecifica, portando alla formazione di un anello eterociclico 1,2,3-triazolo 1,4-disostituito con rese elevate. Al contrario, la medesima reazione condotta in assenza di catalizzatore richiede alte temperature e genera tipicamente una miscela dei due regioisomeri 1,4- e 1,5-disostituiti.⁵¹

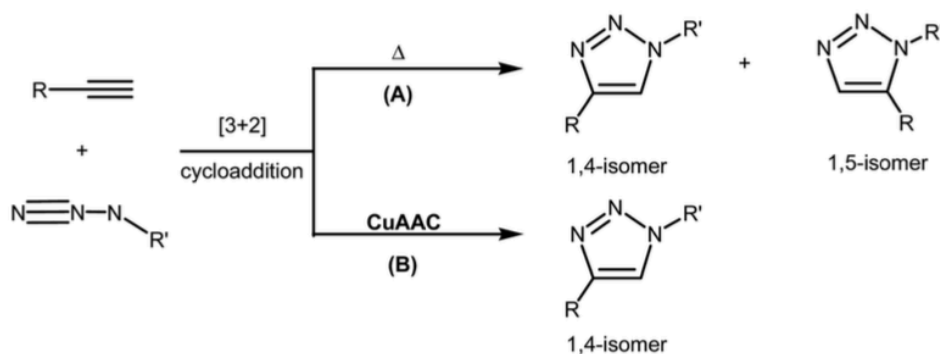


Figura 7: Rappresentazione schematica della reazione di cicloaddizione azide-alchino non catalizzata (A) e catalizzata con Cu(I) (CuAAC) (B).

Questa tipologia di reazione si rivela di fondamentale importanza anche per i saggi di Pull-Down, un approccio biochimico volto all'identificazione di bersagli macromolecolari che interagiscono con molecole a basso peso molecolare. La metodica prevede l'immobilizzazione delle molecole su un supporto solido, seguita da fasi di separazione e

dalla successiva caratterizzazione analitica, tipicamente mediante spettrometria di massa. L'obiettivo primario di questa tecnica è la cattura e l'identificazione di proteine target all'interno di sistemi biologici complessi. Un'applicazione specifica del metodo Pull-Down si basa sull'impiego di un linker fotoreattivo, capace di formare un legame covalente con la proteina bersaglio⁵⁴, come schematicamente illustrato nella Figura 8.

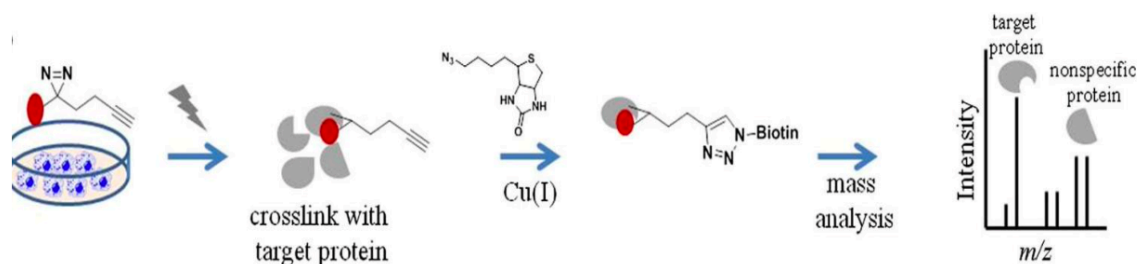


Figura 8: Rappresentazione del metodo “Pull-Down” basato su un linker fotoreattivo.

1.4 Photoaffinity labeling

Il photoaffinity labeling (PAL) costituisce una delle strategie d'elezione per la caratterizzazione delle interazioni non covalenti tra piccole molecole bioattive e i loro bersagli macromolecolari.⁵⁴ La metodologia si basa sull'impiego di specifiche molecole sonda progettate integrando nella struttura del ligando un gruppo fotoreattivo come diazirine, arilazidi o benzofenoni e preservandone selettività di legame originaria.⁵⁵

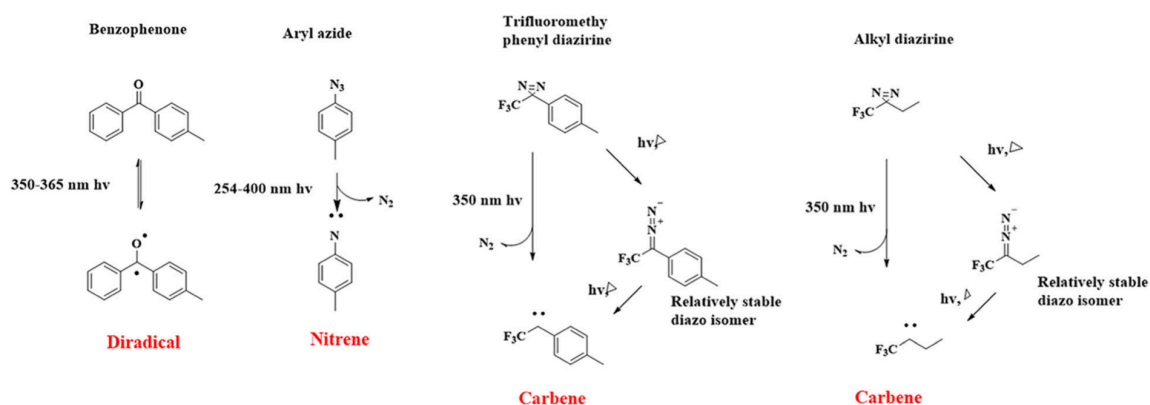


Figura 9: Meccanismi di attivazione fotochimica delle principali sonde utilizzate nel photoaffinity labeling..

Il meccanismo di funzionamento della molecola sonda si articola principalmente in due fasi. In primo luogo, la sonda si lega attraverso interazioni non covalenti al sito di legame della proteina target in condizioni fisiologiche. Successivamente, il sistema viene irradiato con una luce a una specifica lunghezza d'onda, la quale attiva la fotolisi del gruppo fotosensibile, generando specie intermedie ad alta reattività e a vita brevissima come carbeni, nitreni o diradicali.⁵⁶ Tali intermedi reagiscono istantaneamente con le catene laterali amminoacidiche poste nelle immediate vicinanze del sito di legame, convertendo l'interazione non covalente in un legame covalente irreversibile. Questa stabilizzazione permanente permette alla sonda di resistere ai processi di estrazione che coinvolgono la lisi cellulare e la denaturazione, rendendo il PAL uno strumento imprescindibile per il processo di identificazione del target e per la mappatura dei siti di legame mediante spettrometria di massa (LC-MS/MS).⁵⁷

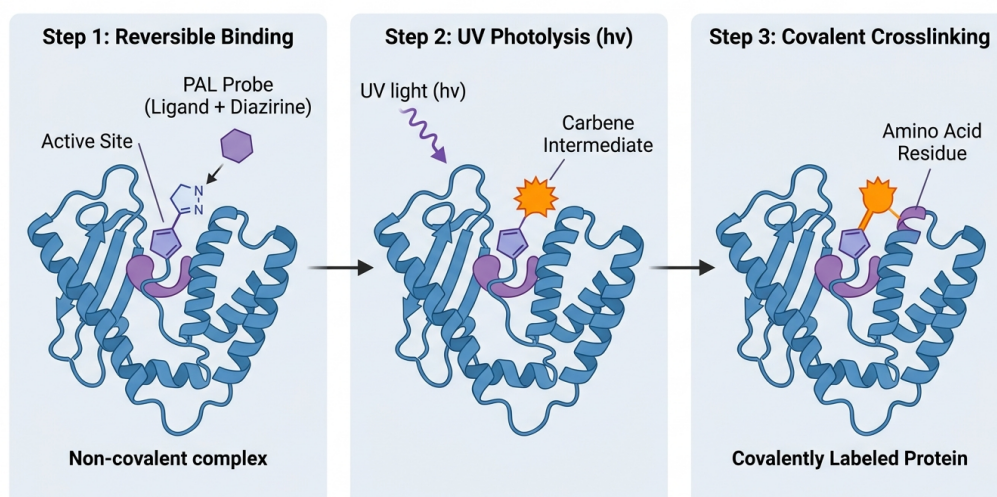


Figura 10: Rappresentazione schematica delle fasi del processo di Photoaffinity Labeling (PAL).

Nell'ambito della chimica bioortogonale e dello sviluppo di sonde utilizzate in PAL, la 3-(but-3-in-1-il)-3-(2-iodoetil)-3H-diazirina (**Diazirina**) si configura come un *building block* multifunzionale di primaria rilevanza.⁵⁸

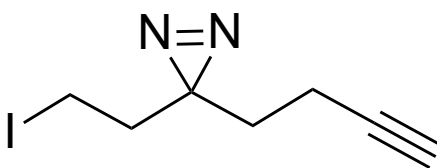


Figura 11: Struttura chimica della 3-(but-3-in-1-il)-3-(2-iodoetil)-3H-diazirina (Diazirina).

Dal punto di vista strutturale, tale molecola permette di introdurre due funzionalità chimiche essenziali garantendo un ingombro sterico estremamente contenuto, così da preservare inalterate l'affinità di legame e le proprietà farmacocinetiche del ligando nativo. Il suo meccanismo d'azione si fonda sulla cooperazione sinergica di tre elementi molecolari distinti: il gruppo iodoetile, l'anello diazirinico e il terminale alchिनico. La porzione iodoetilica, grazie alla presenza dell'atomo di iodio come eccellente gruppo uscente, funge da sito elettrofilo favorendo l'attacco nucleofilo da parte della molecola bioattiva di interesse, sia essa un farmaco, un lipide o un metabolita, attraverso reazioni di sostituzione nucleofila S_N2 . L'anello diazirinico rappresenta la porzione fotoreattivo vera e propria che, in seguito a irraggiamento con luce ultravioletta (attorno ai 350 nm), va incontro a fotolisi con emissione di azoto gassoso e genera una specie carbenica altamente reattiva.⁵⁶ Questo intermedio si inserisce istantaneamente nei legami C-H, N-H o O-H dei residui amminoacidici adiacenti, trasformando l'interazione non covalente tra la sonda e la proteina bersaglio in un legame covalente irreversibile. Infine, la presenza di un alchino terminale bioortogonale e inerte nei sistemi biologici consente la successiva funzionalizzazione secondaria del sistema mediante reazioni di *Click Chemistry* (in particolare la cicloadizione azide-alchino catalizzata da rame, CuAAC).⁵³ L'impiego di questo *linker* bifunzionale permette dunque di convertire un ligando convenzionale in una sonda capace di catturare *in vitro* o *in vivo* l'interazione con il target biologico e di consentirne l'aggancio a un reporter (come un fluoroforo per l'imaging microscopico o un derivato della biotina per l'isolamento e la caratterizzazione proteomica mediante spettrometria di massa), rendendo accessibili l'identificazione e la mappatura di complessi macromolecolari altrimenti difficili da isolare.⁵⁴

1.5 Controllo della stereoselettività nella sintesi glucosidica

Al fine di poter sfruttare gli SG per gli studi descritti precedentemente, è necessario ottenerne una quantità utile ricavandoli o da fonti naturali (*H. pylori*) oppure sintetizzarli attraverso una reazione di glucosilazione stereoselettiva, in modo tale da ottenere i due diversi anomeri α o β . La stereoselettività è influenzata da diversi fattori.

1.5.1 Effetto anomeroico

Per quanto riguarda i derivati 1-idrossilici degli zuccheri piranosici, il sostituito anomeroico in posizione equatoriale risulta energicamente favorito a causa delle minori interazioni 1,3-diassiali rispetto alla posizione assiale, che causerebbero tensione sterica dovuta alla repulsione tra le nuvole elettroniche. Inoltre, in ambiente protico o polare, l'anomero è stabilizzato da una più efficiente solvatazione e formazione di legami a idrogeno intermolecolari con il solvente. Tuttavia, altri sostituenti anomeroici elettron-attrattori, come i derivati alogenati, alchilici e arilici, prediligono un'orientazione assiale. Questo fenomeno è definito "effetto anomeroico" e influenza la maggior parte delle reazioni che hanno luogo sul carbonio anomeroico degli zuccheri.⁵⁹⁻⁶⁰ Nel caso dell'esempio trattato precedentemente, è possibile parlare di effetto "endo-anomeroico", la cui origine risiede sia in fattori elettrostatici che stereoelettronici. Quando il sostituito anomeroico si trova in posizione equatoriale (β), i doppietti elettronici dell'atomo eteroatomico legato al C1 subiscono una forte repulsione coulombiana con quelli dell'ossigeno endociclico.⁶¹ Dal punto di vista stereoelettronico, l'anomero assiale (α) risulta stabilizzato da un'interazione di iperconiugazione attraverso la quale il doppietto di non legame dell'ossigeno endociclico si trova in orientazione antiperiplanare rispetto all'orbitale di antilegame σ^* del legame C1-O1, permettendo una donazione elettronica stabilizzante.⁶² Questa stabilizzazione non si verifica nell'anomero β , in quanto gli orbitali non si trovano sullo stesso piano e non possono sovrapporsi efficacemente. La destabilizzazione dell'anomero beta è leggermente mitigata dal cosiddetto effetto "eso-anomeroico", grazie al quale uno dei doppietti liberi dell'ossigeno anomeroico si dispone in modo perfettamente antiperiplanare rispetto al legame σ del carbonio anomeroico con l'ossigeno endociclico (legame C1-O5), permettendo la donazione di densità elettronica all'orbitale di antilegame vuoto σ^* del legame C1-O5, fornendo un

significativo contributo stabilizzante alla conformazione.⁶¹ Inoltre, la rotazione del residuo agliconico orienta i dipoli locali dei due atomi di ossigeno in direzioni opposte, riducendo al minimo la repulsione coulombiana tra le loro cariche parziali negative.

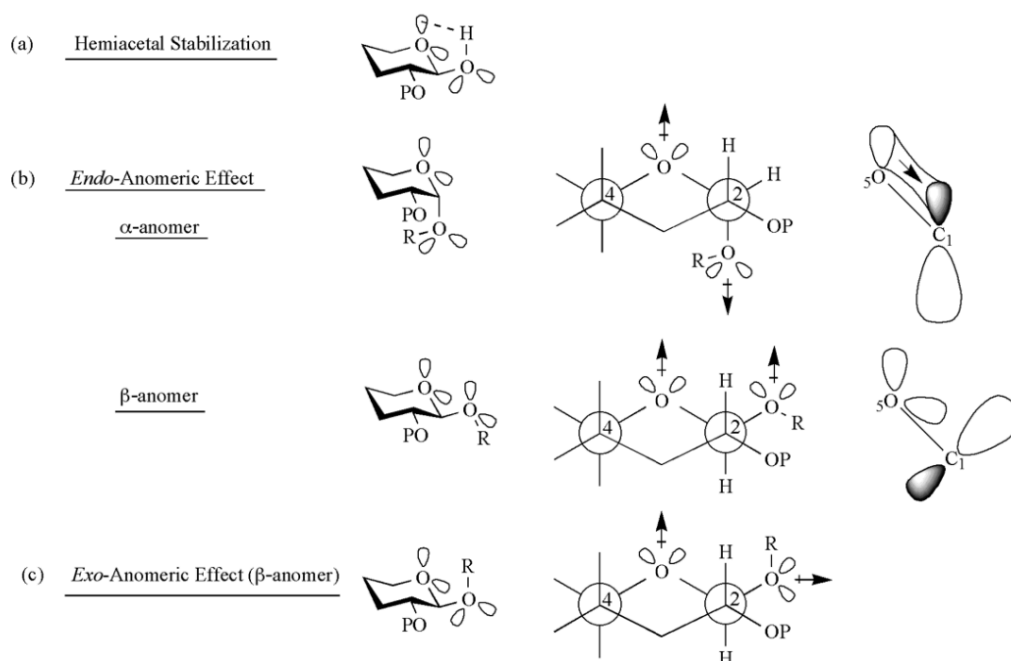


Figura 12: Rappresentazione degli effetti endo- ed exo-anomerici nei carboidrati.⁶¹

1.5.2 Meccanismo di reazione

La sostituzione nucleofila al carbonio anomero coinvolge solitamente i gruppi ossidrilici di alcol o zuccheri, i quali risultano nucleofili piuttosto deboli. La reazione decorre attraverso un meccanismo S_N1 in cui la dissociazione del gruppo uscente porta alla formazione di un carbocatione secondario in C1, il quale è stabilizzato per risonanza da un doppietto elettronico libero dell'ossigeno endociclico⁶³. La caratteristica comune di queste strutture è che il carbonio anomero ibridato sp^2 può essere attaccato dal nucleofilo sia dalla faccia superiore dell'anello sia da quella inferiore. Sebbene il prodotto caratterizzato dalla configurazione α sia termodinamicamente favorevole si ottiene spesso una quantità consistente e talvolta maggioritaria del prodotto cinetico in configurazione β , a causa della natura irreversibile di molte reazioni di glicosilazione.⁶¹

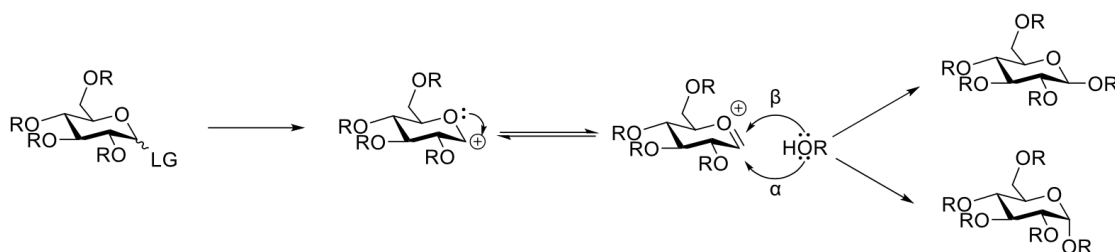


Figura 13: Formazione dello ione ossocarbenio e stereochimica dell'attacco dell'accettore nucleofilo.

Una svolta concettuale determinante per la comprensione dei principi chimici alla base della formazione del legame α -glicosidico è giunta con la scoperta e la razionalizzazione del concetto di “anomerizzazione in situ”, nota come "reazione di glicosilazione catalizzata da ioni alogenuro", da parte di Lemieux e collaboratori.⁶⁴ Tale metodologia dimostra che l'aggiunta di un sale di ammonio quaternario, come il bromuro di tetrabuttilammonio (Bu_4NBr), permette di instaurare un rapido equilibrio cinetico tra l' α -alogenuro di partenza, caratterizzato da un'elevata stabilità e scarsa reattività, e l'intermedio β -alogenuro, di gran lunga più instabile e reattivo. Di conseguenza, l'accettore di glicosile attacca in modo preferenziale l'intermedio β altamente reattivo attraverso un meccanismo di tipo $\text{S}_{\text{N}}2$ fornendo stereo selettivamente l' α -glicoside attraverso l'inversione di configurazione. La barriera energetica di attivazione per la formazione dell' α -glicoside a partire dal reattivo β -bromuro risulta significativamente inferiore rispetto a quella della reazione che porta alla formazione del β -glicoside a partire dall' α -bromuro. Pertanto, l' α -glicoside si forma a una velocità nettamente superiore rispetto alla controparte β . Questa netta preferenza cinetica, coordinata con la maggiore stabilità termodinamica intrinseca dell'anomero α (dovuta all'effetto anomerico), rende il processo di glicosilazione catalizzato da alogenuri ad alta stereoselettività.⁶¹

1.5.3 Il gruppo funzionale adiacente

L'influenza di un gruppo funzionale partecipante costituito da una porzione acilica come un *O*-acetile (*O*-Ac), un *O*-benzoile (*O*-Bz) legato al carbonio adiacente a quello anomero, permette di indirizzare la stereoselettività verso la formazione dell'anomero β grazie alla sua partecipazione alla struttura di risonanza.⁶¹ È stato dimostrato che queste glicosilazioni procedono principalmente attraverso un intermedio biciclico caratterizzato dalla presenza di

un catione acilossonio, il quale permette l'attacco del nucleofilo solamente dalla faccia superiore dell'anello.

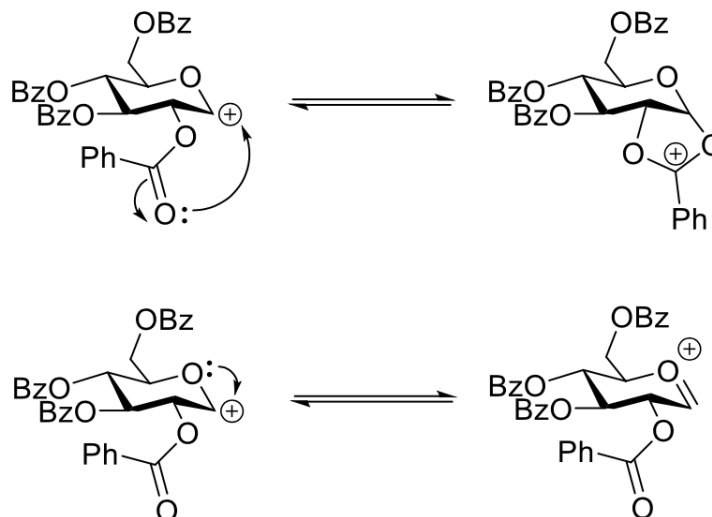


Figura 14: Meccanismo di stabilizzazione intramolecolare del donatore di glucosile tramite gruppi protettivi partecipanti.

I sostituenti presenti sul carbonio C2 sono responsabili anche del cosiddetto effetto “armed-disarmed”⁶⁵. Gli zuccheri “disarmati” possiedono gruppi elettron-attrattori di tipo estereo come acetili o benzoili, i quali possono diminuire la densità elettronica sul C1, rendendo un eventuale *leaving group* meno incline a uscire, necessitando quindi di un catalizzatore o di un promotore per favorire la reazione. Al contrario, i sostituenti di tipo etero come i benzili sono classificati “armanti” in quanto elettron-donatori. Poiché essi aumentano la densità elettronica sul carbonio anomero, le reazioni di glicosilazione procedono attraverso la formazione di un intermedio carbocationico (S_N1), riducendo drasticamente il controllo stereochimico intrinseco e portando spesso a una miscela di α e β -glucosidi.⁶¹

1.5.4 Il gruppo uscente

Come trattato nel paragrafo precedente, è stato dimostrato che i glucosil alogenuri attivati in presenza di uno ione alogenuro proveniente ad esempio da Bu_4NBr , forniscono i più elevati rapporti in termini di α/β . Tuttavia, l'applicazione di questo metodo risulta limitata agli alogenuri glicosidici altamente reattivi, rendendone possibile l'applicazione solamente per

oligosaccaridi semplici.⁶⁴ Poiché nella maggior parte dei casi le reazioni di glicosilazione procedono tramite un meccanismo S_N1 , l'orientazione del gruppo uscente al centro anomero è di minore importanza. Tuttavia, occasionalmente, le reazioni di glicosilazione procedono tramite un meccanismo bimolecolare S_N2 che comporta l'inversione della configurazione anomera.⁶¹ In questo contesto, i donatori di glicosile come i glucosil alogenuri con orientazione 1,2-*cis* in presenza di catalizzatori insolubili formano 1,2-*trans*-glicosidi. Al contrario, i donatori di glicosile orientati in 1,2-*trans*, come ad esempio i β -glucosil alogenuri altamente reattivi, generano stereoelettivamente 1,2-*cis*-glicosidi.⁶¹

1.5.5 Il solvente

Un ruolo cruciale nel controllo della stereoselettività al centro anomero è rivestito dal solvente di reazione. Sotto il profilo puramente termodinamico, l'impiego di solventi polari incrementa la velocità di formazione dei β -glucosidi; tale fenomeno è riconducibile alla capacità del mezzo di indurre una separazione di carica tra l'ossigeno endociclico e l'ossigeno legato in C1, attenuando di conseguenza l'effetto anomero.⁶¹ Al contrario, se l'obiettivo sintetico è l'ottenimento di α -glucosidi, solventi meno polari o non coordinanti come il diclorometano o il toluene si rivelano i candidati più idonei. Tuttavia, l'impatto della solvolisi viene ampiamente superato in termini di efficacia quando si impiegano i cosiddetti solventi partecipanti. Esempi emblematici di questo comportamento sono rappresentati dall'acetonitrile e dal dietil etere.⁶⁶ L'acetonitrile promuove selettivamente la sintesi di β -glucosidi. Il meccanismo prevede la generazione *in situ* di un intermedio cationico nitrilico che adotta in modo esclusivo un'orientazione assiale; il successivo attacco nucleofilo dell'accettore è diretto forzatamente in posizione equatoriale, generando l'anomero β . I solventi eterici come il dietil etere o il tetraidrofurano favoriscono la direzione opposta.⁶¹ La loro coordinazione all'anello piranosico porta alla formazione preferenziale di un intermedio in disposizione equatoriale, consentendo l'attacco nucleofilo dell'accettore in posizione assiale e favorendo così la sintesi dell'anomero α . In questo scenario, studi recenti hanno identificato nel diossano un solvente partecipante ancora più performante rispetto

all'etere.⁶⁷ Tale reattività superiore è legata alle sue caratteristiche strutturali, che rendono i doppietti elettronici liberi dell'ossigeno stericamente più accessibili per la stabilizzazione coordinativa dell'intermedio ossocarbenico.

1.5.6 Il nucleofilo

Nelle reazioni di glucosilazione selettiva, la natura chimica del nucleofilo svolge un ruolo determinante nel governare la stereochimica dell'anomero finale, influenzando drasticamente sia la cinetica sia il meccanismo di reazione (S_N1 o S_N2).⁶⁸ Nucleofili forti e poco impediti stericamente, come gli alcoli primari lineari, favoriscono un percorso concertato di tipo S_N2 . In questo scenario, l'attacco avviene con inversione di configurazione direttamente sulla specie attivata, conducendo a un'elevata selettività per l'anomero β .⁶³ Al contrario, nucleofili deboli o stericamente ingombrati (come gli alcoli secondari e terziari) presentano una velocità di attacco ridotta che comporta la dissociazione del gruppo uscente e lo sviluppo di un intermedio ionico ossocarbenico planare e stabilizzato per solvatazione.⁶⁹ In assenza di un attacco stereoselettivo guidato dall'accettore, la selettività anomerica finale diventa dipendente da fattori intrinseci al substrato elettrofilo, quali l'effetto anomerico, la conformazione dell'anello o l'influenza dei gruppi protettori adiacenti.

1.6 I lavori di tesi precedenti

Al fine di ottenere la sintesi stereoselettiva delle sonde molecolari nelle configurazioni anomeriche α e β , i precedenti lavori di tesi hanno sviluppato una strategia sintetica basata sull'assemblaggio di tre differenti sintoni. Nello specifico, l'approccio prevede l'impiego di un derivato del glucosio recante gruppi ossidrilici opportunamente protetti selezionati per indirizzare la stereochimica verso l'anomero desiderato, il deidroepiandrosterone (DHEA) funzionalizzato come *scaffold* steroideo, e una catena alchilica lineare provvista di un gruppo ossidrilico e di un alchino terminali. La sequenza delle reazioni alla base della via sintetica proposta è illustrata in **Figura 1.9**. **Figura 1.9:** via sintetica per ottenere i derivati α -SG e β -SG.

La strategia sintetica prevede innanzitutto l'opportuna funzionalizzazione dei gruppi reattivi del DHEA e della catena alchilica lineare. Nello specifico, per quanto riguarda il linker alchilico, l'ossidrile primario viene convertito in tosilato (Ts) — fungendo da gruppo attivante per il successivo *coupling* — mentre l'alchino terminale viene protetto con un gruppo triisopropilsilile (TIPS) (vie *c* e *d* in **Figura 15**, composto **3c**). L'ossidrile in C3 del DHEA viene invece protetto in funzione dell'anomero bersaglio: si utilizza il gruppo *tert*-butildifenilsilile (TBDPS) per la via sintetica rivolta all' α -glucoside, oppure il gruppo tetraidopiraniile (THP) per quella del β -glucoside (vie *f* e *g* in **Figura 15**, composti **4b** e **4c**). Successivamente, il gruppo chetonico del DHEA viene ridotto ad alcol (vie *h* e *i*, composti **5a** e **5b**), generando il nucleofilo necessario per la reazione di eterificazione con la catena alchilica tosilata. Questo passaggio consente l'unione dei due sintoni, portando all'ottenimento dei composti **6a** e **6c** (via *l*). A questo punto il percorso sintetico si differenzia in base all'anomero di interesse. Nel caso del β -SG, si esegue la rimozione selettiva del gruppo THP per liberare l'ossidrile (via *n*, composto **6d**), mantenendo intatta la protezione sull'alchino; questa precauzione è necessaria poiché la successiva glicosilazione richiederà promotori metallici in grado di interferire con il triplo legame libero. Al contrario, per il precursore dell' α -SG si procede alla deprotezione simultanea dell'ossidrile (dal TBDPS) e dell'alchino terminale (dal TIPS) (via *m*, composto **6b**). Parallelamente, si preparano i donatori glicosidici: per la sintesi dell'anomero α , i gruppi ossidrilici del glucosio vengono protetti mediante trimetilsililazione (TMS) (via *a*, composto **1a**); per l'anomero β , il glucosio viene perbenzoilato (Bz) e sottoposto a una reazione di sostituzione nucleofila sul carbonio anomero per generare il corrispondente bromuro glicosidico (via *b*, composto **1b**). La sintesi procede quindi con la reazione di glicosilazione tra l'accettore sterico e il donatore glucidico. Per l' α -SG si adottano le condizioni descritte da Gervay-Hague e collaboratori, mentre per il β -SG si segue la metodologia di Murakami e collaboratori [17] (vie *o* e *r*). Ottenuto il β -glucoside (composto **7a**), questo si presenta ancora protetto; l'ottenimento della sonda finale richiede pertanto la deprotezione dell'alchino terminale dal gruppo TIPS (via *p*, composto **7b**) e la successiva rimozione dei gruppi benzoici (debenzoilazione) mediante reazione di transesterificazione secondo Zemplén (via *q*).

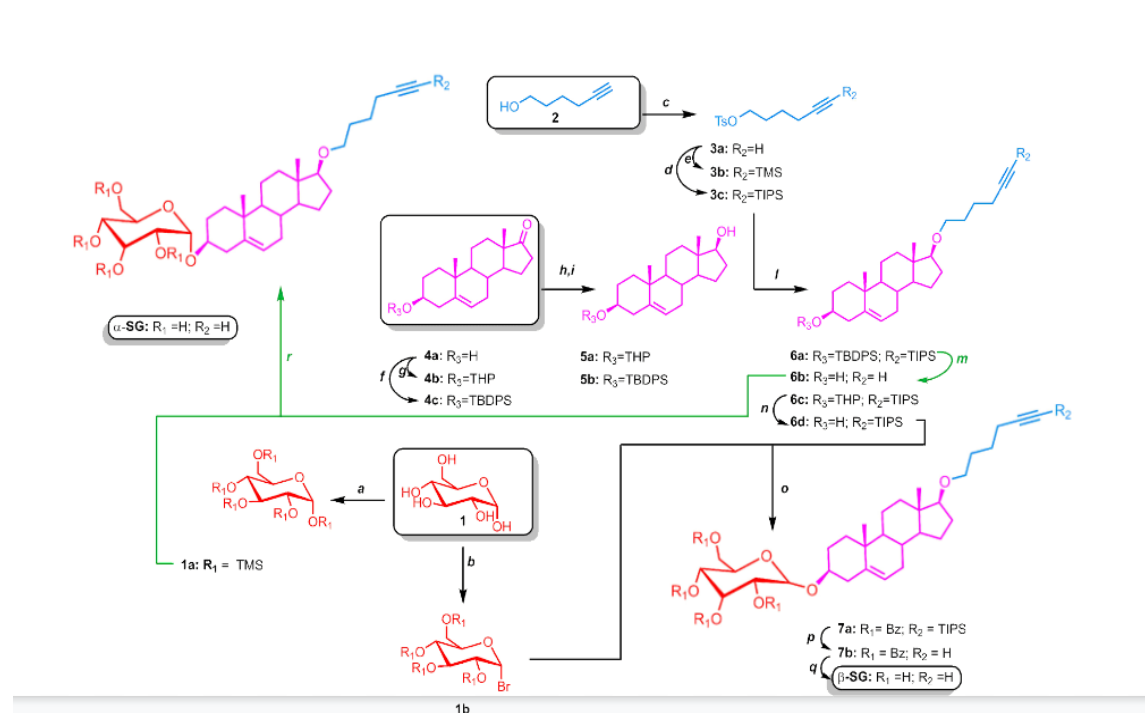
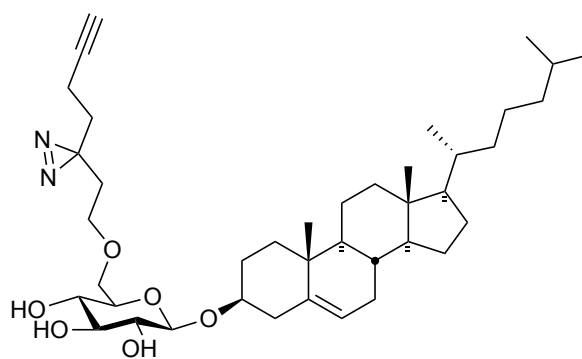


Figura 15: Strategia di sintesi per ottenere i derivati α -SG e β -SG.

2. SCOPO DELLA TESI

Le recenti evidenze scientifiche hanno evidenziato un ruolo cruciale degli **SG** nello sviluppo di diverse malattie neurodegenerative. Tuttavia, la comprensione dettagliata dei meccanismi biologici nei quali sono coinvolti è attualmente limitata dalla difficoltà di tracciare la loro localizzazione all'interno dei neuroni e di identificare i complessi proteici con cui interagiscono. Lo scopo di questo lavoro di tesi è la progettazione e la sintesi stereoselettiva di una nuova sonda molecolare bifunzionale, basata sulla struttura dell'anomero beta del colesteril glucosio, da impiegare come strumento per studiare l'incidenza dei SG nelle malattie neurodegenerative. La sonda molecolare verrà sintetizzata prevedendo una funzionalizzazione in posizione C6 del residuo glucidico, mediante l'inserimento di un *linker* recante un gruppo diazirinico fotoattivabile e un alchino terminale. Questa architettura molecolare permette di ottenere un duplice obiettivo: l'irraggiamento UV della porzione diazirinica genera *in situ* un intermedio carbenico altamente reattivo, capace di instaurare legami covalenti con i residui amminoacidici delle proteine target adiacenti, permettendone la cattura e la successiva identificazione. Inoltre, la presenza dell'alchino terminale funge da gruppo bio-ortogonale, il quale permette il legame *in situ* con un fluoroforo per tracciare la localizzazione della molecola (bioimaging cellulare) o l'attacco di *tag* di affinità per l'isolamento dei complessi lipide-proteina mediante saggi di *pull-down*. Dal punto di vista chimico, l'obiettivo di sintesi verrà perseguito attraverso una strategia di protezione ortogonale. La via sintetica prevede la protezione temporanea dell'ossidrile in C6 del D-glucosio con un gruppo tritile e la successiva benzoilazione delle restanti posizioni. Successivamente, l'ossidrile anomeroico verrà deprotetto mediante la reazione con l'acetato di idrazina, permettendo l'inserimento di un ottimo gruppo uscente generato dal tricloroacetone nitrile, consentendo il *coupling* stereoselettivo con il colesterolo. Il traguardo sintetico finale prevederà la rimozione acida del gruppo tritile e la funzionalizzazione dell'ossidrile liberato in C6. Quest'ultimo, previa attivazione ad alcolato mediante sodio idruro (NaH), viene sottoposto a una reazione di alchilazione impiegando la **Diazirina**. L'utilizzo di questo specifico reagente elettrofilo permette l'inserimento *one-step* sia del gruppo fotosensibile che dell'alchino terminale. Attraverso la rimozione dei gruppi protettori benzoilici residui tramite la reazione di deprotezione di Zemplén, potrà essere ottenuto il

prodotto finale desiderato, ovvero il β -Colesteril-6-O-[3-(but-3-in-1-il)-3-(2-etil)-3H-diazirina]-D-glucopiranoside (**β -CDG**) (Figura 16). L'utilizzo di questa sonda molecolare permetterà al dipartimento di biologia dell'università di Padova di compiere degli studi per identificare i bersagli proteici del e mappare la sua posizione intracellulare, aprendo nuove prospettive per la comprensione delle patologie neurodegenerative.



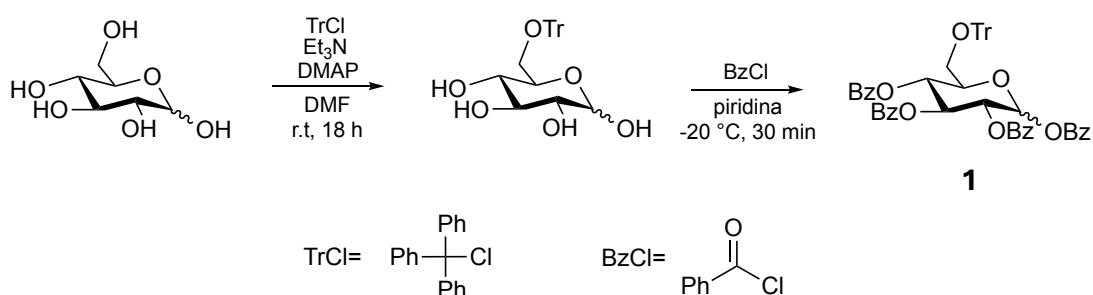
β -CDG

Figura 16: Struttura chimica di β -Colesteril-6-O-[3-(but-3-in-1-il)-3-(2-etil)-3H-diazirina]-D-glucopiranoside.

3. Risultati e discussione

3.1 Sintesi di α - e β -1,2,3,4-tetra-O-benzoil-6-O-tritil-d-glucopiranosio (1)

Il primo passaggio di sintesi prevede la protezione ortogonale del D-glucosio mediante due reazioni, che verranno condotte in sequenza, al fine di ottenere e isolare il prodotto tritolato in posizione C6 e tetra-benzoilato nelle posizioni C1, C2, C3 e C4 (**1**).⁷⁰



Schema di reazione 1: Sintesi di **1**.

La prima reazione sfrutta il notevole ingombro sterico del trifenilmetil cloruro (**TrCl**) per condurre una funzionalizzazione regioselettiva dell'ossidril primario in posizione C6. La maggior reattività e selettività dell'ossidril in posizione C6 rispetto agli altri ossidril del glucosio risiede principalmente nel minor ingombro sterico e la leggermente maggiore acidità dell'ossidril stesso.⁷¹ La catena laterale di cui fa parte gode di un'elevata libertà rotazionale e sporge al di fuori dell'anello, rendendo l'ossigeno spazialmente accessibile e maggiormente nucleofilo.⁷² Al contrario, gli ossidril nelle posizioni C2, C3 e C4 sono alcol secondari legati direttamente alla struttura ciclica rigida del piranosio, risultando meno leggermente meno acidi e maggiormente congestionati stericamente.⁷³

Il meccanismo di reazione è riconducibile a una sostituzione nucleofila $\text{S}_{\text{N}}1$. In soluzione, Il cloruro di tritile può parzialmente ionizzarsi autonomamente per formare il carbocatione tritilico, che risulta eccezionalmente stabile in quanto la carica positiva è delocalizzata attraverso le strutture di risonanza che coinvolgono i tre sistemi aromatici. L'ambiente di reazione fortemente polare stabilizza ulteriormente il carbocatione, permettendo una rapida

formazione di questo intermedio e favorendo la formazione dell'alcolato del gruppo ossidrilico primario in C6 da parte della trietilammina (Et_3N). Il risultato è la formazione di un legame etero con la concomitante formazione del cloridrato della trietilammina. La *N,N*-dimetilamminopiridina (DMAP) è stata inserita durante il primo *step* di reazione in quanto è stata seguita scrupolosamente la procedura sperimentale trovata in letteratura. Tuttavia, la base esplica la sua funzione solamente nel secondo *step*, essendo un noto catalizzatore di esterificazione.

La seguente esterificazione è stata condotta all'interno dello stesso pallone di reazione, aggiungendo la piridina e il benzoil cloruro (BzCl) a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ al fine di proteggere le rimanenti funzionalità ossidriliche. A differenza del gruppo tritile, il benzoile è molto meno ingombrato e permette di proteggere contemporaneamente tutti i quattro gruppi ossidrilici residui del glucosio. In questo sistema, la piridina svolge il duplice ruolo di solvente e base sacrificale. La reazione è una sostituzione nucleofila acilica, che avviene attraverso un meccanismo di addizione-eliminazione. La funzione catalitica della DMAP è quella di attaccare l'atomo di carbonio carbonilico del cloruro di benzoile, portando alla sostituzione del cloro e alla formazione di uno ione benzoilpiridinio, il quale aumenta l'elettrofilicità del carbonile carbonilico. Gli ossidrili secondari del glucosio possono quindi attaccare il carbonile dello ione benzoilpiridinio, formando un intermedio tetraedrico carico. La piridina viene espulsa come ottimo gruppo uscente e interviene come base per strappare il protone acido dell'ossigeno carico positivamente. A causa della difficoltà riscontrata nel rimuovere la piridina attraverso evaporatore rotante, nella fase di estrazione è stato necessario compiere dei lavaggi con una soluzione satura di cloruro d'ammonio, al fine di protonare la piridina e favorirne la rimozione in fase acquosa. Precedentemente è stata usata una soluzione di HCl , la quale si è rivelata eccessivamente aggressiva nei confronti del tritile in C6, che risulta labile in ambiente acido, causandone la rimozione. L'isolamento finale tramite TLC preparativa (AcOEt /esano, 4:6) ha consentito di identificare il substrato protetto e i sottoprodotti di reazione.

Nonostante la metodologia *one-pot* rappresenti una soluzione più semplice e sostenibile e abbia permesso di ottenere **1**, comporta della criticità in fase di purificazione dovute alla presenza di sottoprodotti in quanto la conversione del reagente nel primo *step* di reazione è

risultata piuttosto ridotta. Di conseguenza, attraverso il secondo step di reazione è stata ottenuta una miscela di **1** e 1,2,3,4,6-penta-*O*-benzoil-D-glucopiranosio, i quali risultano estremamente difficili da separare attraverso cromatografia.

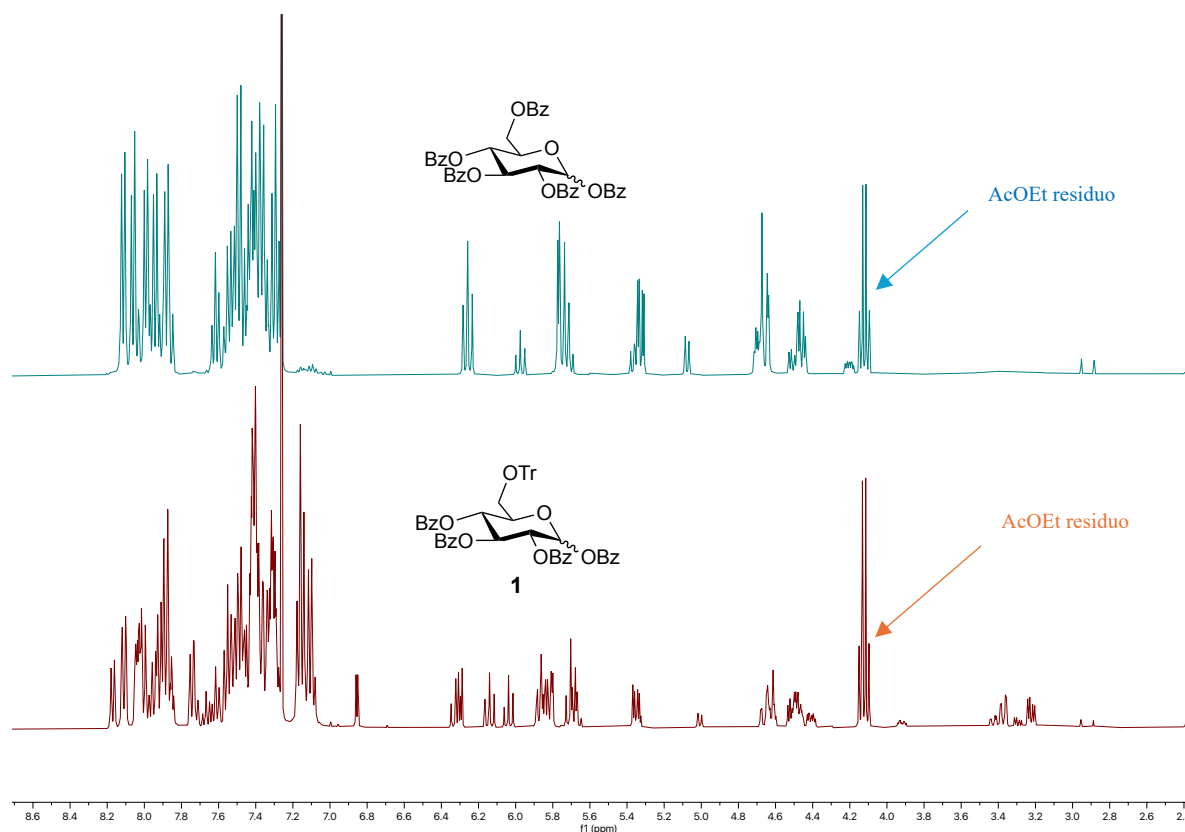


Figura 17: In alto: Spettro ^1H NMR (600 MHz) in CDCl_3 di 1,2,3,4,6-penta-*O*-benzoil-*D*-glucopiranosio. In basso: Spettro ^1H NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **1**.

Al fine di ottenere **1** con una resa maggiore, è risultato necessario separare i due step. La reazione di tritilazione è stata condotta in piridina, scaldando la miscela a 75 °C per 16 ore.⁷⁴ La sintesi ha portato alla formazione maggioritaria del 6-*O*-trifenilmetil-D-glucopiranosio (**2**) e a una serie di prodotti in cui il sostituito tritilico ha protetto ulteriori funzionalità ossidriliche oltre a quella in C6. Il prodotto **2** è stato purificato dalle molecole ulteriormente tritilate mediante cromatografia flash, in quanto esso risulta maggiormente polare grazie ai quattro ossidrilici non protetti. L'avvenuta funzionalizzazione della posizione primaria C6 del D-glucosio è stata confermata attraverso caratterizzazione spettroscopica NMR.

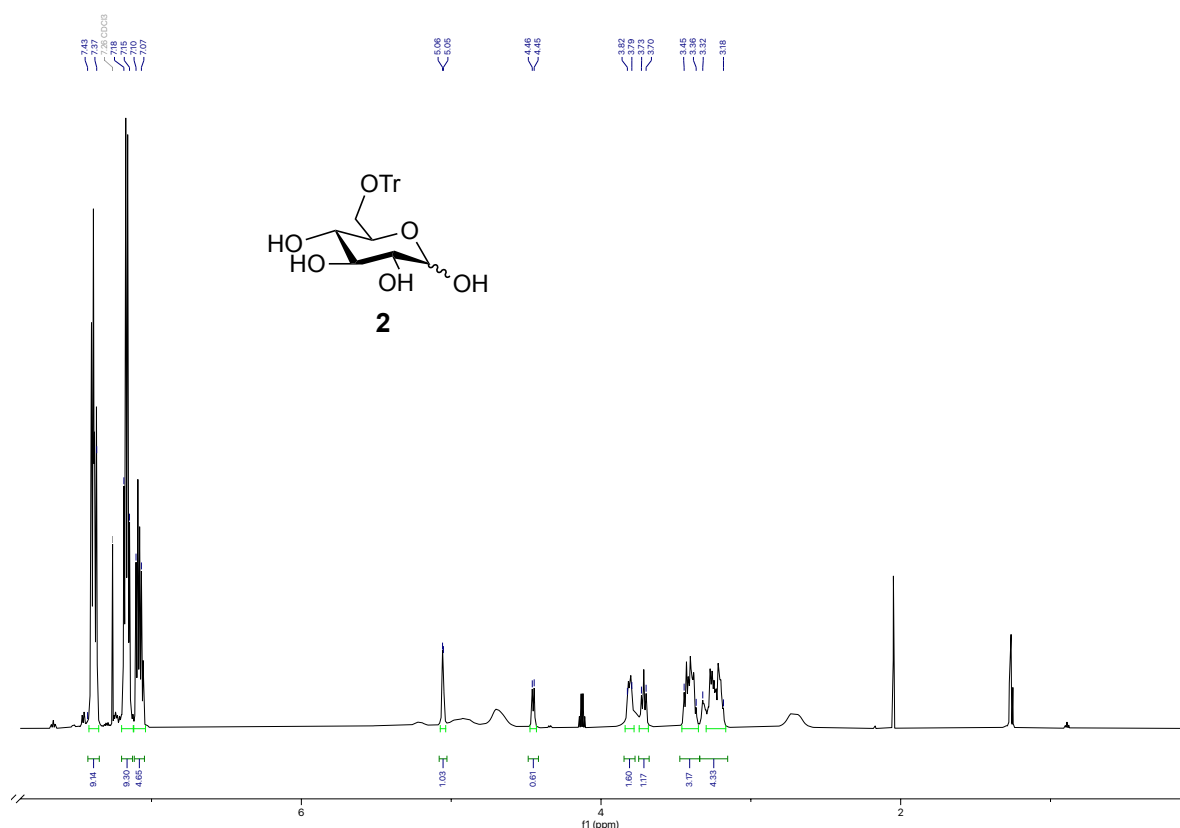


Figura 18: Spettro ^1H NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **2**.

Osservando la zona aromatica dello spettro ^1H NMR è possibile riscontrare il caratteristico *cluster* di segnali generato dai 15 protoni aromatici dei tre anelli fenilici del gruppo tritile. Il multipletto a campi più alti (7.43-7.37 ppm) corrisponde ai protoni in posizione *orto*, preceduto rispettivamente dai protoni in posizione *para* e in posizione *meta*. L'integrazione complessiva presenta un valore più elevato di quello teorico a causa della sovrapposizione con i segnali di fondo relativi presumibilmente a tracce di tritile residuo non reagito. L'ossidrilie anomero in C1 si manifesta in soluzione come una miscela all'equilibrio tra i due anomeri alfa e beta, i cui segnali risultano ben risolti. Il protone H1 α risuona a campi più bassi generando un doppietto ben definito a 5.06 ppm. La costante di accoppiamento vicinale pari a 3.6 Hz è diagnostica dell'orientazione equatoriale del protone anomero ed è dovuta all'accoppiamento equatoriale-assiale con il protone in H2. Il protone dell'anomero

beta risuona come doppietto a 4.46 ppm. La costante di accoppiamento più elevata di 7.8 Hz conferma la relazione *trans*-diassiale con il protone H2. Il rapporto tra gli integrali dei due doppietti anomerici evidenzia un rapporto alfa/beta pari a 1.7/1, indicando una prevalenza dell'anomero alfa. La regione compresa tra 3.82 ppm e 3.18 ppm mostra i multipletti sovrapposti generati dai protoni dell'anello piranosico (H2, H3, H4, H5) e dai protoni diastereotopici (H6a e H6b) di entrambi gli anomeri, unitamente ai segnali allargati relativi ai gruppi alcolici presenti. L'integrazione dei segnali risulta compatibile con il prodotto desiderato.

Successivamente, il prodotto mono-tritolato purificato è stato benzoilato seguendo la medesima procedura della sintesi *one-pot*, ottenendo il prodotto desiderato con una resa pressoché quantitativa. L'avvenuta benzoilazione delle posizioni ossidriliche secondarie e dell'ossidrilico anomero è stata confermata mediante analisi spettroscopica ^1H NMR.

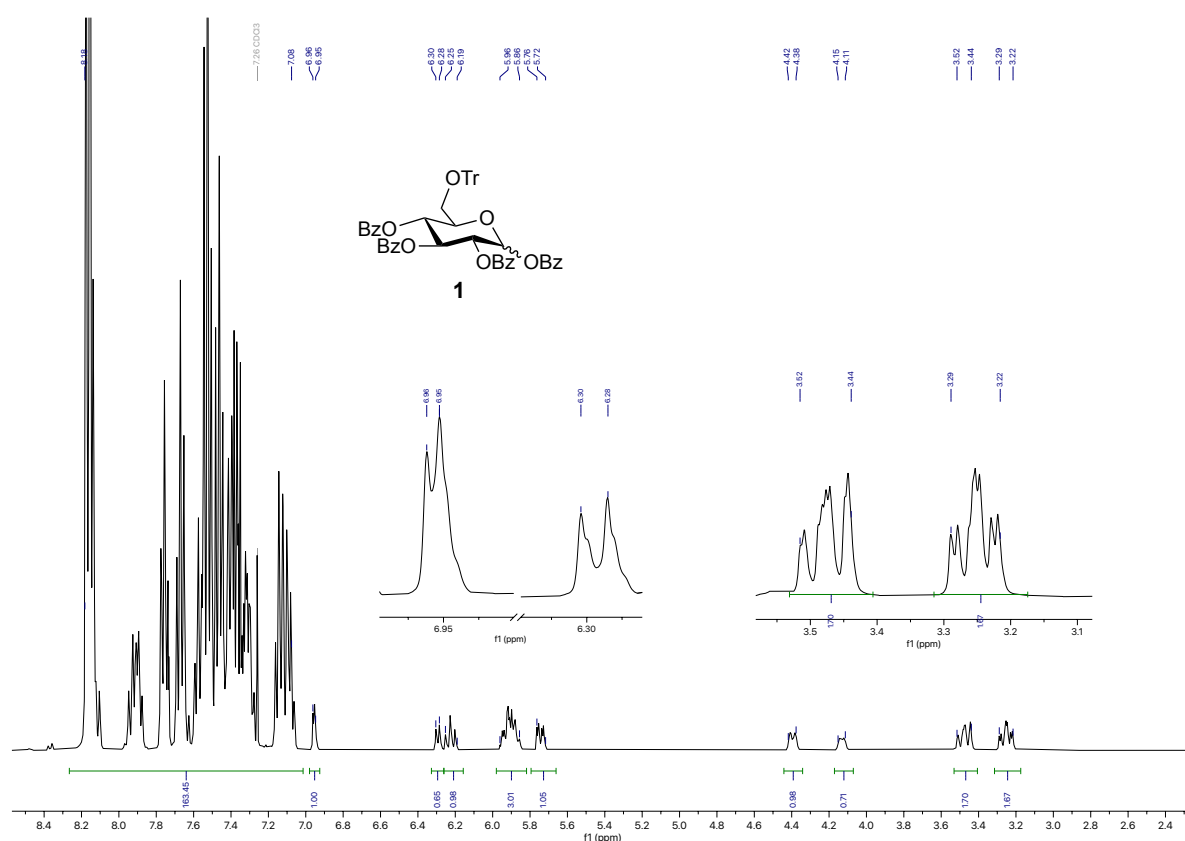


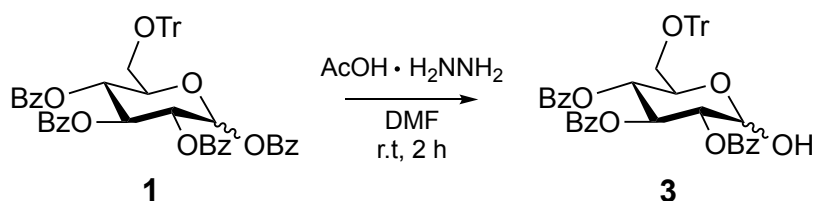
Figura 19: Spettro ^1H NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **1**.

In zona aromatica (7.08-8.18 ppm) è possibile osservare l'esteso sistema di segnali sovrapposti derivanti dai quattro gruppi benzoilici e del gruppo tritile relativi a entrambi gli anomeri presenti in soluzione. Il sistema di doppietti presente a campi più bassi (8.15 ppm) è generato dai protoni in posizione *orto* dei gruppi benzoilici, fortemente deschermati dall'effetto elettrone-attrattore del carbonile estereo.

La presenza di quattro gruppi protettori esterei genera un forte effetto deschermante sui protoni legati all'anello piranosico e comporta lo spostamento dei multipletti relativi ai protoni H2, H3, H4 nella zona compresa tra 5.72 ppm e 6.25 ppm, a campi nettamente più bassi rispetto ai segnali relativi al reagente impiegato. I segnali dei protoni relativi agli anomeri alfa e beta, sono riscontrabili rispettivamente a 6.96 ppm e 6.30 ppm e sono distinguibili dalla caratteristica costante di accoppiamento. Il rapporto tra gli integrali dei due doppietti evidenzia un rapporto alfa/beta pari a 1.5/1, confermando anche in questo caso la prevalenza dell'anomero alfa. Per quanto riguarda la posizione C6, l'assenza del gruppo estereo deschermante combinata con l'effetto di schermatura esercitato dai tre anelli fenilici del tritile, comporta che i due protoni diastereotopici relativi ai due anomeri risuonino a campi nettamente più alti rispetto al resto dei protoni piranosici, nella zona compresa tra 3.52 ppm e 3.22 ppm. Tale spostamento costituisce la prova definitiva che la reazione di benzoilazione è avvenuta in modo ortogonale e selettivo sulle posizioni secondarie e sulla posizione anomeric, preservando il gruppo protettore tritilico. I protoni H5 risuonano a campi intermedi generando due multipletti rispettivamente a 4.42 ppm e 4.15 ppm. L'integrazione risulta compatibile con il prodotto desiderato.

3.2 Sintesi di α - e β -2,3,4-Tri-*O*-benzoil-6-*O*-trifenilmetil-D-glucopiranosio (3)

Un passaggio di sintesi estremamente importante ha riguardato lo sbocco selettivo della posizione anomerica di **1** al fine di ottenere la forma emiacetalica libera, ovvero il 2,3,4-tri-*O*-benzoil-6-*O*-tritol-D-glucopiranosio (**3**).⁷⁰ Questa molecola rappresenta l'intermedio chiave per la successiva funzionalizzazione del C1, che comporterà la conversione in tricloroacetimmidato in grado di legare il colesterolo.



Schema di reazione 2: Sintesi di 3.

Per ottenere un'elevata selettività è stato impiegato l'acetato di idrazina ($\text{AcOH} \cdot \text{H}_2\text{NNH}_2$), il quale è stato sintetizzato a partire da idrazina monoidrato e acido acetico. L'utilizzo di questo sale rappresenta una metodica nota nella chimica dei carboidrati che permette di rimuovere i gruppi acilici dalla posizione anomerica, preservando gli altri gruppi protettori benzoilici presenti sulle altre posizioni dell'anello piranosico e naturalmente il tritile in C6.⁷⁰

La selettività della reazione si basa sull'elevata reattività dell'estere emiacetalico in C1 rispetto agli esteri secondari nelle posizioni 2, 3 e 4. Il carbonio carbonilico del gruppo benzoilico in C1 risulta significativamente più elettrofilo rispetto agli altri, a causa dell'effetto elettron-attrattore esercitato dall'ossigeno endociclico dell'anello piranosico.⁷⁵

La reazione decorre attraverso una sostituzione nucleofila acilica. L'idrazina, che è un nucleofilo forte grazie all'effetto alfa causato dalla repulsione dei doppietti elettronici sugli atomi di azoto adiacenti, attacca in modo preferenziale il carbonio carbonilico del benzoato in posizione anomerica.⁷⁶ Questo attacco porta alla formazione di un intermedio tetraedrico che successivamente collassa, causando la rottura del legame C-O anomerico e l'espulsione dell'ossigeno dello zucchero. Si ottiene così l'emiacetale e la benzoilidrazide come sottoprodotto.

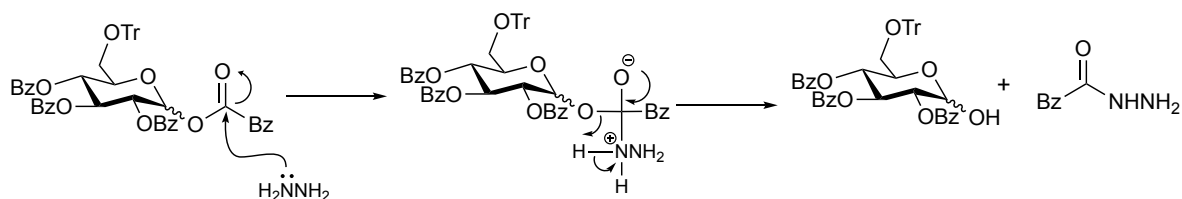


Figura 20: Rappresentazione del meccanismo di reazione tra **1** e l'idrazina.

L'utilizzo del sale di idrazina al posto dell'idrazina libera modula la sua basicità e nucleofilicità attraverso il blando effetto tampone dell'acido acetico e previene la rimozione dei gruppi protettori nelle posizioni C2, C3 e C4. Inoltre, inibisce la migrazione acilica in C1 dei gruppi benzoili, che rappresenta un fenomeno termodinamicamente favorito in ambiente fortemente basico.^{75,76}

La reazione è stata monitorata attraverso TLC e dopo due ore è stata riscontrata la presenza di reagente residuo. Sono stati aggiunti altri 0.5 equivalenti di acetato di idrazina e la reazione è stata mantenuta sotto agitazione per un'ulteriore ora. La reazione è stata spenta aggiungendo acqua, ottenendo un solido bianco insolubile. Il grezzo di reazione è stato purificato attraverso cromatografia flash ed è stato possibile isolare la miscela anomERICA di α -e β -2,3,4-tri-*O*-benzoil-6-*O*-trifenilmetil-D-glucopiranosio. Inoltre, è stata riscontrata la presenza di prodotti che hanno subito la rimozione dei gruppi protettori anche in altre posizioni oltre che in C1, pregiudicando la resa complessiva della reazione (60%). Verosimilmente, risulta preferibile non aggiungere ulteriori equivalenti di acetato di idrazina ma, eventualmente, prolungare il tempo di reazione.

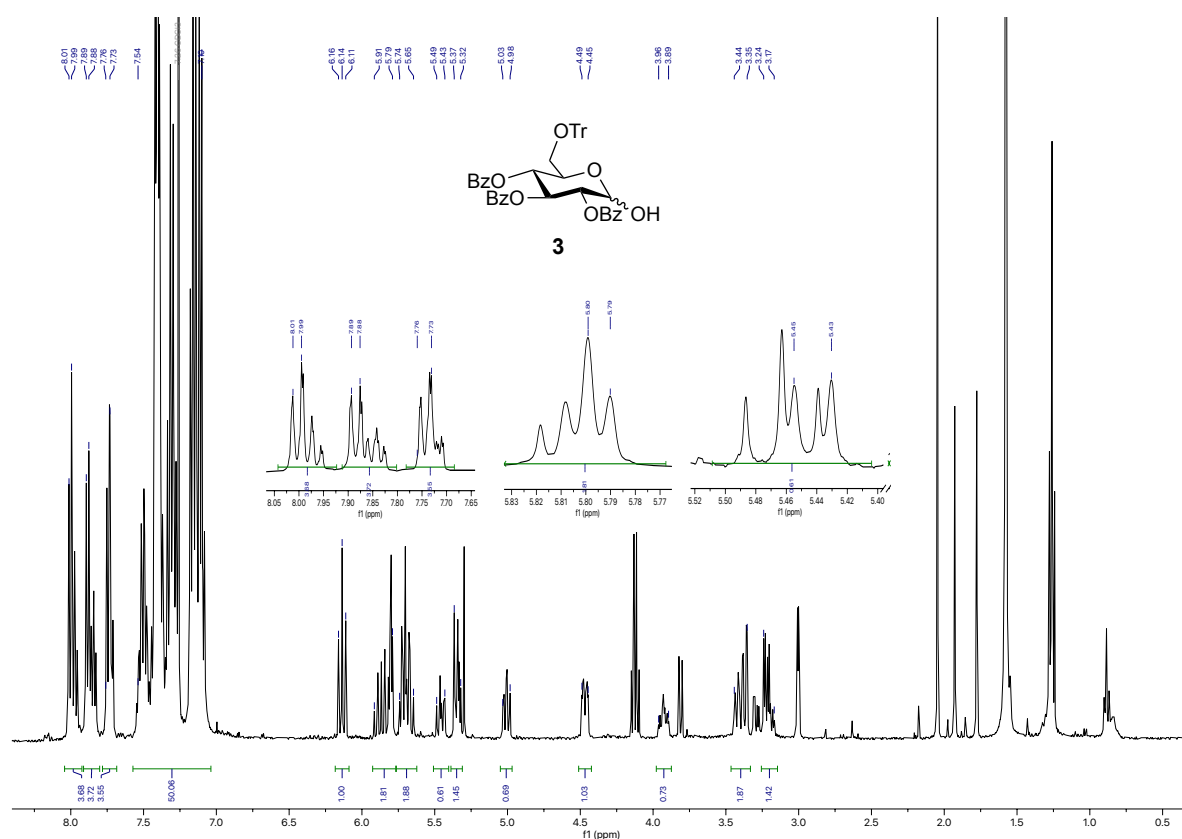


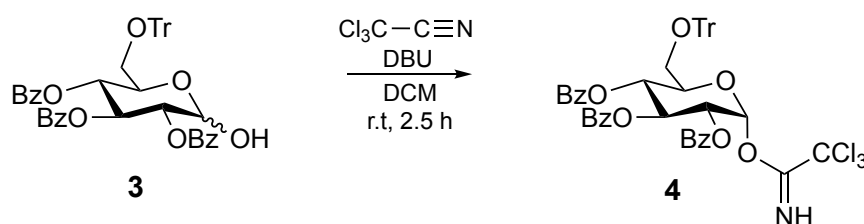
Figura 21: Spettro ¹H NMR (600 MHz) in CDCl₃ di 3.

La formazione del prodotto desiderato avente l'ossidrile anomerico è stata confermata dall'analisi dello spettro ¹H NMR. Considerando la zona aromatica è possibile osservare la presenza di un sistema composto da tre gruppi di segnali compresi tra 8.00 ppm e 7.70 ppm, i quali sono riconducibili ai protoni in posizione *orto* dei tre gruppi benzoilici rimanenti. I segnali relativi ai protoni anomerici alfa e beta risuonano rispettivamente a 5.80 ppm e 5.45 ppm, ovvero a campi nettamente più alti rispetto al reagente. Tale spostamento conferma la rimozione del gruppo estereo, il quale esercitava un effetto deschermante nei confronti degli idrogeni H1. Considerando che i segnali relativi ai protoni diastereotopici in C6 non hanno subito variazione significativa di *chemical shift*, è possibile confermare in modo inequivocabile l'identità del prodotto ottenuto, che mantiene intatto sia il gruppo tritile sia i tre gruppi benzoilici sulle posizioni secondarie C2, C3 e C4.

La reazione di deprotezione non risulta stereoselettiva, in quanto porta alla formazione di un emiacetale libero soggetto a mutarotazione in soluzione. Il rapporto anomerico osservato

nello spettro NMR risulta frutto dell'equilibrio termodinamico derivante dal contributo dell'effetto anomerico e dell'effetto relativo all'ingombro sterico. L'effetto anomerico stabilizza l'anomero alfa in quanto il gruppo ossidrilico in posizione assiale stabilizza la molecola grazie alla delocalizzazione del doppietto elettronico non condiviso dell'ossigeno endociclico nell'orbitale di antilegame del legame O-C1. L'elevato rapporto alfa/beta riscontrato nello spettro risulta indicativo del fatto che l'effetto anomerico prevalga su quello sterico, che favorirebbe il sostituito in posizione equatoriale a causa della minore tensione sterica. Come descritto nel capitolo "Introduzione", l'utilizzo di un solvente poco polare agevola la prevalenza dell'effetto anomerico, unitamente alla presenza di gruppi protettori voluminosi che irrigidiscono la conformazione a sedia e rendono il bilancio termodinamico molto sensibile all'ambiente di solvatazione.

3.3 Sintesi di α -2,3,4-Tri-*O*-benzoil-6-*O*-trifenilmetil-D-glucopiranosio tricloroacetimmidato (4)



Schema di reazione 3: Sintesi di 4.

Questo passaggio di sintesi permette di trasformare la posizione anomerica in un eccellente donatore di glicosile (attraverso il metodo sviluppato da Schmidt),⁷⁷ convertendo l'emiacetale libero di **3** in un gruppo tricloroacetimmidato. I tricloroacetimmidati glicosilici sono intermedi discretamente stabili ma altamente reattivi, capaci di attivarsi selettivamente in presenza di quantità catalitiche di acidi di Lewis per condurre a reazioni di glicosilazione con elevato controllo stereochimico.⁷⁸

La sintesi del α -2,3,4-tri-*O*-benzoil-6-*O*-trifenilmetil-D-glucopiranosio tricloroacetimmide (**4**) decorre attraverso un processo di addizione nucleofila catalizzata da 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene base (DBU). Questa base organica forte e stericamente ingombrata deprotona l'ossidrilico emiacetalico di **3**, generando l'alcolato anomerico

altamente nucleofilo. Quest'ultimo attacca il C2 del tricloroacetone nitrile, il quale risulta elettrofilo a causa dell'effetto elettron-attrattore dei tre atomi di cloro adiacenti. Il conseguente spostamento degli elettroni del triplo legame carbonio-azoto genera un intermedio anionico, il quale viene protonato dall'acido coniugato della DBU, ripristinando il catalizzatore e portando alla formazione del gruppo tricloroacetimidato.

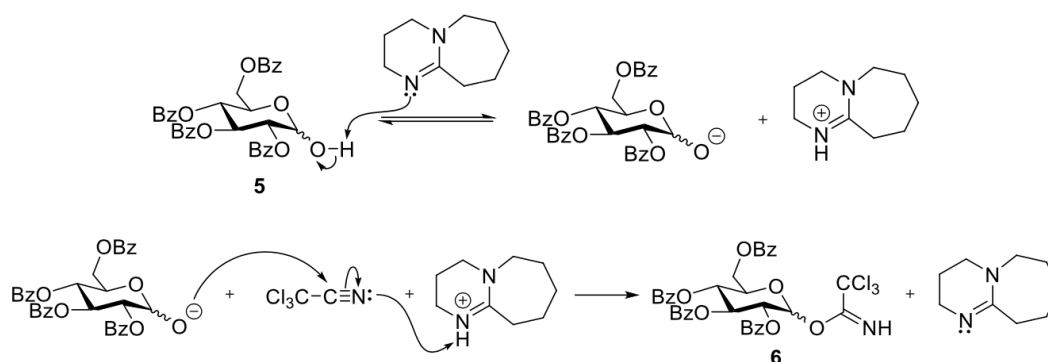


Figura 22: Rappresentazione del meccanismo di reazione tra 3 e DBU.

L'impiego di una base relativamente forte a temperatura ambiente e per un tempo prolungato permette di condurre la reazione in regime di controllo termodinamico. Infatti, nei primi istanti di reazione risulta favorita la formazione dell'anomero equatoriale, il quale risulta meno impedito stericamente e costituisce il prodotto cinetico. Tuttavia, la natura reversibile della reazione in ambiente basico permette una progressiva re-isomerizzazione e una conversione del prodotto cinetico in quello termodinamicamente più stabile.⁷⁹ Tale stabilità è dettata dal contributo anomeroico di cui abbiamo parlato in precedenza.

La reazione è stata monitorata tramite TLC e protratta fino alla completa conversione del reagente. Poiché il gruppo tricloroimmidato risulta piuttosto labile in presenza di acidi e umidità, la purificazione per rimuovere la DBU è stata condotta eseguendo un'estrazione con cicloesano bollente (200 mL/g), mantenendo in agitazione per un'ora. Questa operazione, seppur efficace nel rimuovere la DBU, ha pregiudicato la resa complessiva della reazione a causa della scarsa efficienza di estrazione. Un altro metodo utilizzato per rimuovere la DBU ha previsto la dissoluzione del campione in diclorometano (DCM) e il lavaggio della fase organica con piccole aliquote di una soluzione satura di cloruro

d'ammonio. La procedura ha avuto risultato positivo e non è stata riscontrata la decomposizione del prodotto.

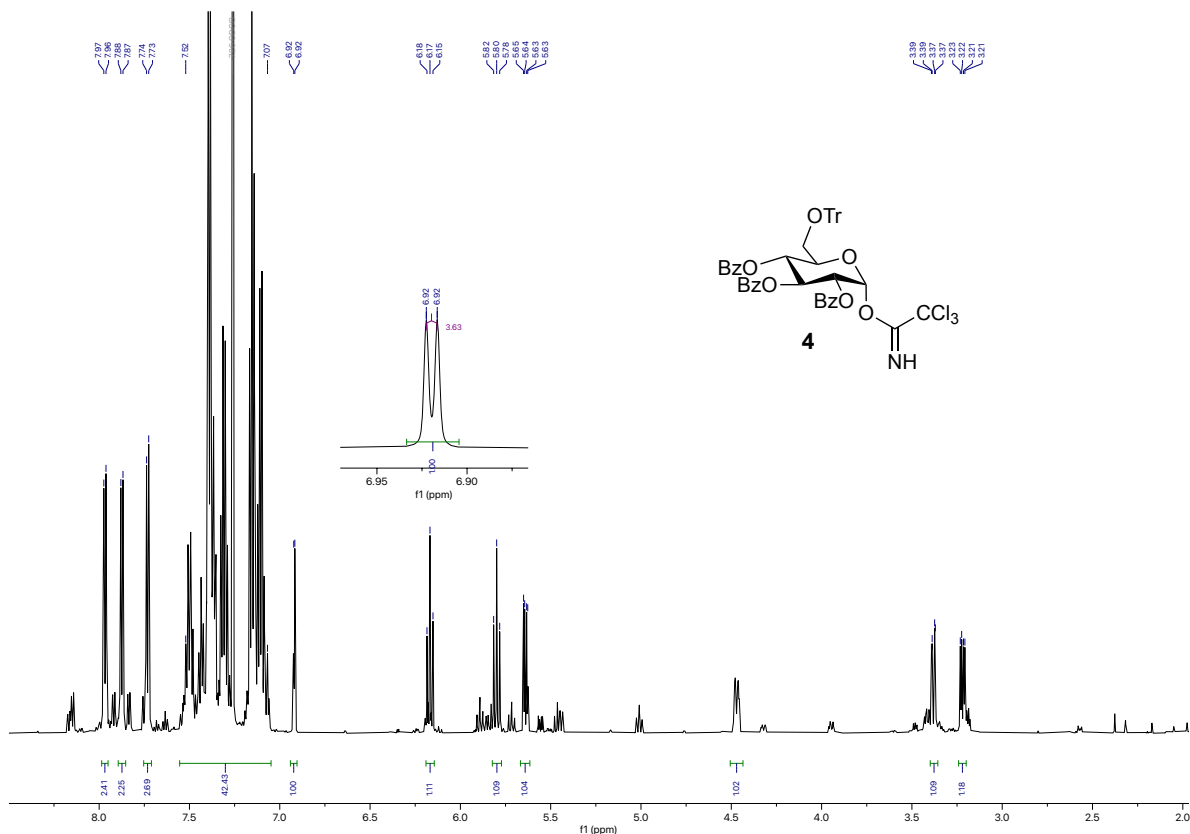


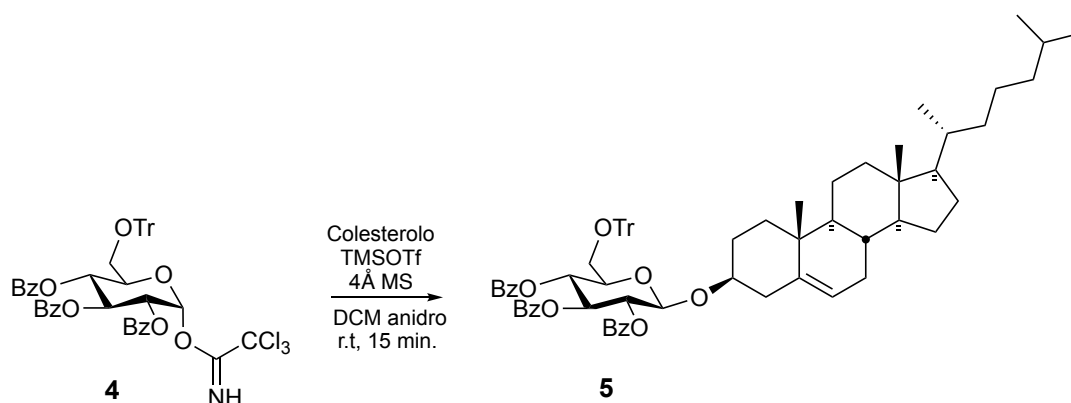
Figura 23: Spettro ^1H NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **4**.

L'introduzione del gruppo uscente condotta sull'emiacetale libero mediante reazione con tricloroacetonnitrile e la elevata stereoselettività del processo sono state confermate dall'analisi dello spettro ^1H NMR. Il dato spettroscopico principale che attesta il successo della reazione è la presenza di un solo segnale relativo al protone anomero a 6.92 ppm, il quale risulta nettamente deschermato a causa del forte effetto elettron-attrattore esercitato dal gruppo tricloroacetimidato introdotto. La costante di accoppiamento vicinale pari a 3.6 Hz conferma la formazione stereoselettiva dell'anomero alfa, in quanto si tratta del valore caratteristico di un accoppiamento di tipo *equatoriale-assiale* tra H1 e H2. A causa della presenza di un solo isomero, è possibile osservare dei segnali non sovrapposti e nettamente più risolti. Tra 7.97 ppm e 7.87 ppm è possibile osservare la presenza di tre doppietti distinti,

relativi ai sei protoni in posizione *orto* dei tre anelli benzoilici. Il tripletto a 6.17 ppm e quello a 5.80 ppm, i quali integrano un protone ciascuno, corrispondono rispettivamente ai protoni H3 e H4. Il doppietto di doppietti a 5.64 ppm è attribuibile al protone H2, il quale accoppia con H1 e H3. Il multipletto a 4.45 ppm è attribuibile al protone H5, il quale risente degli accoppiamenti con H4 e con i protoni diastereotopici H6a e H6b. I due doppietti di doppietto a 3.39 ppm e 3.22 ppm, caratterizzati da “effetto tetto”, sono generati dai protoni diastereotopici in C6 che accoppiano tra di loro e con H5. L'integrazione risulta compatibile con il prodotto desiderato **4**.

3.4 Sintesi β -Colesteril-2,3,4-tri-*O*-benzoil-6-*O*-trifenilmetil-D-glucopiranoside (**5**)

La formazione del legame glicosidico tra **4** e il colesterolo è stata condotta seguendo la procedura di glicosilazione di Schmidt.⁷⁸



Schema di reazione 4: Sintesi di **5**.

Questa reazione richiede un ambiente di reazione rigorosamente anidro, in quanto l'acqua può agire da nucleofilo competitivo, portando all'idrolisi del donatore e rigenerando l'emiacetale di partenza.

Per evitare reazioni collaterali, il sistema è stato accuratamente anidrificato fiammeggiando la vetreria e mantenendo i reagenti in agitazione con i setacci molecolari da 4Å in DCM anidro per trenta minuti. La reazione è stata innescata dall'aggiunta di una quantità catalitica di trimetilsilil trifluorometansolfonato (TMSOTf), un acido di Lewis molto forte. Il catione

trimetil silile coordina il doppietto elettronico dell'atomo di ossigeno del gruppo tricloroacetimmidato, generando un intermedio ossonio altamente polarizzato che indebolisce drasticamente il legame glicosidico. La successiva rottura eterolitica del legame comporta la formazione tricloroacetammide e genera lo ione ossocarbenio, un intermedio elettrofilo altamente reattivo.⁸⁰

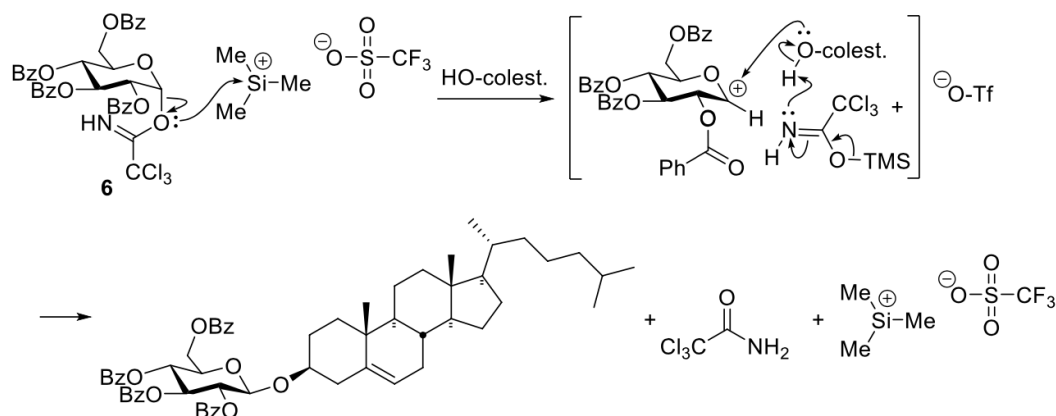


Figura 24: Rappresentazione del meccanismo di reazione tra **4** e il colesterolo in presenza di TMSOTf.

L'elevata stereoselettività del processo promuove la formazione dell'anomero beta. Questo avviene perché il gruppo protettore presente in C2 partecipa alla formula di risonanza dello ione ossocarbenio con il proprio ossigeno carbonilico, generando un intermedio ciclico a cinque termini noto come ione acilossonio. La formazione dello ione rende inaccessibile l'attacco di nucleofili in posizione assiale e costringe l'attacco del gruppo ossidrilico del colesterolo sulla faccia opposta, favorendo la configurazione beta. La reazione è stata monitorata attraverso TLC e spenta con trietilammina una volta constatata l'assenza di carboidrato residuo. A seguito della filtrazione su celite per rimuovere i setacci molecolari e l'evaporazione del solvente a pressione ridotta, la purificazione del grezzo è avvenuta mediante cromatografia flash, che ha permesso di isolare **5** con una resa del 40%.

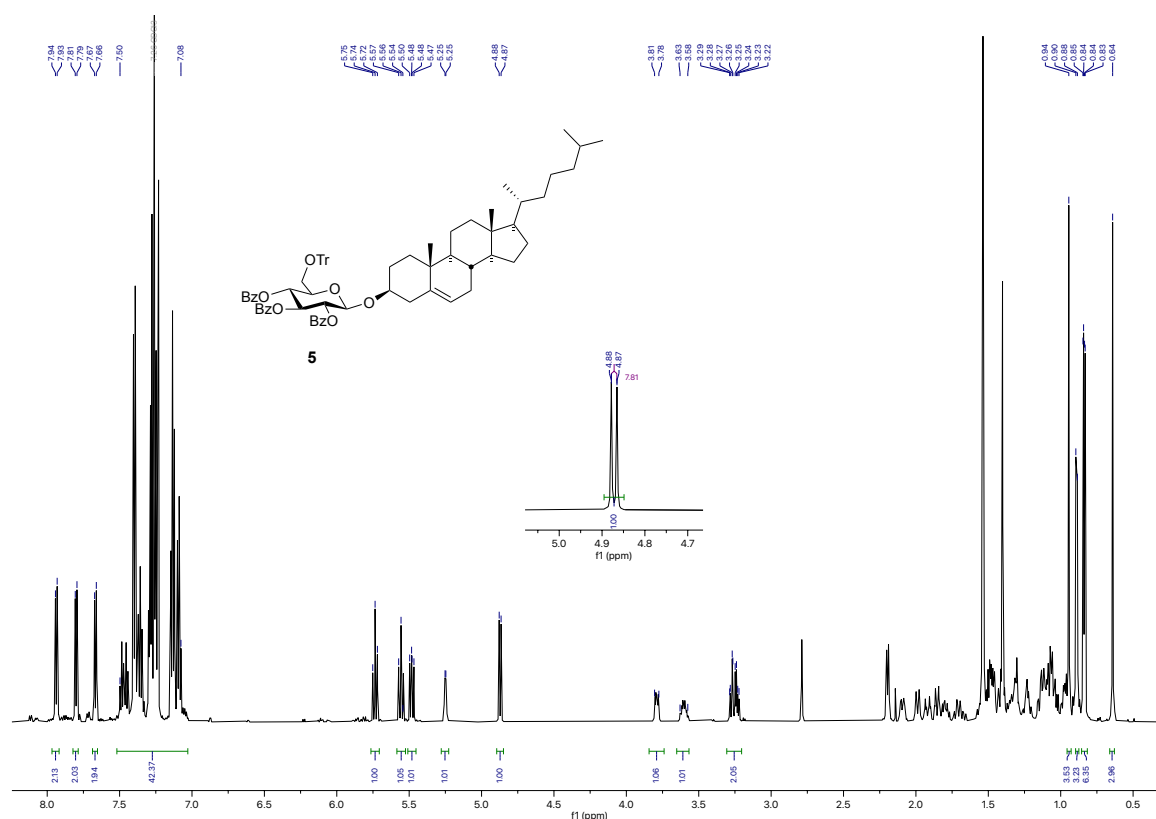


Figura 25: Spettro ^1H NMR (600 MHz) in CDCl_3 di 5.

Il segnale diagnostico di fondamentale importanza che dimostra la stereoselettività della glicosilazione è la presenza del doppietto attribuibile al protone anomero H1 a 4.88 ppm. Il valore della costante di accoppiamento vicina pari a 7.8 Hz è caratteristico dell'accoppiamento *trans*-diassiale tra il protone anomero H1 e il protone H2 in posizione adiacente, confermando la configurazione equatoriale del legame glicosidico e attestando la formazione esclusiva dell'anomero beta. La sintesi del prodotto desiderato è confermata dalla presenza del segnale relativo al protone olefinico a 5.25 ppm e dei cinque segnali metilici del colesterolo in mezzo all'esteso sistema alifatico tra 2.20 e 0.64 ppm.

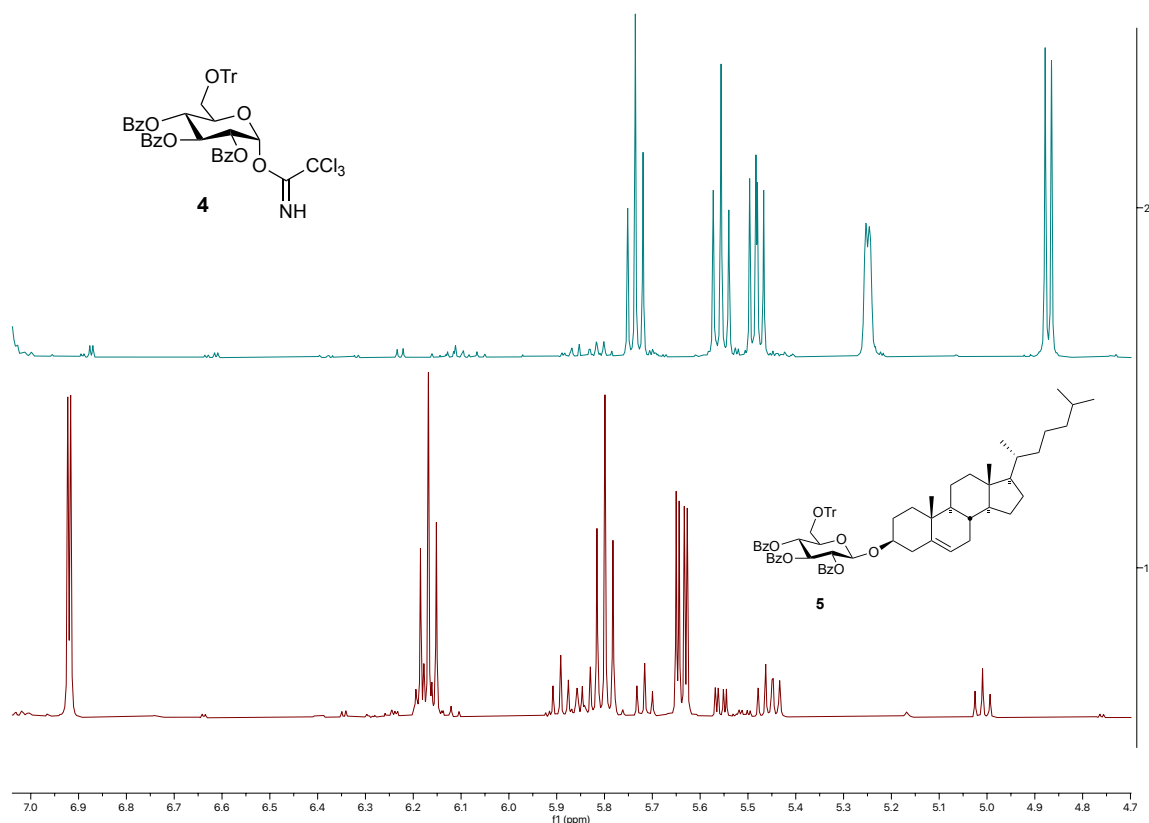
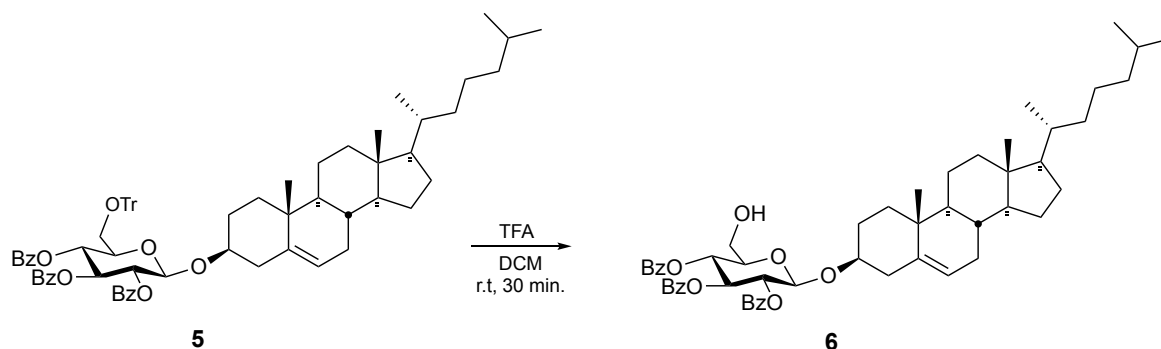


Figura 26: In alto: Spettro ¹H NMR (600 MHz) in CDCl₃ di **4**. In basso: Spettro ¹H NMR (600 MHz) in CDCl₃ di **5**. Viene evidenziato lo spostamento di chemical shift del segnale relativo al protone anomerico.

Nonostante la sintesi sia stata ripetuta più volte, la resa complessiva non ha mai superato questo valore piuttosto modesto (40%). La causa non risulta riconducibile alla presenza di umidità residua, in quanto nello spettro ¹H NMR dei grezzi di reazione non sono stati riscontrati segnali relativi al prodotto caratterizzato dall'emicetale libero. La bassa resa potrebbe essere imputabile all'insorgenza di reazioni competitive che coinvolgono l'intermedio reattivo in percorsi secondari. L'attacco sull'intermedio acilossonio può avvenire sul carbonio carbonilico del benzoile partecipante anziché sul carbonio anomerico C1, portando alla formazione di ortoesteri.⁸¹ In secondo luogo, la presenza di un acido di Lewis forte come il TMSOTf potrebbe aver causato la scissione del gruppo tritile sul C6, notoriamente acido-labile, liberando un ossidrilico primario altamente nucleofilo, il quale può competere efficacemente con il colesterolo portando all'oligomerizzazione del donatore.⁸²

È possibile provare a condurre la reazione a temperatura più bassa, cercando di rallentare la rimozione del gruppo tritilico e stabilizzare lo ione acilossonio affinché il colesterolo possa avere il tempo di attaccarlo nucleofilicamente.

3.5 Sintesi di β -colesteril- 2,3,4-tri-*O*-benzoil-D-glucopiranoside (6)



Schema di reazione 5: Sintesi di 6.

Il passaggio sintetico ha previsto la rimozione selettiva del gruppo tritile dalla posizione C6 dello zucchero al fine di rendere l'ossidrile primario disponibile per la sostituzione nucleofila sulla *minimalist aziridine*. È stata impiegata una procedura che ha permesso la rottura del legame etereo del gruppo tritile senza comportare la simultanea rimozione dei tre gruppi benzoilici e la rottura del legame glicosidico con la molecola del colesterolo.⁸³

Per raggiungere questo obiettivo è stata sfruttata l'estrema labilità del gruppo tritile in presenza di acido. La reazione è stata condotta sciogliendo **5** in diclorometano anidro e aggiungendo acido trifluoroacetico (TFA). Il meccanismo di reazione prevede la protonazione dell'atomo di ossigeno etereo in C6 e la conseguente scissione eterolitica del legame che ha portato all'espulsione del catione tritilico, il quale risulta estremamente stabile. La selettività del processo è garantita dall'uso specifico del TFA, che è un acido organico sufficientemente forte da protonare l'ossigeno etereo in C6, ma non abbastanza aggressivo da causare l'idrolisi dei benzoati o la scissione del legame glicosidico a temperatura ambiente.

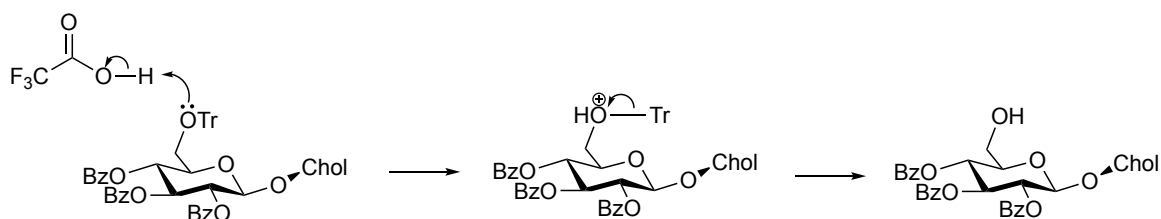
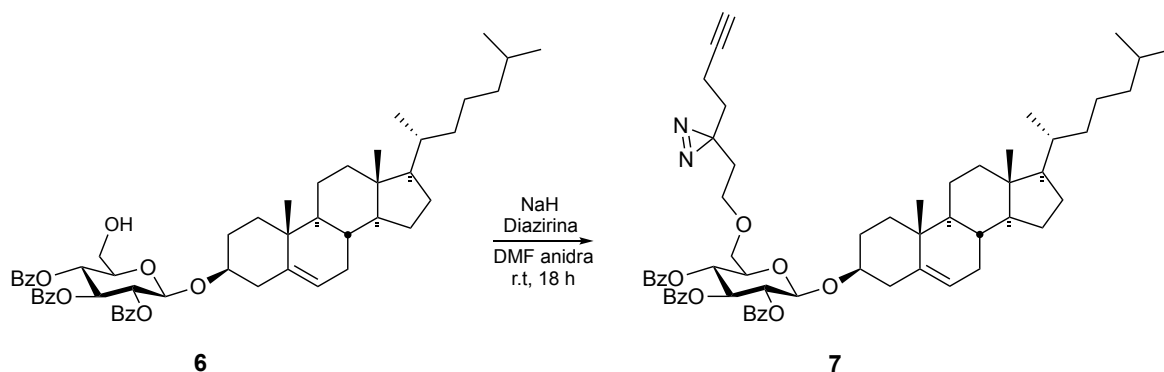


Figura 27: Rappresentazione del meccanismo di reazione tra **5** e il TFA.

Il catione tritilico, essendo un sistema coniugato, è responsabile della tipica colorazione gialla assunta dalla miscela di reazione. Per prevenire un'esposizione prolungata del substrato all'ambiente acido, la reazione è stata interrotta dopo trenta minuti mediante un *work-up* estrattivo. I lavaggi con soluzione satura di NaHCO_3 hanno permesso di neutralizzare il TFA residuo, mentre l'acqua e la salamoia hanno rimosso i sali inorganici. Il grezzo di reazione è stato purificato attraverso cromatografia flash, impiegando una miscela di acetato di etile/esano (1:9), permettendo di separare efficacemente il prodotto dal tritile rimosso.

3.6 β -Colesteril-2,3,4-tri-*O*-benzoil-6-*O*-3-(but-3-in-1-il)-3-(2-etil)-3H-diazirina-D-glucopiranoside (7)



Schema di reazione 6: Sintesi di 7.

Questo passaggio di sintesi ha previsto l'introduzione della **Diazirina** sull'ossidril primario in C6 di **6**, mediante la classica sintesi di Williamson.⁸⁴

Il sostituito costituisce la sonda bifunzionale che consente di catturare il *target* proteico con cui interagisce lo steril-glucoside e di agganciare un fluoroforo per l'imaging microscopico oppure un derivato della biotina per la purificazione e l'analisi proteomica. La procedura sperimentale ha impiegato idruro di sodio (NaH) in DMF anidra per promuovere la deprotonazione dell'alcol primario in C6 e la conseguente formazione dell'alcolato. L'ossigeno carico negativamente potrà attaccare il carbonio elettrofilo dell'agente alchilante, comportando l'espulsione dello ioduro mediante una classica reazione S_N2.

Dopo aver eseguito la procedura di *work-up* estrattivo, il solvente è stato rimosso ottenendo un grezzo di reazione oleoso di colore giallo scuro. L'analisi spettroscopica ¹H NMR del grezzo di reazione e la successiva colonna cromatografica hanno permesso di constatare che lo steril-glucoside alchilato in C6 costituisce solamente una piccola parte della miscela e che, tuttavia, ha subito la perdita di un gruppo protettore benzoilico. La maggior parte del reagente di partenza è stata convertita in una serie di sottoprodotti indesiderati a causa di meccanismi di reazione secondarie.

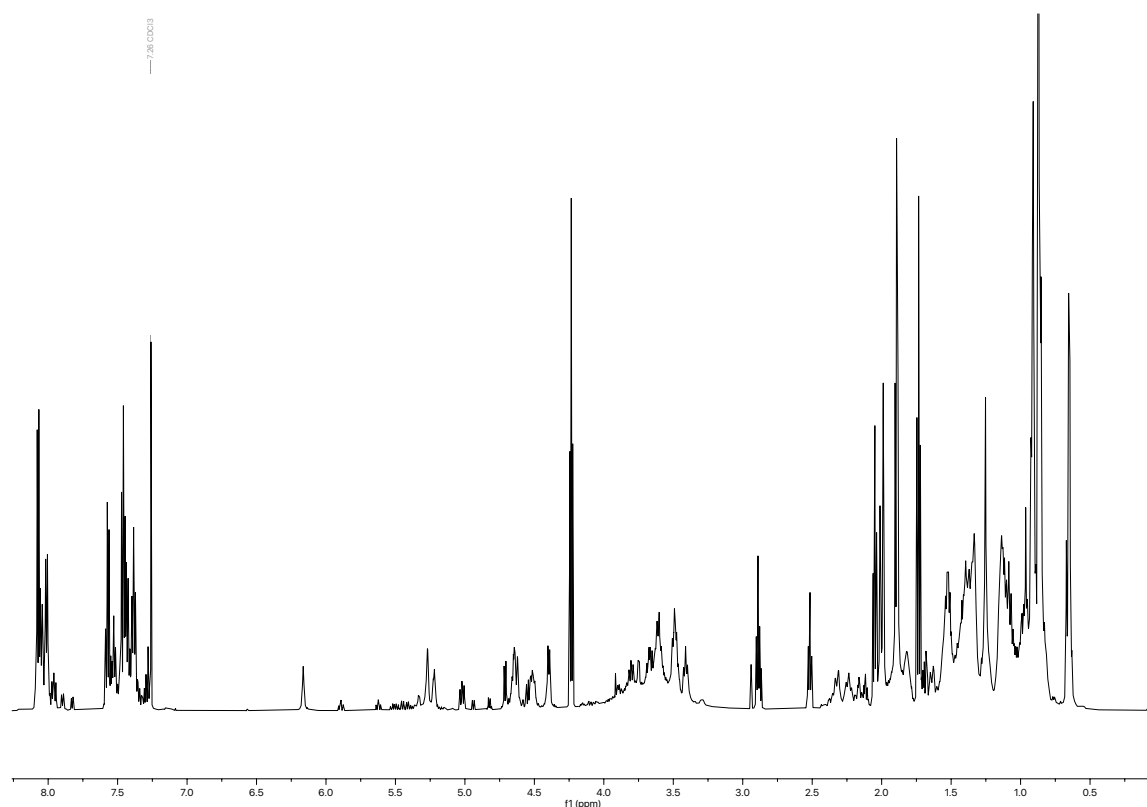


Figura 29: Spettro ^1H NMR (600 MHz) in CDCl_3 del grezzo di reazione della sintesi di 7. È possibile osservare la comparsa di multipletti complessi derivanti dalla deprotezione casuale delle posizioni piranosiche..

Il decorso indesiderato della reazione è imputabile all'incompatibilità tra l'ambiente di reazione fortemente basico e la presenza dei gruppi protettori benzoilici in posizione C1, C2 e C3 dell'anello glicosidico. Tramite l'analisi ^1H NMR delle frazioni derivanti dalla cromatografia del grezzo è stata osservata la formazione del β -colesteril-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-D-glucopiranoside verosimilmente a causa di una reazione di transesterificazione. Durante la reazione tra il substrato e il sodio idruro in assenza di diazirina, la formazione dell'alcolato in C6 ha generato un nucleofilo forte e meno ingombrato rispetto alle altre posizioni glucosidiche, il quale ha probabilmente attaccato il carbonio carbonilico elettrofilo dei gruppi benzoilici presenti su altre molecole di substrato presenti in soluzione. La transesterificazione intermolecolare ha portato al trasferimento del gruppo benzoilico da una molecola all'altra, portando all'isolamento di un prodotto caratterizzato da quattro gruppi benzoilici.

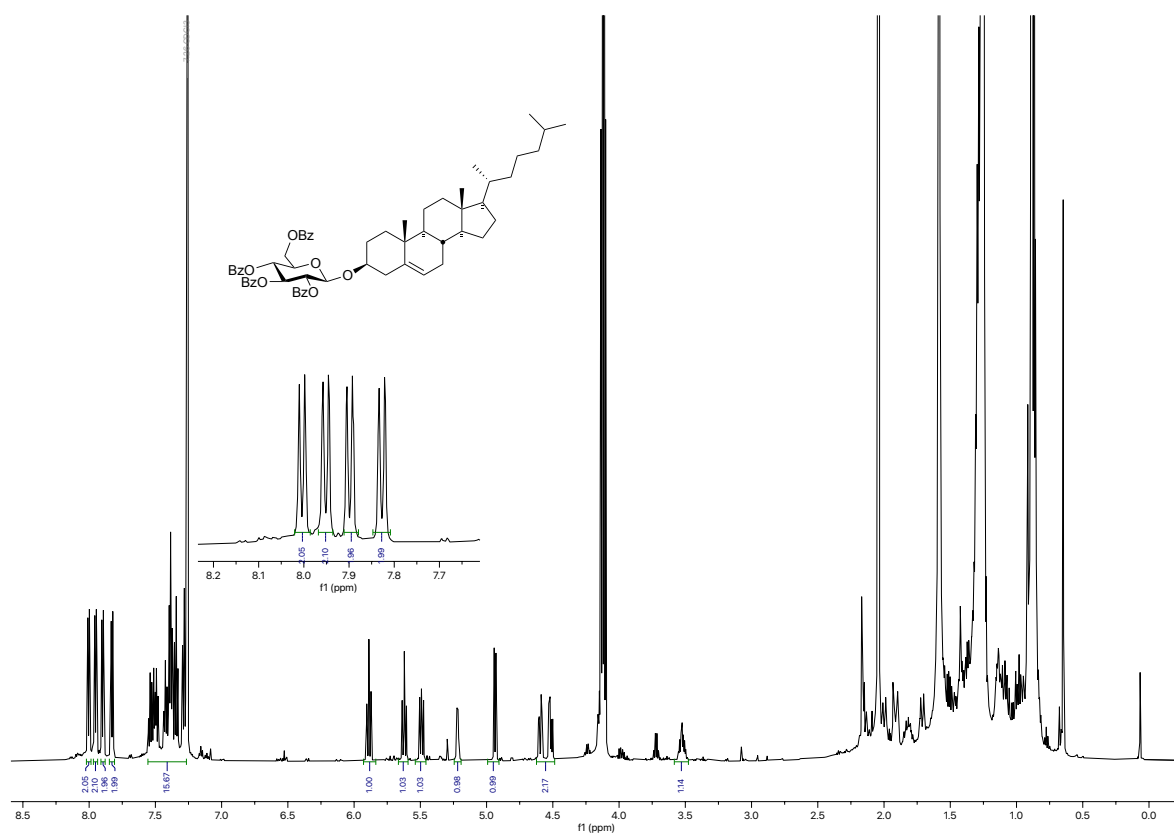


Figura 30: Spettro ¹H NMR (600 MHz) in CDCl₃ di β-cholesterol-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-d-glucopiranoside, ottenuto come prodotto indesiderato nella sintesi di 7.

Oltre alle reazioni di transesterificazione, l'isolamento di molteplici frazioni fortemente polari contenenti derivati steril-glucosidici privi di uno o più gruppi benzoilici è riconducibile alla reazione appena citata o, alternativamente alla presenza di idrossido di sodio nel sodio idruro utilizzato, dovuta all'inevitabile reazione del reagente con l'umidità atmosferica durante la conservazione. Lo ione ossidrilico non viene allontanato con i lavaggi in pentano previsti dalla procedura e agisce come nucleofilo nei confronti dei gruppi esterei, causandone la saponificazione.

Al fine di limitare le reazioni di transesterificazione si è ritenuto utile aggiungere al sodio idruro il substrato insieme alla diazirina, favorendo l'attacco nucleofilo sul carbonio legato all'atomo di iodio, non appena si fosse formato l'alcolato. Tuttavia, il risultato è stato nuovamente compromesso dall'idrolisi indesiderata dei gruppi protettori, causata

verosimilmente dall'idrossido di sodio. Questa reazione collaterale potrebbe essere evitata utilizzando del sodio idruro fresco oppure una base sufficiente a deprotonare l'alcol primario ma che non porti alla formazione di idrossidi, come il *ter*-butil litio a -78°C .

L'analisi dello spettro ^1H NMR delle frazioni 20-30 ottenute dalla cromatografia del grezzo di reazione ha permesso di identificare il prodotto alchilato che ha reagito con la diazirina, constatando che esso ha comunque subito la perdita di un gruppo benzoilico, formando il β -colesteril-3,4-di-*O*-benzoil-6-*O*-[3-(but-3-in-1-il)-3-(2-etil)-3H-diazirina]-D-glucopiranoside (**8**).

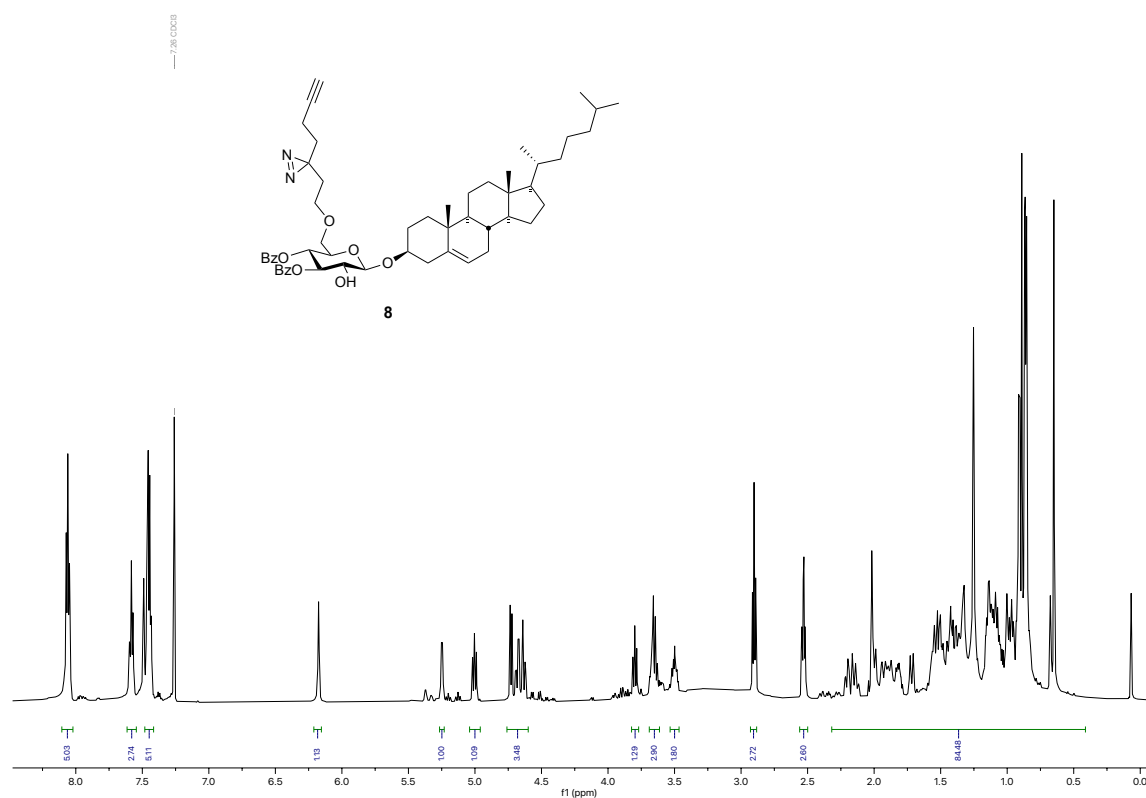
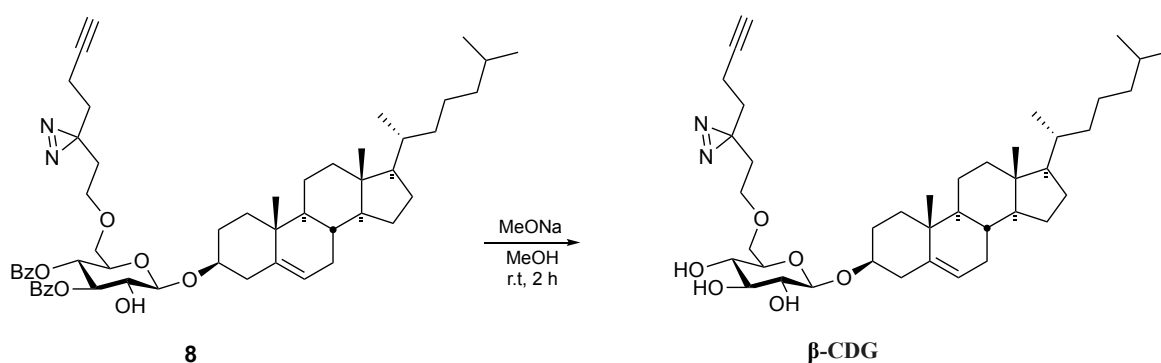


Figura 31: Spettro ^1H NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **8**, ottenuto come unico prodotto alchilato nella sintesi di **7**.

A differenza del precursore caratterizzato dalla presenza di tre gruppi benzoilici, la regione compresa tra 8.10 ppm e 7.30 ppm mostra una integrazione relativa dei protoni aromatici, che risulta coerente con la presenza di soli due gruppi benzoilici residui, tenendo conto di lievi sovrapposizioni con i segnali fondo. Il singoletto presente a 6.17 ppm è riconducibile

al protone ossidrilico derivante dalla perdita di un benzoile, che non mostra accoppiamenti nello spettro COSY. Il tripletto a 2.90 ppm è riconducibile ai protoni della diazirina prossimi al legame etereo e il tripletto di doppietti a 2.52 ppm ai protoni metilenici propargilici adiacenti al triplo legame terminale, confermando l'avvenuta formazione del prodotto. Tuttavia, poiché la quantità ottenuta risulta estremamente ridotta (8 mg), non è stata eseguita la caratterizzazione completa e non risulta possibile assegnare con precisione il relativo segnale a ciascun protone. Il successivo passaggio di sintesi ha previsto la rimozione dei due gruppi benzoilici residui, in quanto l'obiettivo di questo lavoro di tesi è quello di ottenere il prodotto completamente deprotetto.

3.7 Sintesi di β -Colesteril-6-O-[3-(but-3-in-1-il)-3-(2-etil)-3H-diazirina]-D-glucopiranoside (β -CDG)



Schema di reazione 7: Sintesi di β -CDG.

Per isolare il prodotto finale completamente deprotetto, **8** è stato impiegato nella reazione di deprotezione di Zemplén,⁸³ la quale richiede la preparazione *in situ* del metossido di sodio (MeONa) come reagente nucleofilo.

Il metossido di sodio è stato sintetizzato attraverso la reazione di ossidoriduzione tra il sodio metallico e il metanolo anidro in flusso di argon, portando alla simultanea produzione di idrogeno gassoso. La soluzione basica di MeONa è stata unita al substrato in un sistema mantenuto in atmosfera inerte di argon. Il meccanismo di reazione decorre attraverso una

transesterificazione, attraverso la quale lo ione metossido funge da forte nucleofilo e attacca il carbonio elettrofilo dei gruppi carbonilici dei gruppi benzoilici. La formazione di un intermedio tetraedrico instabile comporta l'espulsione dell'alcolato del glucoside e rilascia metilbenzoato. L'alcolato viene rapidamente protonato dal metanolo, ripristinando la neutralità nelle posizioni ossidriliche deprotette e riformando il metanolato, che risulta quindi necessario in quantità sub-stechiometriche. La completa conversione del substrato è stata confermata prelevando un'aliquota dopo due ore di reazione a temperatura ambiente. Osservando lo spettro ^1H NMR è possibile constatare la dissociazione di tutti i gruppi protettori in quanto risultano assenti i multipletti complessi caratteristici dei benzoili legati alla struttura piranosica ed è visibile esclusivamente un unico set di segnali aromatici generati dal metil benzoato.

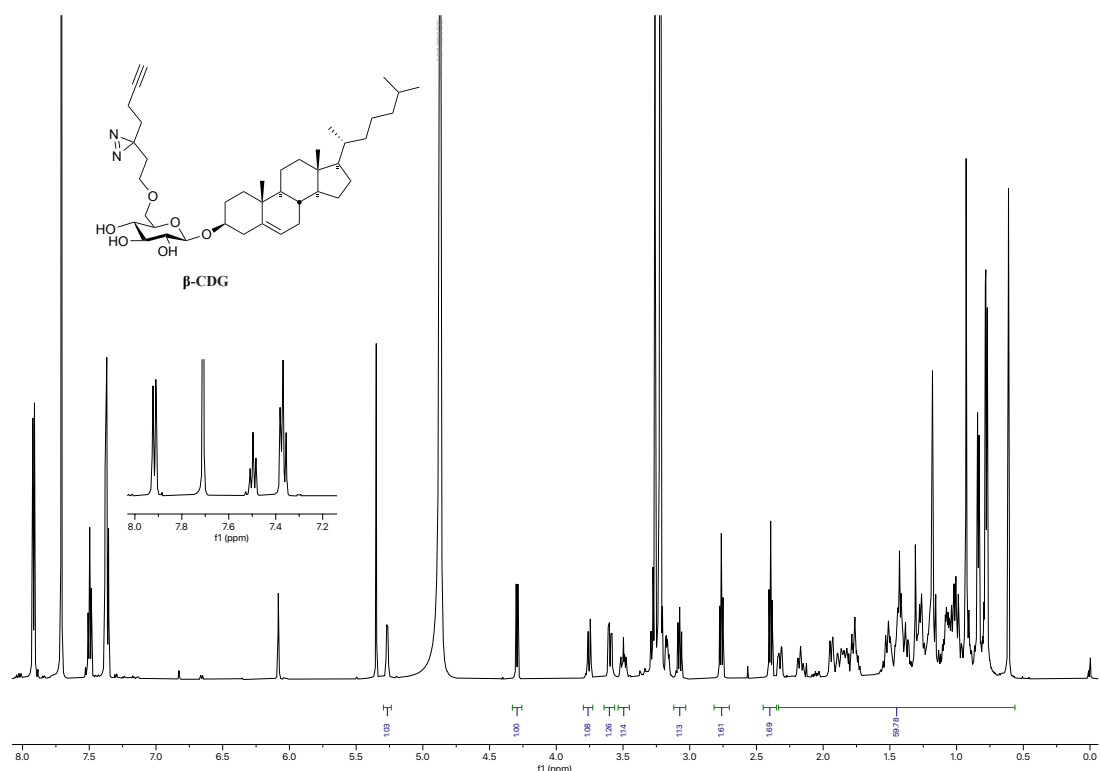


Figura 32: Spettro ^1H NMR (600 MHz) in MeOD del prelievo effettuato dopo 1.5 ore dalla reazione per la sintesi di β -CDG.

Al fine di neutralizzare la basicità dell'ambiente di reazione e isolare il prodotto, la miscela grezza è stata trattata con la resina a scambio cationico Dowex 50WX8, una resina funzionalizzata con gruppi solfonici fortemente acidi che generano un'altissima densità protonica. Tuttavia, a causa dell'aggiunta di una quantità eccessiva di Dowex questo passaggio di *work-up* ha provocato la dissociazione del sostituente diazirinico e la decomposizione del legame glicosidico dello steril-glucoside.

Infatti, la letteratura riporta che il sistema ciclico a tre termini delle 3,3-dialchildiazirine risulta fortemente instabile in ambiente acido,⁸⁵ a causa della protonazione di uno degli atomi di azoto dell'anello diazirinico che porta all'attivazione dell'anello tensionato riducendo l'energia di attivazione per l'apertura dell'anello stesso, innescando l'irreversibile estrusione di azoto molecolare gassoso e la totale decomposizione del sostituente.⁸⁶ L'idrolisi del legame *O-glicosidico* tra glucosio e colesterolo in presenza di acidi forti o resine solfoniche come la Dowex 50WX8 avviene con estrema rapidità, tramite protonazione dell'ossigeno anomero con conseguente liberazione del colesterolo libero e del carboidrato in forma cationica, che subisce rapidamente sostituzione da parte di qualsiasi nucleofilo disponibile (nel nostro caso il metanolo).⁸⁷ A causa di queste reazioni dannose, a seguito della filtrazione della resina e alla rimozione del solvente al rotavapor, non è stato possibile recuperare il composto desiderato, che è stato considerato definitivamente perduto.

Al fine di evitare la perdita di prodotto, potrebbe essere utile sostituire la resina solfonica forte come la Dowex 50WX8, con resine cationiche debolmente acide. I polimeri funzionalizzati con gruppi carbossilici, come ad esempio l'Amberlite IRC-50⁸⁸ o la Dowex MAC-3,⁸⁹ che sono in grado di neutralizzare il metossido, garantendo al contempo un'acidità locale ridotta. In alternativa, la neutralizzazione può essere condotta mediante l'aggiunta di un acido organico debole, come l'acido acetico glaciale.⁹⁰ L'aggiunta in quantità stechiometriche o in lievissimo eccesso neutralizza la base portando alla formazione di acetato di sodio, il quale verrà separato attraverso evaporazione.

4. Conclusioni e prospettive

Il lavoro svolto in questo progetto di tesi ha riguardato la progettazione e lo sviluppo di una via sintetica stereoselettiva per ottenere una sonda molecolare bifunzionale basata sul β -colesteril-D-glucosio, denominata **β -CDG**, la quale reca in posizione C6 un sostituito diazirinico utilizzato nel photoaffinity labeling. La molecola è stata concepita per fornire un efficace strumento di indagine chimico-biologica volto a chiarire il ruolo e la localizzazione del **β -CG** all'interno dei neuroni, in collaborazione con il Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Padova.

La strategia sintetica pianificata si è basata su uno schema di protezione ortogonale del D-glucosio, finalizzato ad assicurare un rigoroso controllo stereochimico sul centro anomero e a consentire di inserire il derivato diazirinico in posizione C6 dello zucchero. Relativamente alla protezione ortogonale del D-glucosio, è stato dimostrato come la procedura *one-pot* per la sintesi di **1** presenti importanti criticità per quanto riguarda la purificazione a causa della scarsa resa nella reazione di tritilazione e della conseguente formazione di 1,2,3,4,6-penta-O-benzil-D-glucopiranosio come sottoprodotto, il quale risulta difficilmente separabile mediante cromatografia. La separazione dei due passaggi sintetici conducendo prima la tritilazione in piridina a 75 °C per isolare **2** con una resa del 64% e successivamente la benzilazione completa, ha permesso di ottenere il composto **1** in forma pura e con rese pressoché quantitative. Successivamente, la deprotezione selettiva della posizione anomera mediante l'impiego di acetato di idrazina ha consentito di ottenere il composto **3**. Poiché l'analisi dei risultati ha evidenziato che l'aggiunta di ulteriori equivalenti di acetato di idrazina favoriscono la deprotezione indesiderata delle posizioni secondarie, risulta preferibile ottimizzare unicamente il tempo di reazione mantenendo la stechiometria controllata. Per quanto riguarda la sintesi del donatore tricloroacetimidato, la conversione dell'emiacetale libero **3** nel corrispondente tricloroacetimidato **4** mediante reazione con tricloroacetone nitrile e DBU ha fornito stereoselettivamente l'anomero α sotto controllo termodinamico, confermato dalla costante di accoppiamento del protone anomero ($J_{H1, H2} = 3.6$ Hz). Per la purificazione, l'estrazione con soluzione satura di NH_4Cl

in DCM si è rivelata la via più idonea ed efficace per rimuovere la DBU senza incorrere nella decomposizione del donatore labile. Nella fase di glicosilazione stereoselettiva, la reazione tra il donatore **4** e il colesterolo, promossa da quantità catalitiche di TMSOTf in DCM anidro, ha condotto alla formazione esclusiva del β -glucoside **5**, grazie all'effetto del gruppo benzoilico in C2 sull'intermedio cationi acilossonio. La configurazione β è stata confermata dalla costante di accoppiamento trans-diassiale del protone anomero ($J_{H1,H2} = 7.8$ Hz). Le rese modeste ottenute sono da attribuirsi a reazioni collaterali competitive, quali la formazione di ortoesteri o la parziale detritilazione acido-catalizzata promossa dal TMSOTf in C6 con conseguente oligomerizzazione del donatore. Nei passaggi conclusivi, la rimozione selettiva del gruppo tritile mediante TFA in DCM ha liberato l'ossidril primario in C6 preservando intatti i gruppi benzoilici e il legame glicosidico. Il successivo tentativo di alchilazione con NaH e **Diazirina** ha tuttavia risentito dell'incompatibilità tra l'ambiente fortemente basico e i gruppi protettori esterei, innescando reazioni di transesterificazione e di saponificazione che hanno portato alla produzione di β -colesteril-2,3,4,6-tetra-O-benzoil-D-glucopiranoside e di molteplici specie che hanno subito deprotezione a causa di NaOH contenuto nel sodio idruro. Ciononostante, è stato possibile isolare una frazione del derivato alchilato con due gruppi benzoilici (**8**). Infine, la deprotezione dai gruppi benzoilici residui mediante metossido di sodio in metanolo ha dimostrato la completa conversione nel prodotto deprotetto **β -CDG**. Tuttavia, la fase finale di neutralizzazione condotta con la resina a scambio cationico fortemente acida Dowex 50WX8 ha causato la decomposizione dell'anello diazirinico, sensibile agli acidi, e l'idrolisi del legame O-glicosidico, determinando la perdita del prodotto finale.

I risultati sperimentali e le criticità riscontrate consentono di delineare delle possibilità di ottimizzazione per lo sviluppo futuro del progetto. Per incrementare le rese di accoppiamento nella glicosilazione tra il donatore **4** e il colesterolo, è opportuno condurre la reazione a temperature più basse e per un tempo più lungo, così da stabilizzare lo ione acilossonio e ridurre la probabilità di scissione del gruppo tritile in C6 da parte del TMSOTf. Per quanto riguarda la reazione di alchilazione con **Diazirina**, per prevenire i fenomeni di saponificazione è possibile provare a utilizzare del sodio idruro fresco e accuratamente lavato dall'olio minerale, oppure l'uso di basi forti non nucleofile che non generano idrossidi

(butil litio a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$) ma che consentano di deprotonare l'ossidrile primario in C6. Infine, per quanto riguarda la modifica del work-up nella deprotezione di Zemplén, al fine di preservare l'integrità strutturale dell'anello diazirinico e del legame O-glicosidico durante la neutralizzazione del metossido di sodio, occorre sostituire le resine solfoniche fortemente acide (Dowex 50WX8) con resine cationiche moderatamente acide funzionalizzate con gruppi carbossilici, quali l'Amberlite IRC-50 o la Dowex MAC-3, o in alternativa effettuare la neutralizzazione mediante aggiunta stechiometrica di un acido organico debole come l'acido acetico glaciale.

Una volta isolata la sonda **β -CDG** in quantità adeguate, previa applicazione delle ottimizzazioni sintetiche descritte, il composto verrà impiegato nelle applicazioni previste in collaborazione con il Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Padova. Nell'ambito del *Photoaffinity Labeling*, l'irraggiamento UV ($\approx 350\text{ nm}$) permetterà di generare in situ l'intermedio carbenico ad alta reattività, in grado di formare un legame covalente irreversibile con le catene amminoacidiche dei target proteici che interagiscono con **β -CG** all'interno dei neuroni. Per le applicazioni di bioimaging cellulare mediante *Click Chemistry*, l'alchino terminale bio-ortogonale verrà impiegato in reazioni di cicloaddizione azide-alchino catalizzata da rame (CuAAC) con fluorofori azidici e consentirà di mappare **β -CG** nell'ambiente fisiologico. Infine, nei saggi di *pull-down* e proteomica, l'accoppiamento dell'alchino terminale con tag di affinità quali la biotina azide, permetterà l'isolamento e la successiva caratterizzazione dei complessi proteina-lipide tramite spettrometria di massa (LC-MS/MS), consentendo di identificare con precisione i substrati proteici coinvolti nella neurotossicità indotta dagli **SG**.

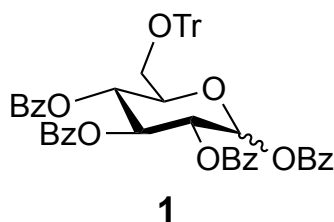
5. Parte sperimentale

5.1 Metodi generali

I reagenti e i solventi impiegati sono commercialmente disponibili presso le ditte Alpha Aesar, Sigma Aldrich, Fluka e FluorChem con elevato grado di purezza e non è stato quindi necessario procedere a purificarli ulteriormente. Nei casi in cui è stato necessario purificarli, la purificazione è avvenuta secondo i metodi rinvenibili in letteratura. I solventi impiegati nelle reazioni sono stati anidrificati ponendoli sotto atmosfera inerte con setacci molecolari 3 Å precedentemente riscaldati a pressione ridotta oppure, come nel caso del diclorometano, distillandoli sotto atmosfera inerte con calcio idruro. Per quanto riguarda la vetreria in cui sono avvenute le reazioni, questa è stata riscaldata mediante pistola termica in flusso di argon. Il controllo delle reazioni è avvenuto mediante TLC Polygram® Sil G/UV254 e TLC Polygram® Alox N/UV254, spessore 0.25 mm e spettroscopia ^1H -NMR. Le cromatografie flash sono state effettuate impiegando silica gel Merk 60 (230-400 mesh) secondo i metodi rinvenibili in letteratura. Gli esperimenti ^1H NMR, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR e 2D NMR sono stati registrati con spettrometri Bruker Ascend 400 e Bruker Ascend Evo 600 operanti nelle frequenze di 400-600 MHz per lo spettro del protone e di 75-101 MHz per lo spettro del carbonio; la temperatura del probe, se non espressamente indicata, è da intendersi pari a 298 K. Le frequenze di risonanza sono riferite al tetrametilsilano e i chemical shift, espressi in ppm, si riferiscono ai solventi deuterati impiegati. Le molteplicità sono riportate come s (singoletto), d (doppio), t (tripletto), m (multipletto) e così via.

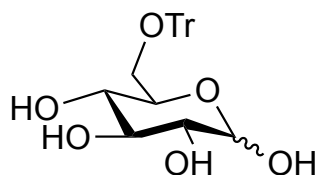
5.2 Procedure sperimentali

Sintesi *one-pot* di α - e β -1,2,3,4-Tetra-O-benzoil-6-O-trifenilmetil-D-glucopiranosio



In un pallone da 250 mL a due colli dotato di setto forabile vengono aggiunti D-glucosio (5 g, 27.8 mmol, 1.0 eq.) e trifenilmetil cloruro (9.2 g, 33.3 mmol) in flusso di argon. Viene iniettata tramite siringa DMF anidra (20 mL), Et₃N (7.0 mL, 50.2 mmol) e DMAP (1.7 mL, 13.9 mmol). La soluzione viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 18 ore. Successivamente, la soluzione viene raffreddata a -20 °C tramite bagno acetone/azoto liquido e viene aggiunta piridina (80 mL). Viene fatto gocciolare benzoil cloruro (25.8 mL, 223.7 mmol) in un periodo di 30 minuti e la soluzione viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore. La reazione viene spenta con acqua e ghiaccio (200 mL) e viene eseguita un'estrazione in AcOEt (150 mL) lavando la fase acquosa con AcOEt (2x150 mL). La fase organica viene lavata con CuSO₄ (50 mL) e NaHCO₃ (2x50 mL), anidrificata con magnesio solfato e ne viene allontanato il solvente tramite rotavapor e alto vuoto. Si ottiene un olio denso e bruno. Un'aliquota della miscela di reazione viene purificata attraverso TLC preparativa utilizzando una miscela di AcOE ed esano come eluente (4:6). ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.11 – 6.93 (m, 4H), 6.86 (d, 1H), 6.19 (d, J = 7.7 Hz, 0H), 6.09 (t, 0H), 5.91 – 5.71 (m, 1H), 5.66 (dd, 1H), 4.36 – 4.23 (m, 1H), 4.07 – 3.98 (m, 1H), 3.43 – 3.31 (m, 1H), 3.23 – 3.07 (m, 1H).

Sintesi di 6-O-trifenilmetil-D-glucopiranosio 2

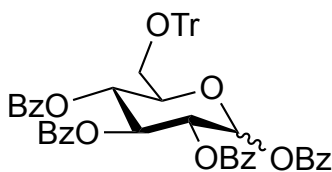


2

In un pallone da 250 mL a due colli dotato di refrigerante a bolle vengono aggiunti D-glucosio (5 g, 27.8 mmol, 1.0 eq.), trifenilmetil cloruro (8.5 g, 30.8 mmol) e piridina (60 mL) in flusso di argon. La soluzione viene mantenuta sotto agitazione a 60 °C per 18 ore. La piridina viene rimossa tramite rotavapor ottenendo un olio denso e bruno. La miscela di reazione viene purificata attraverso cromatografia flash utilizzando una miscela di AcOE ed esano come eluente (4:6). Viene ottenuto un solido bianco leggermente ceroso (7.46 g, resa: 64%) e viene registrato lo spettro ^1H NMR.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.42 – 7.35 (m, 1H), 7.20 – 7.12 (m, 5H), 7.12 – 7.04 (m, 4H), 5.05 (d, $J = 3.5$ Hz, 2H), 4.45 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 3.84 – 3.78 (m, 1H), 3.75 – 3.68 (m, 1H), 3.46 – 3.35 (m, 1H), 3.30 – 3.17 (m, 0H).

Sintesi di α - e β -1,2,3,4-Tetra-O-benzoil-6-O-trifenilmetil-D-glucopiranosio 1



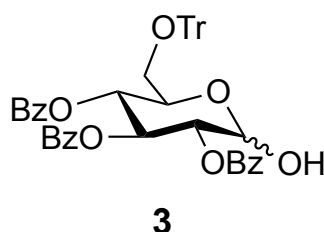
1

In un pallone da 250 mL a due colli dotato di setto forabile vengono aggiunti 6-O-trifenilmetil-D -glucopiranosio (7.46 g, 17.7 mmol, 1.0 eq.) e piridina (60 mL) in flusso di argon. la soluzione viene raffreddata a -20 °C tramite bagno acetone/azoto liquido e viene fatto gocciolare benzoil cloruro (16.6 mL, 143.9 mmol, 8 eq.) in un periodo di 30 minuti e la soluzione viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore. La reazione viene spenta con acqua e ghiaccio (200 mL) e viene eseguita un'estrazione in AcOEt (150 mL) lavando la fase acquosa con AcOEt (2x150 mL). La fase organica viene lavata con

NH₄Cl (50 mL) e NaHCO₃ (2x50 mL), anidrificata con magnesio solfato e ne viene allontanato il solvente tramite rotavapor e alto vuoto. Si ottiene un solido ceroso bruno (14.43 g, resa: 97%). Viene registrato lo spettro ¹H NMR.

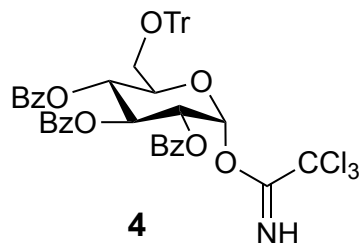
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.11 – 6.93 (m, 4H), 6.86 (d, 1H), 6.19 (d, *J* = 7.7 Hz, 0H), 6.09 (t, 0H), 5.91 – 5.71 (m, 1H), 5.66 (dd, 1H), 4.36 – 4.23 (m, 1H), 4.07 – 3.98 (m, 1H), 3.43 – 3.31 (m, 1H), 3.23 – 3.07 (m, 1H).

Sintesi di α- e β- 2,3,4-Tri-O-benzoil-6-O-trifenilmetil-D-glucopiranosio 3



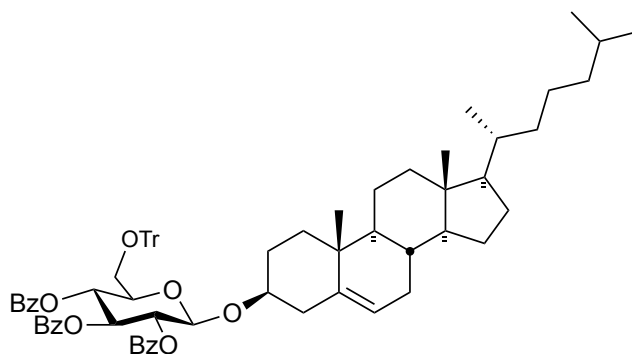
In un pallone da 250 mL a due colli viene aggiunta un'aliquota della miscela anomérica di 1,2,3,4-Tetra-O-benzoil-6-O-triphenilmethyl-D-glucopiranosio (10.38 g, 12.4 mmol, 1 eq.) e DMF (25 mL) in flusso di argon. La miscela viene mantenuta sotto agitazione e quando il solido risulta disciolto viene aggiunto acetato di idrazina (1.48 g, 16.1 mmol, 1.3 eq.). La soluzione viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 1.5 ore. La reazione viene monitorata attraverso analisi ¹H NMR e vengono aggiunti altri 0.5 eq. di acetato di idrazina, mantenendo l'agitazione per 1 ora. La reazione viene spenta con acqua (250 mL) e il precipitato bianco formatosi viene filtrato attraverso gooch e lavato con ulteriori aliquote d'acqua (3x30 mL). L'acqua residua viene rimossa attraverso alto vuoto. La miscela di reazione viene purificata attraverso cromatografia flash utilizzando una miscela di DCM ed esano come eluente (in gradiente da 7:3 a DCM puro). Si ottiene un solido bianco ceroso (5.46 g, resa: 60%) Viene registrato lo spettro ¹H NMR.

Sintesi di α -2,3,4-Tri-O-benzoil-6-O-trifenilmetil-D-glucopiranosio tricloroacetimmide **4**



In un pallone da 250 mL a due colli dotato di setto forabile viene aggiunta un'aliquota della miscela anomérica di 2,3,4-Tri-O-benzoil-6-O-trifenilmetil-D-glucopiranosio (2.07 g, 2.82 mmol, 1 eq.) e CH_2Cl_2 (20 mL) in flusso di argon. Vengono iniettati tricloroacetoneitrile (2.74 g, 19.01 mmol, 1.9 mL) e DBU (487 mg, 3.20 mmol, 0.48 mL). La miscela viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 2.5 ore. Il solvente viene rimosso tramite rotavapor ottenendo un solido molto scuro. Il prodotto viene estratto dal solido in cicloesano a riflusso (400 mL, 1 ora). Viene ottenuto un solido cristallino giallo tenue (1.36 g, 1.55 mmol, Resa: 55%). Viene registrato lo spettro ^1H NMR.

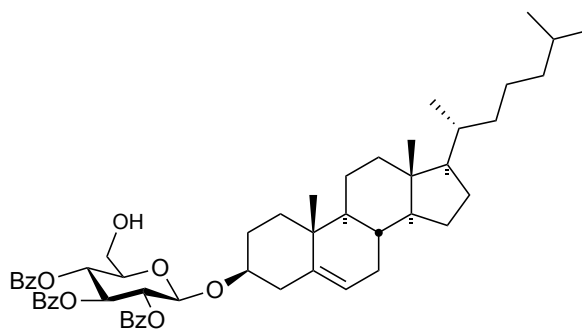
Sintesi di β -colesteril- 2,3,4-Tri-O-benzoil-6-O-trifenilmetil-D-glucopiranoside 5



5

In un tubo di Schlenk mantenuto in flusso di argon, si introducono i setacci molecolari macinati da 4Å attivati (150 °C, 300 mTorr) (90 mg) e il sistema viene fiammeggiato per rimuovere ogni traccia di umidità. Viene aggiunto il α -2,3,4-Tri-O-benzoil-6-O-trifenilmetil-D-glucopiranosio trichloroacetammide (205 mg, 0.23 mmol, 1 eq.) e il colesterolo (90 mg, 0.23 mmol, 1 eq.). Il tubo di Schlenk viene chiuso mediante setto forabile ed equalizzato attraverso un palloncino di Argon. Viene iniettato DCM anidro (3.5 mL). La reazione viene mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per 15 minuti e viene iniettato il TMSOTf (2.6 mg, 0.012 mmol, 0.05 eq.). La reazione viene mantenuta in agitazione per ulteriori 30 minuti e viene spenta con trietilammina (0.1 mL). I setacci vengono rimossi tramite filtrazione su celite e il solvente viene rimosso tramite rotavapor. La miscela di reazione viene purificata attraverso cromatografia flash utilizzando una miscela di DCM e cicloesano come eluente (5:5). Viene ottenuto un solido marrone chiaro (102 mg, 0.09 mmol, Resa: 40%). Viene registrato lo spettro ^1H NMR.

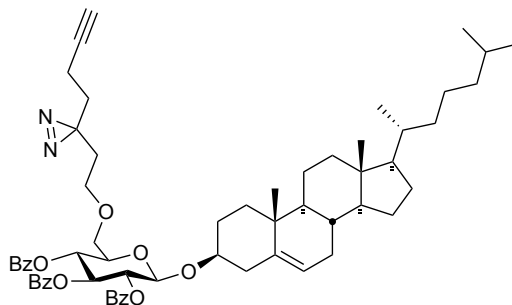
Sintesi di β -colesteril- 2,3,4-Tri-O-benzoil-D-glucopiranoside 6



6

In un pallone da 100 mL a un collo viene aggiunto β -colesteril- 2,3,4-Tri-O-benzoil-6-O-trifenilmetil-D-glucopiranoside (110 mg, 0.1 mmol, 1 eq.) e CH_2Cl_3 (2 mL). Vengono aggiunte 10 gocce di pasteur di acido trifluoroacetico (TFA) e la miscela viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti. La fase organica viene lavata con acqua (5 mL), una soluzione satura di NaHCO_3 (2×5 mL) e brine (5 mL). Il solvente viene rimosso tramite rotavaport ottenendo un solido giallo scuro, il quale viene purificato attraverso cromatografia flash utilizzando una miscela di AcOEt ed esano come eluente (1:9 AcOEt/Esano), ottenendo un solido giallo tenue (80 mg, 0.093 mmol, Resa: 93%). Viene registrato lo spettro ^1H NMR.

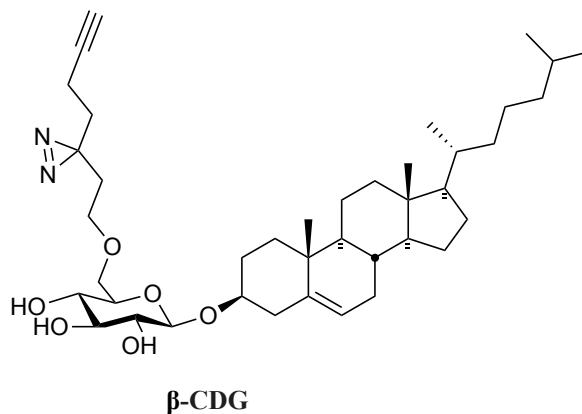
β -colesteril-2,3,4-Tri-O-benzoil-6-O-3-(but-3-in-1-il)-3-(2-etil)-3H-diazirina-D-glucopiranoside 7



7

In un pallone da 50 mL a due colli viene aggiunto NaH (60% in olio minerale, 5.58 mg, 0.2324 mmol, 2.0 eq.) in flusso di argon. Il sistema viene chiuso mediante setto forabile ed equalizzato attraverso un palloncino di Argon. Vengono effettuati dei lavaggi con pentano anidro per rimuovere l'olio minerale (3x0.5 mL) e viene iniettato il β -colesteril- 2,3,4-Tri-O-benzoil-D-glucopiranoside (100 mg, 0.1162 mmol, 1 eq.) disciolto in DMF anidra (1 mL). La soluzione viene mantenuta sotto agitazione a 0 °C per 15 minuti. Successivamente, viene iniettata (but-3-in-1-il)-3-(2-iodoetil)-3H-diazirina (43.24 mg, 0.1743 mmol, 0.026 mL, 1.5 eq.) la soluzione viene mantenuta a temperatura ambiente per 16 ore. La reazione viene spenta con metanolo (1 ml), diluita con EtOAc 10 ml) e lavata con acqua (3x5 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄, filtrata e il solvente è stato rimosso tramite rotavapor. Si ottiene un olio giallo denso.

β -colesteril-6-O-[3-(but-3-in-1-il)-3-(2-etil)-3H-diazirina]-D-glucopiranoside β -CDG



In uno shlenk viene aggiunto metanolo (1 mL) e sodio metallico (4 mg) in flusso di argon. La miscela viene mantenuta sotto agitazione a 0 °C fino a completa dissoluzione del sodio metallico. In un pallone da 50 ml viene aggiunta la miscela ottenuta dalla cromatografia della sintesi precedente (8 mg) e la soluzione di NaOMe. Il sistema viene chiuso mediante setto forabile ed equalizzato attraverso un palloncino di Argon. La reazione viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 1.5 ore e poi neutralizzata con la resina Dowex a pH 7. La resina viene filtrata e il solvente rimosso tramite rotavapor.

6. Bibliografia

1. Dugger, B. N.; Dickson, D. W. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9* (7), a028035.
2. Ross, C. A.; Poirier, M. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* **2004**, *10* (Suppl S10), S10–S17.
3. Hu, Y.; et al. Oxidative Stress and Lysosomal Dysfunction in Neurodegenerative Diseases: Underlying Mechanisms and Nanotherapeutic Targeting Strategies. *Antioxidants* **2026**, *15* (1), 73.
4. GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* **2019**, *18* (5), 459–480.
5. Gitler, A. D.; Dhillon, P.; Shorter, J. Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Dis. Models Mech.* **2017**, *10* (5), 499–502.
6. Parkinson, J. An Essay on the Shaking Palsy. Sherwood, Neely, and Jones: London, 1817; (Ristampato in: *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **2002**, *14* (2), 223–236).
7. Dorsey, E. R.; et al. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* **2018**, *17* (11), 939–953.
8. Ascherio, A.; Schwarzschild, M. A. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol.* **2016**, *15* (12), 1257–1272.
9. Klein, C.; Westenberger, A. Genetics of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2* (1), a008888.
10. Sidransky, E.; et al. Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361* (17), 1651–1661.
11. Aharon-Peretz, J.; Rosenbaum, H.; Gershoni-Baruch, R. Mutations in the Glucocerebrosidase Gene and Parkinson's Disease in Ashkenazi Jews. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351* (19), 1972–1977.
12. Hruska, K. S.; LaMarca, M. E.; Scott, C. R.; Sidransky, E. Gaucher disease: Mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum. Mutat.* **2008**, *29* (5), 567–583.
13. Dauer, W.; Przedborski, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* **2003**, *39* (6), 889–909.

14. Jankovic, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2008**, 79(4), 368–376.
15. Chaudhuri, K. R.; Healy, D. G.; Schapira, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* **2006**, 5 (3), 235–245.
16. Hornykiewicz, O. A brief history of levodopa. *J. Neurol.* **2010**, 257 (Suppl 2), S249–S252.
17. Hirano, A.; Kurland, L. T.; Krooth, R. S.; Lessell, S. Parkinsonism-dementia complex, an endemic disease on the island of Guam. I. Clinical features. *Brain* **1961**, 84 (4), 642–661.
18. Gajdusek, D. C.; Salazar, A. M. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonian syndromes in high incidence among the Auyu and Jakai people of West New Guinea. *Neurology* **1982**, 32 (2), 107–126.
19. Oyanagi, K.; et al. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Guam: neurofibrillary tangles in the spinal cord. *Acta Neuropathol.* **1994**, 87 (3), 223–229.
20. Garruto, R. M.; Yanagihara, R.; Gajdusek, D. C. Disappearance of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam. *Neurology* **1985**, 35 (2), 193–198.
21. Schulz, J. D.; Hawkes, E. L.; Shaw, C. A. Cycad toxins, *Helicobacter pylori* and parkinsonism: Cholesterol glucosides as the common denominator. *Med. Hypotheses* **2006**, 66 (6), 1222–1226.
22. Khabazian, I.; Bains, J. S.; Williams, D. E.; Cheung, J.; Wilson, J. M. B.; et al. Isolation of various forms of sterol β -D-glucoside from the seed of *Cycas circinalis*: neurotoxicity and implications for ALS-parkinsonism dementia complex. *J. Neurochem.* **2002**, 82 (3), 516–528.
23. Tabata, R. C.; Wilson, J. M.; Ly, P.; Kwok, D.; Van Kampen, J. M.; Cashman, N.; Shaw, C. A. Chronic exposure to dietary sterol glucosides is neurotoxic to motor neurons and induces an ALS-PDC phenotype. *Neuromolecular Med.* **2008**, 10 (1), 24–39.
24. Axelos, M.; Péaud-Lenoël, C. Steryl Glycosides. In *Plant Carbohydrates I: Intracellular Carbohydrates*; Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 13; Springer: Berlin/Heidelberg, 1982; pp 613–631.
25. Ferrer, A.; Altabella, T.; Arró, M.; Boronat, A. Emerging roles for conjugated sterols in plants. *Prog. Lipid Res.* **2017**, 67, 27–37.

26. Grosjean, K.; Mongrand, S.; Beney, L.; Simon-Plas, F.; Gerbeau-Pissot, P. Differential effect of plant lipids on membrane organization: Specificities of phytosphingolipids and phytosterols. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (9), 5810–5825.
27. Mishra, M. K.; Singh, G.; Tiwari, S.; Singh, R.; Kumari, N.; Misra, P. Characterization of Arabidopsis sterol glycosyltransferase TTG15/UGT80B1 role during freeze and heat stress. *Plant Signaling Behav.* **2015**, *10* (11), e1075682.
28. Marques, A. R.; Mirzaian, M.; Akiyama, H.; Wisse, P.; Ferraz, M. J.; Gaspar, P.; Ghauharali-van der Vlugt, K.; Meijer, R.; Giraldo, P.; Alfonso, P.; Irún, P.; Dahl, M.; Karlsson, S.; Pavlova, V. E.; Cox, T. M.; Scheij, S.; Verhoek, M.; Ottenhoff, R.; van Roomen, C. P.; Pannu, N. S.; van Eijk, M.; Dekker, N.; Boot, R. G.; Overkleeft, H. S.; Blommaert, E.; Hirabayashi, Y.; Aerts, J. M. Glucosylated cholesterol in mammalian cells and tissues: formation and degradation by multiple cellular β -glucosidases. *J. Lipid Res.* **2016**, *57* (3), 451–463.
29. Sonnino, S.; Prinetti, A. Membrane domains and the “lipid raft” concept. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20* (1), 4–21.
30. Akiyama, H.; Hirabayashi, Y. A novel function for glucocerebrosidase as a regulator of sterylglucoside metabolism. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2017**, *1861* (10), 2507–2514.
31. Nakayama, H.; Nagafuku, M.; Suzuki, A.; Iwabuchi, K.; Inokuchi, J. The regulatory roles of glycosphingolipid-enriched lipid rafts in immune systems. *FEBS Lett.* **2018**, *592* (23), 3921–3942.
32. Warnecke, D. C.; et al. Cloning and functional expression of a plant UDP-glucose:sterol glucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (37), 23481–23484.
33. Akiyama, H.; Kobayashi, S.; Hirabayashi, Y.; Murakami-Murofushi, K. Cholesterol glucosylation is catalyzed by transglucosylation reaction of β -glucosidase 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *441* (4), 838–843.
34. Ferraz, M. J.; et al. Lysosomal and non-lysosomal glucosylceramides in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **2016**, *1861* (9), 1151–1162.
35. Lebrun, A. H.; Wunder, C.; Hildebrand, J.; Churin, Y.; Zähringer, U.; Lindner, B.; Meyer, T. F.; Heinz, E.; Warnecke, D. Cloning of a cholesterol- α -glucosyltransferase from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (38), 27765–27772.
36. Wunder, C.; Churin, Y.; Winau, F.; Warnecke, D.; Vieth, M.; Lindner, B.; Zähringer, U.; Mollenkopf, H. J.; Heinz, E.; Meyer, T. F. Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by *Helicobacter pylori*. *Nat. Med.* **2006**, *12* (9), 1030–1038.

37. Sidransky, E.; Nalls, M. A.; Aasly, J. O.; Aharon-Peretz, J.; et al. Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361* (17), 1651–1661.
38. Gegg, M. E.; Burke, D.; Heales, S. J.; Cooper, J. M.; Hardy, J.; et al. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of Parkinson disease brains. *Brain* **2012**, *135* (4), 1302–1315.
39. Martin, E.; Schüle, R.; Smets, K.; Rastetter, A.; Boukhris, A.; et al. Loss of Function of Glucocerebrosidase GBA2 Is Responsible for Motor Neuron Defects in Hereditary Spastic Paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.* **2013**, *92* (2), 238–244.
40. Wilson, J. M. B.; Khabazian, I.; et al. Behavioral and neurological correlates of ALS-parkinsonism dementia complex in adult mice fed washed cycad flour. *Neuromolecular Med.* **2002**, *1* (3), 207–221.
41. Hawkes, E. L.; Shaw, C. A. Cycad toxins, *Helicobacter pylori* and parkinsonism: Cholesterol glucosides as the common denominator. *Med. Hypotheses* **2006**, *66* (6), 1222–1226.
42. Terrin, F.; Dalla Valle, L.; Plotegher, N.; et al. β -Sitosterol β -d-glucoside (BSSG) triggers intestinal inflammation in zebrafish and mouse models prior to neurodegeneration onset. *J. Biomed. Sci.* **2026**, *33* (1), 12.
43. Kusters, J. G.; van Vliet, A. H.; Kuipers, E. J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19* (3), 449–490.
44. Shen, X.; Yang, H.; Wu, Y.; Zhang, D.; Jiang, H. Meta-analysis: Association of *Helicobacter pylori* infection with Parkinson's diseases. *Helicobacter* **2017**, *22* (5), e12398.
45. Pierantozzi, M.; Pietroiusti, A.; Galante, A.; Sancesario, G.; Lunardi, G.; Fedele, E.; Giacomini, P.; Stanzione, P. *Helicobacter pylori*-induced reduction of acute levodopa absorption in Parkinson's disease patients. *Ann. Neurol.* **2001**, *50* (5), 686–687.
46. Phelps, M. E. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (16), 9226–9233.
47. Coenen, H. H.; Laufer, P.; Stöcklin, G.; Wienhard, K.; Pawlik, G.; Böcher-Schwarz, H. G.; Heiss, W. D. 3-N-(2-[¹⁸F]-fluoroethyl)-spiperone: a novel ligand for cerebral dopamine receptor studies with pet. *Life Sci.* **1987**, *40*(1), 81–88.
48. Gallagher, B. M.; Ansari, A.; Atkins, H.; Casella, V.; Christman, D. R.; Fowler, J. S.; Ido, T.; MacGregor, R. R.; Som, P.; Wan, C. N.; Wolf, A. P.; Kuhl, D. E.; Reivich, M. Radiopharmaceuticals XXVII. ¹⁸F-labeled 2-deoxy-2-fluoro-d-glucose as a

- radiopharmaceutical for measuring regional myocardial glucose metabolism in vivo: tissue distribution and imaging studies in animals. *J. Nucl. Med.* **1977**, *18* (10), 990–996.
49. Reivich, M.; Kuhl, D.; Wolf, A.; Greenberg, J.; Phelps, M.; Ido, T.; Casella, V.; Fowler, J.; Hoffman, E.; Alavi, A.; Som, P.; Sokoloff, L. The [¹⁸F]fluorodeoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization in man. *Circ. Res.* **1979**, *44* (1), 127–137.
 50. Pauwels, E. K.; Ribeiro, M. J.; Stoot, J. H.; McCready, V. R.; Bourguignon, M.; Mazière, B. FDG accumulation and tumor biology. *Nucl. Med. Biol.* **1998**, *25* (4), 317–322.
 51. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599.
 52. Borsato, G.; Carnio, F.; Lunardon, S.; Moletta, M.; Pavan, G.; Terrin, F.; Scarso, A.; Plotegher, N.; Fabris, F. A β -Glucosyl Sterol Probe for in situ Fluorescent Labelling in Neuronal Cells to Investigate Neurodegenerative Diseases. *Chem. Eur. J.* **2024**, *30* (41), e202400778.
 53. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.
 54. Smith, E.; Collins, I. Photoaffinity labeling in target- and binding-site identification. *Future Med. Chem.* **2015**, *7*(2), 159–183.
 55. Dormán, G.; Prestwich, G. D. Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18* (2), 64–77.
 56. Das, J. Aliphatic diazirines as photoaffinity probes for proteins: recent developments. *Chem. Rev.* **2011**, *111*(8), 4405–4417.
 57. Rix, U.; Superti-Furga, G. Target profiling of small molecules by chemical proteomics. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5* (9), 616–624.
 58. Li, Z.; Hao, P.; Li, L.; Tan, C. Y.; Cheng, X.; Chen, G. Y.; Sze, S. K.; Shen, H. M.; Yao, S. Q. Design and synthesis of minimalist terminal alkyne-containing diazirine photocrosslinkers and their incorporation into kinase inhibitors for cell- and tissue-based proteome profiling. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (33), 8551–8556.
 59. Wolfe, S.; Whangbo, M.-H.; Mitchell, D. J. On the magnitudes and origins of the “anomeric effects”, “exo-anomeric effects”, “reverse anomeric effects”, and C–X and C–Y bond-lengths in XCH₂YH molecules. *Carbohydr. Res.* **1979**, *69* (1), 1–26.
 60. Tvaroška, I. Dependence on saccharide conformation of the one-bond and three-bond carbon proton coupling constants. *Carbohydr. Res.* **1990**, *206* (1), 55–64.

61. Demchenko, A. V. 1,2-cis O-Glycosylation: Methods, Strategies, Principles. *Curr. Org. Chem.* **2003**, 7 (1), 35–79.
62. Kirby, A. J. *The Anomeric Effect and Associated Stereoelectronic Effects*; Springer-Verlag: Berlin, 1983.
63. Crich, D. Mechanism of a chemical glycosylation reaction. *Acc. Chem. Res.* **2010**, 43 (8), 1144–1153.
64. Lemieux, R. U.; Hendriks, K. B.; Stick, R. V.; James, K. Halide ion catalyzed glycosidation reactions. Syntheses of α -linked disaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97 (14), 4056–4062.
65. Fraser-Reid, B.; Wu, Z.; Andrews, C. W.; Skowronski, E.; Bowen, J. P. Torsional effects in glycoside reactivity: saccharide couplings mediated by acetal protecting groups. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113 (4), 1434–1435.
66. Wulff, G.; Röhle, G. Results and Problems of O-Glycoside Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1974**, 13(3), 157–170.
67. Panza, M.; Pistorio, S. G.; Stine, K. J.; Demchenko, A. V. Automated Chemical Oligosaccharide Synthesis: Novel Approach to Traditional Challenges. *Chem. Rev.* **2018**, 118 (17), 8105–8150.
68. van der Vorm, S.; Hansen, T.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Codée, J. D. C. The influence of acceptor nucleophilicity on the glycosylation reaction mechanism. *Chem. Sci.* **2017**, 8 (3), 1867–1875.
69. van der Vorm, S.; van Hengst, J. M. A.; Bakker, M.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Codée, J. D. C. Mapping the Relationship between Glycosyl Acceptor Reactivity and Glycosylation Stereoselectivity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57 (27), 8240–8244.
70. Yu, B.; Xie, J.; Deng, S.; Hui, Y. First Synthesis of a Bidesmosidic Triterpene Saponin by a Highly Efficient Procedure. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121 (51), 12196–12197.
71. Horton, D.; Lauterbach, J. H. Relative reactivities of hydroxyl groups in carbohydrate derivatives. Specific NMR spectral assignments of acetyl groups in methyl tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranoside and related derivatives. *J. Org. Chem.* **1969**, 34 (1), 86–92.
72. Kawabata, T.; Muramatsu, W.; Nishio, T.; Shibata, T.; Schedel, H. A Catalytic One-Step Process for the Chemo- and Regioselective Acylation of Monosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (42), 12890–12895.

73. Bock, K.; Duus, J. Ø. A Conformational Study of Hydroxymethyl Groups in Carbohydrates Investigated by ^1H NMR Spectroscopy. *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13* (4), 513–543.
74. Amigues, E. J.; Greenberg, M. L.; Ju, S.; Chen, Y.; Migaud, M. E. Synthesis of cyclophospho-glucoses and glucitols. *Tetrahedron* **2007**, *63* (40), 10042–10053.
75. Levy, D. E.; Fügedi, P. *The Organic Chemistry of Sugars*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2006; pp 135–138.
76. Excoffier, G.; Gagnaire, D.; Utile, J.-P. Coupure sélective par l'hydrazine des groupes acétyles anomériques de résidus glycosyles acétylés. *Carbohydr. Res.* **1975**, *39* (2), 368–373.
77. Deng, S.; Yu, B.; Xie, J.; Hui, Y. Highly Efficient Glycosylation of Sapogenins. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (19), 7265–7266.
78. Schmidt, R. R.; Michel, J. Facile Synthesis of α - and β -O-Glycosyl Imidates; Preparation of Glycosides and Disaccharides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19* (9), 731–732.
79. Schmidt, R. R.; Stumpp, M. Glycosyl Imidates, 8. Formation of O-Glycosyl Imidates – Kinetic and Thermodynamic Control. *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, *1983* (7), 1249–1256.
80. Schmidt, R. R. Anomeric-Oxygen Activation for Glycoside Synthesis: The Trichloroacetimidate Method. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21–123.
81. Crich, D.; Li, W. Direct Chemical Glycosylation with Glycosyl Donors Bearing Participating Groups: Dioxolenium Intermediate vs. Orthoester Formation. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (20), 7794–7799.
82. Hung, S. C.; Thopate, R. C.; Chi, F. C.; Chang, S. W.; Li, Y. C. TMSOTf-Promoted Cleavage of Trityl Groups and Concurrent Glycosylation: Mechanisms and Side-Product Analysis in Carbohydrate Synthesis. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (11), 3708–3713.
83. Li, X.-D.; et al. Synthesis of some phenylpropanoid glycosides (PPGs) and their acetylcholinesterase/xanthine oxidase inhibitory activities. *Molecules* **2011**, *16* (5), 3580–3596.
84. Šamšulová, V.; Šedivá, M.; Kóňa, J.; Klaudiny, J.; Poláková, M. A Comparison of the Antibacterial Efficacy of Carbohydrate Lipid-like (Thio)Ether, Sulfone, and Ester Derivatives against *Paenibacillus* larvae. *Molecules* **2023**, *28* (6), 2516.
85. Hashimoto, M.; Hatanaka, Y. Recent Progress in Diazirine-Based Photoaffinity Labeling. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008* (15), 2513–2523.

86. Su, Z.; Hu, C. Three-Membered Rings With Two Heteroatoms Including Other Elements. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry IV*; Elsevier, 2020; Vol. 1, pp 701–724.
87. Münger, L. H.; Jutzi, S.; Lampi, A. M.; Nyström, L. Comparison of Enzymatic Hydrolysis and Acid Hydrolysis of Sterol Glycosides from Foods Rich in Δ^7 -Sterols. *Lipids* **2015**, 50 (8), 735–748.
88. Oscarson, S.; et al. Selective Zemplén deacetylation in the presence of acid-sensitive acetal groups using Amberlite IRC-50 resin. *Carbohydr. Res.* **2020**, 495, 108080.
89. Gandra, S.; et al. Deprotection of ester-protected glycosides with NaOMe and neutralization via weak acidic ion-exchange resin Dowex MAC-3. *Molecules* **2021**, 26 (15), 4512.
90. Poláková, M.; et al. Deprotection strategies in carbohydrate chemistry: Zemplén deacetylation and acetic acid quenching for sensitive glycosides. *Carbohydr. Res.* **2019**, 483, 107750.

7. Spettri

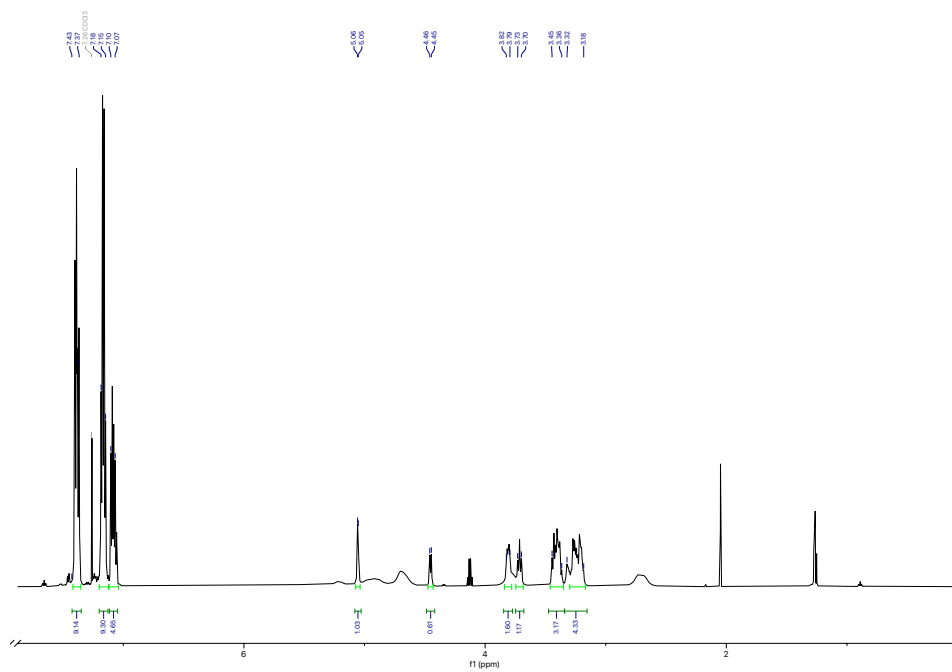


Figura 33: ¹H NMR (600 MHz) in CDCl₃ di 2.

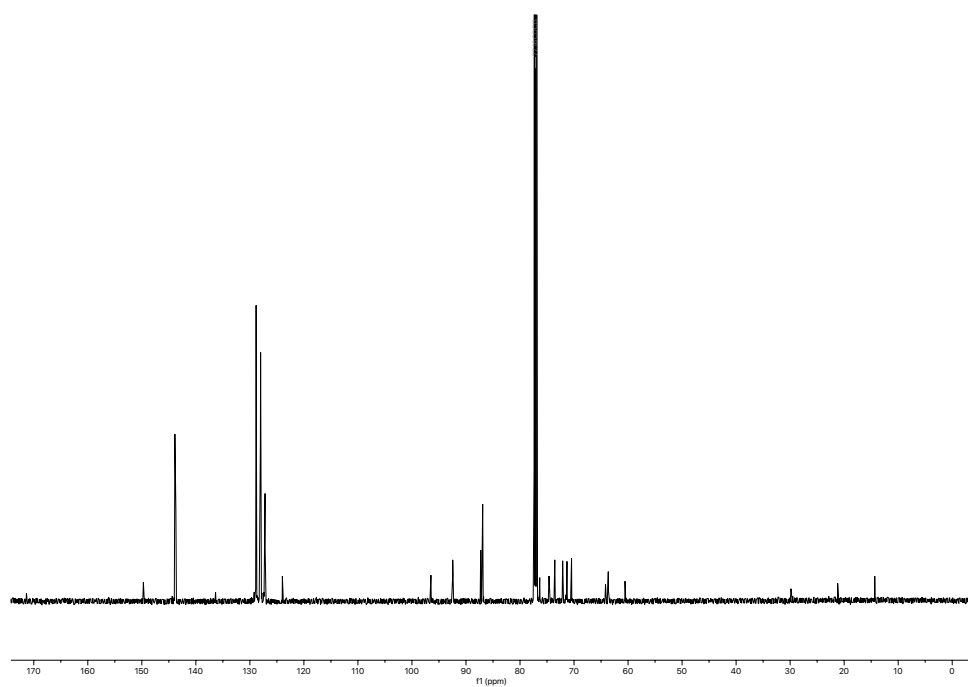


Figura 34: ¹³C NMR (150 MHz) in CDCl₃ di 2.

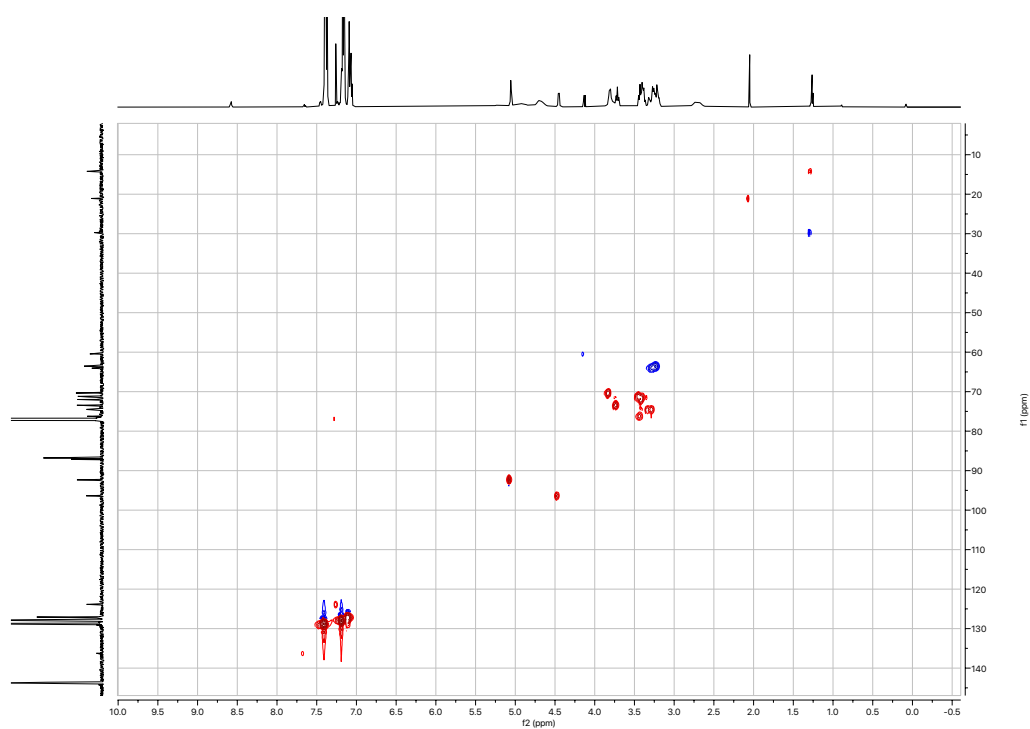


Figura 35: HSQC NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **2**.

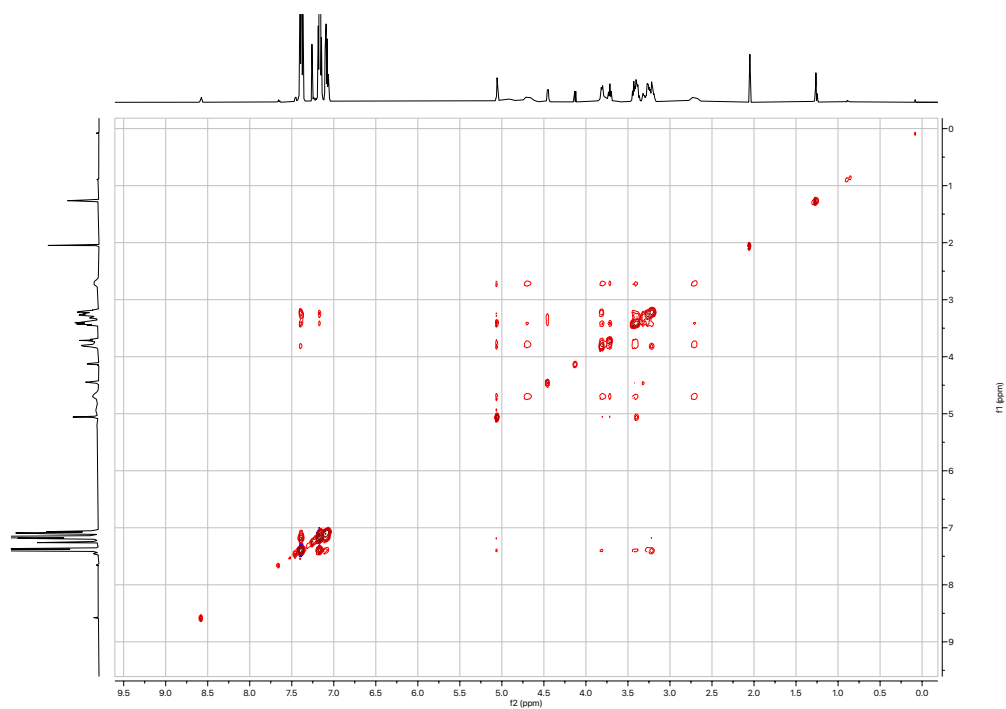


Figura 36: NOESY NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **2**.

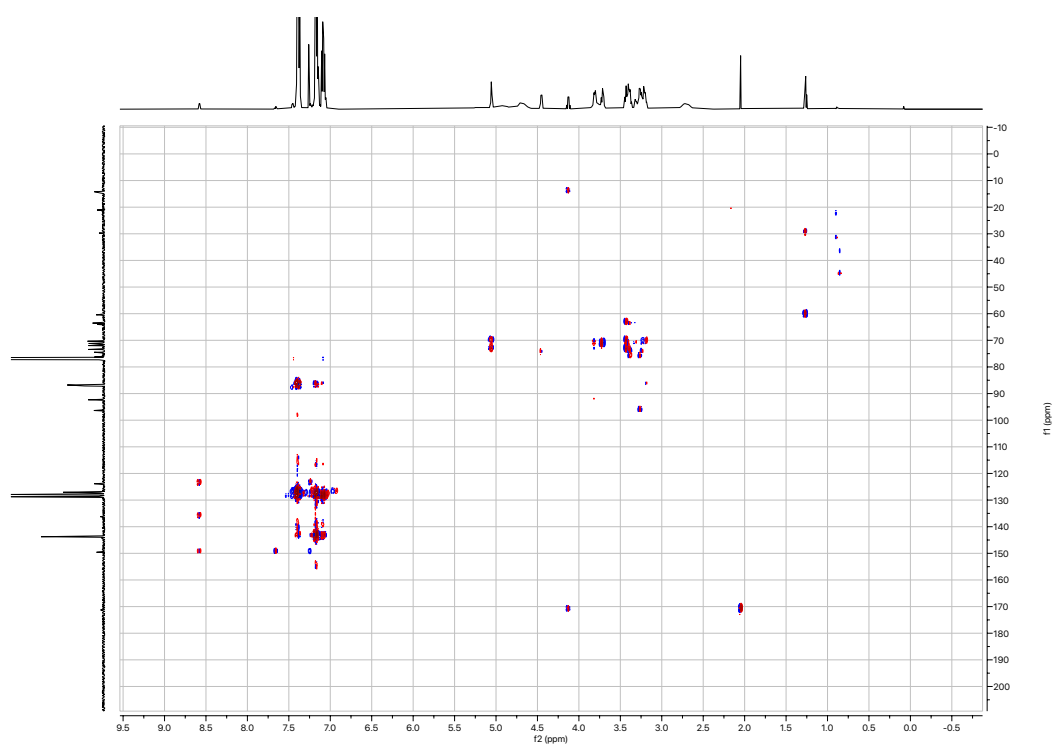


Figura 37: HMBC NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **2**.

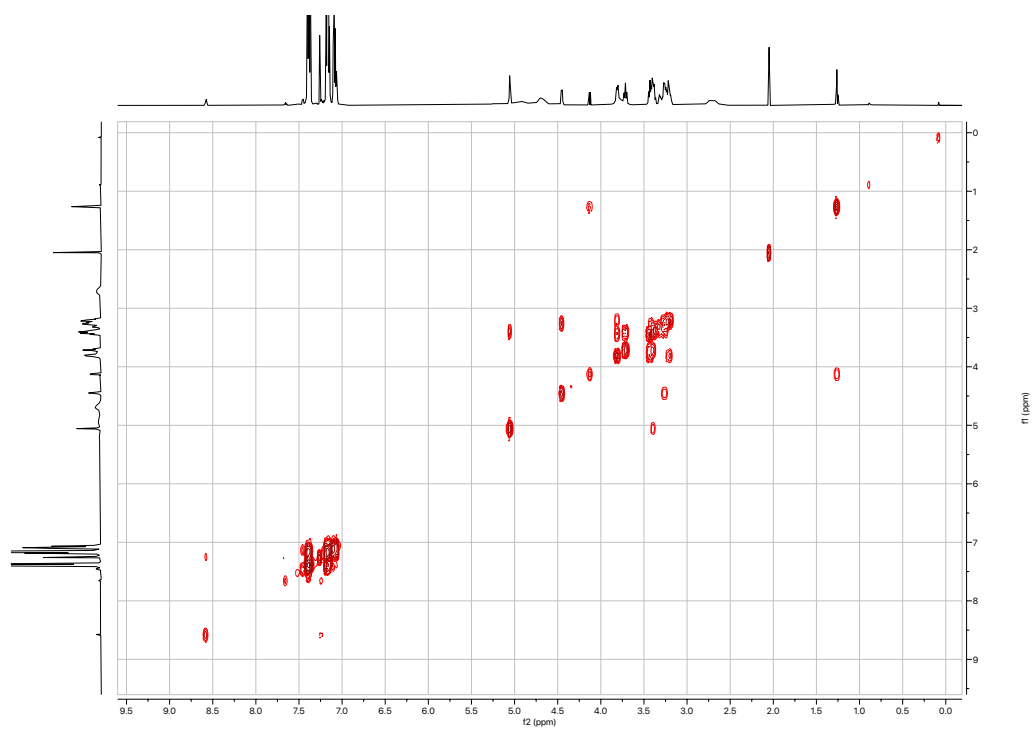
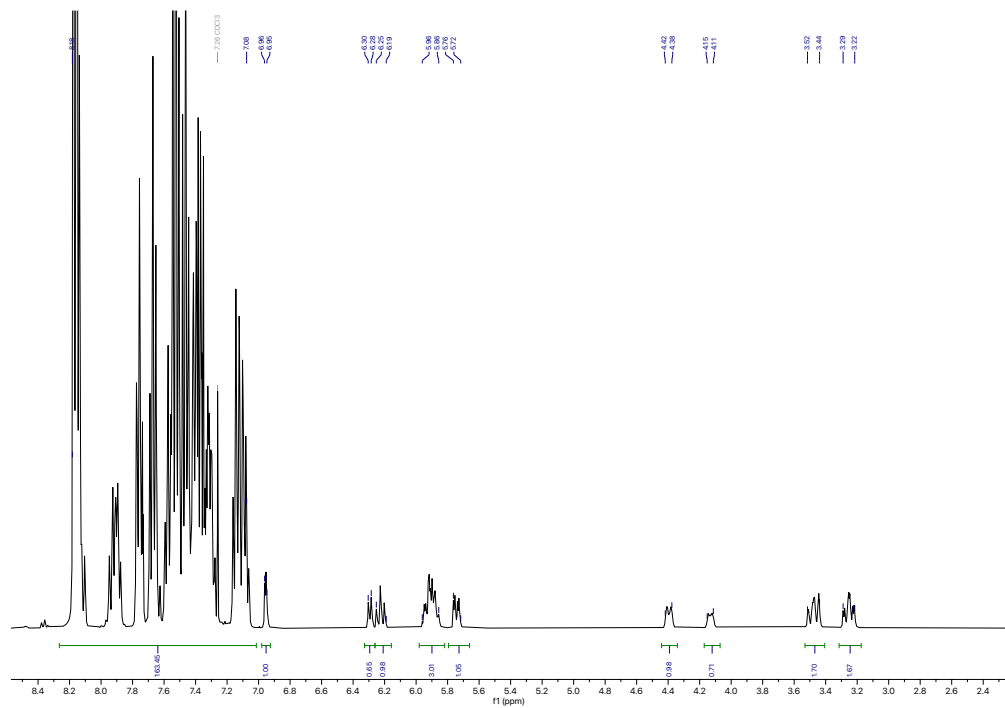
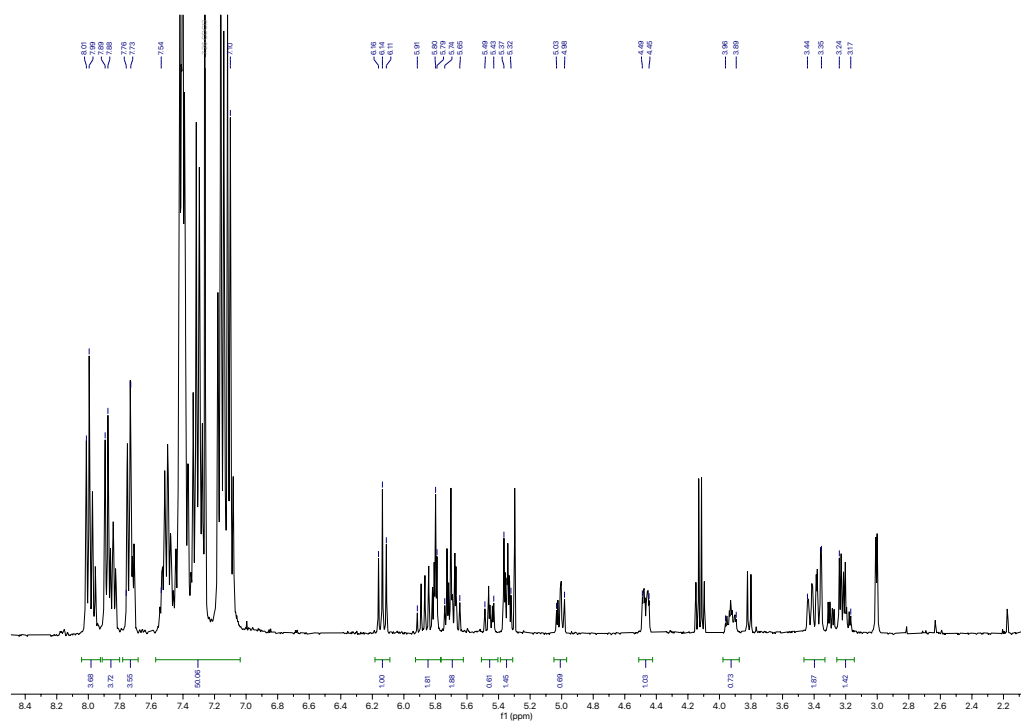


Figura 38: COSY NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **2**.





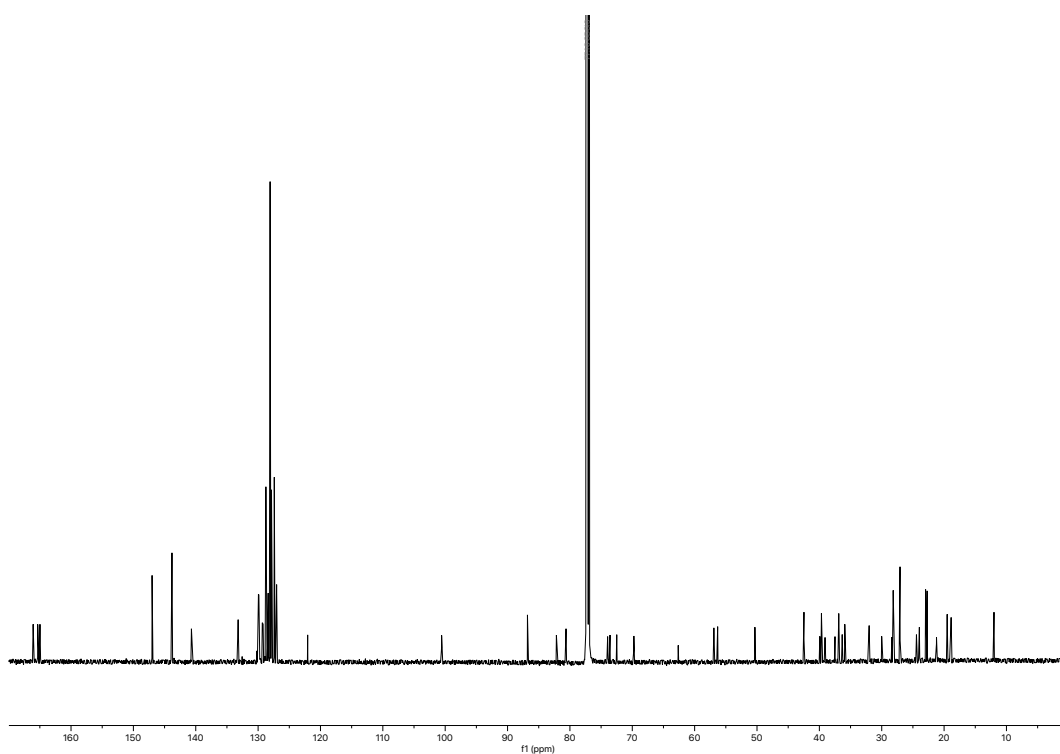


Figura 43: ^{13}C NMR (150 MHz) in CDCl_3 di **5**.



Figura 44: COSY NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **5**.

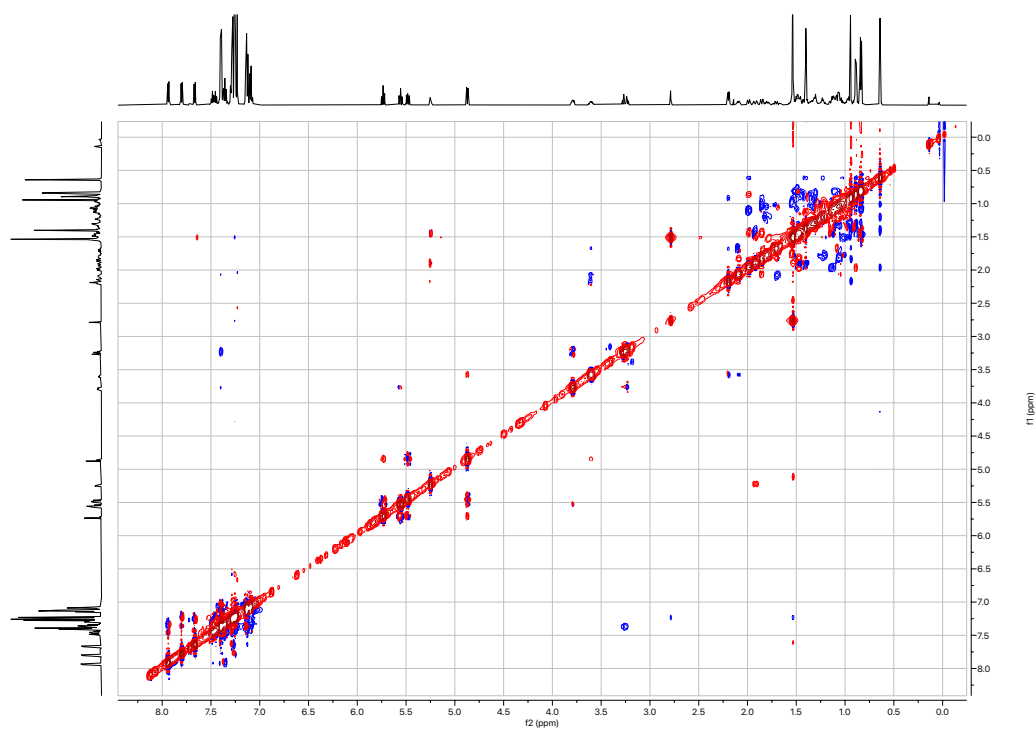


Figura 45: NOESY NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **5**.

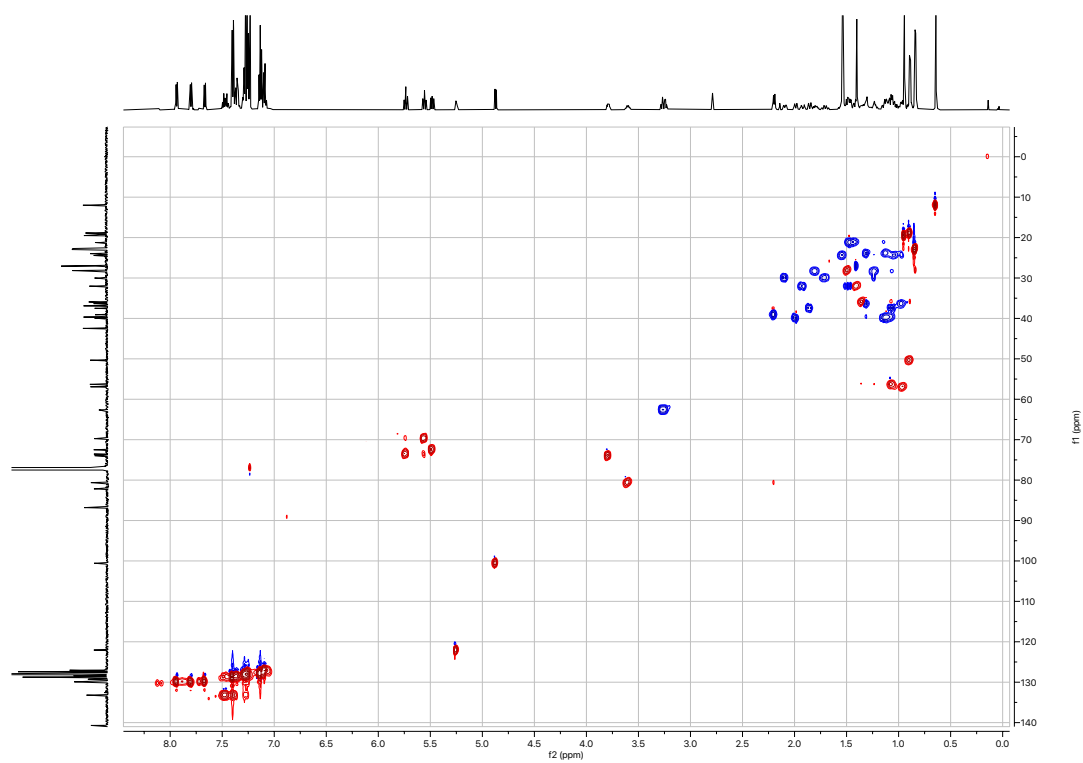


Figura 46: HSQC NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **5**.

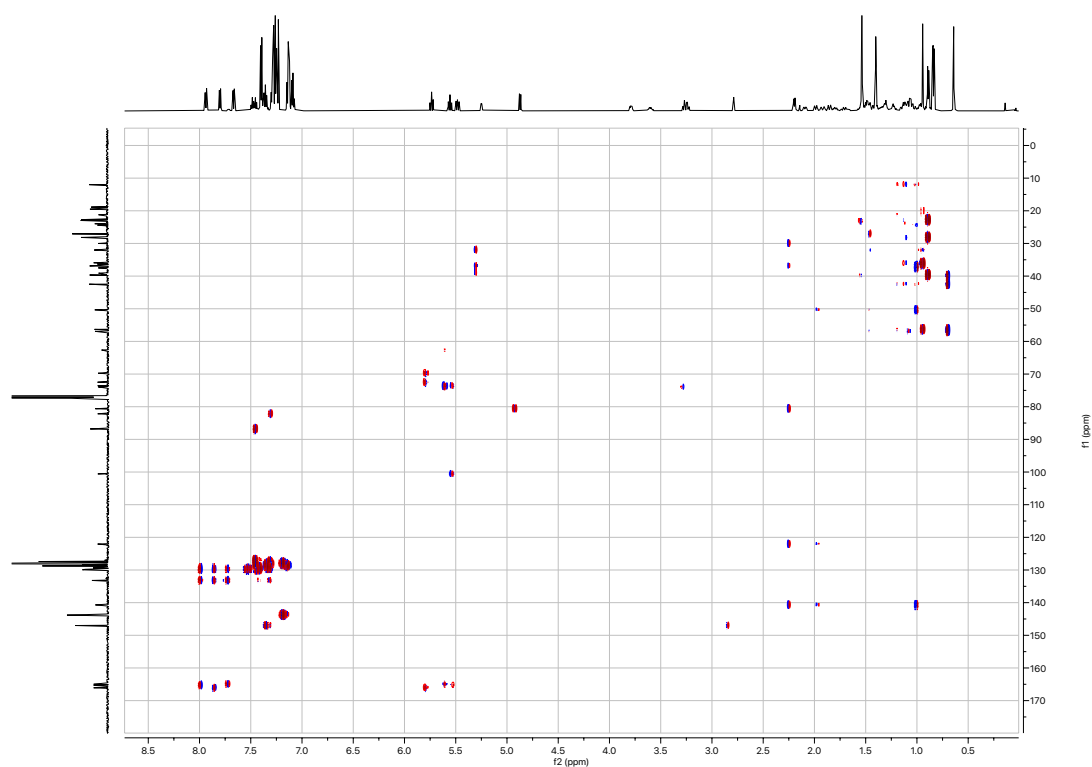


Figura 47: HMBC NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **5**.

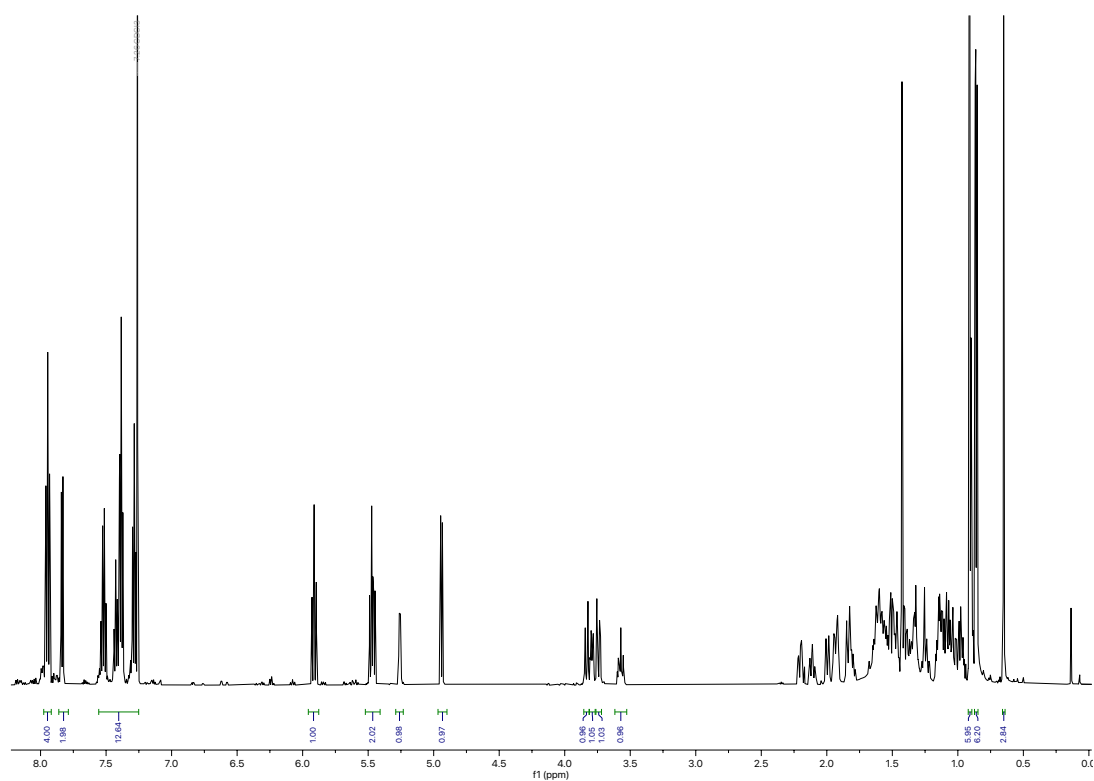


Figura 48: ^1H NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **6**.

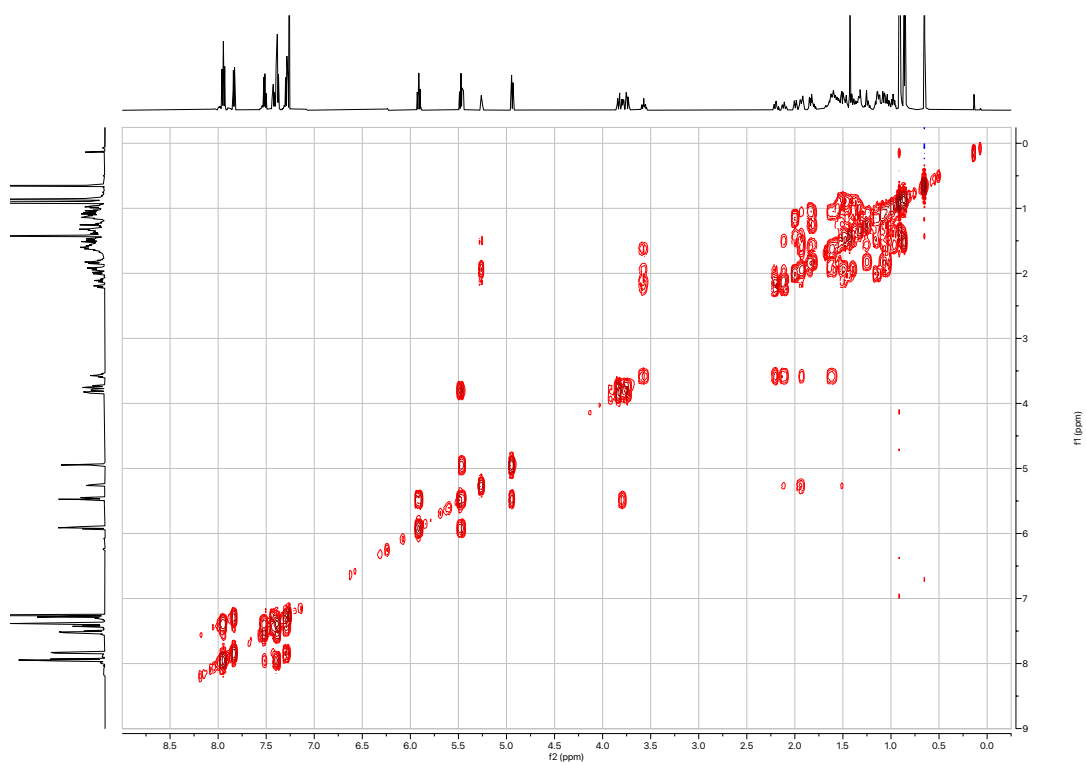


Figura 49: COSY NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **6**.

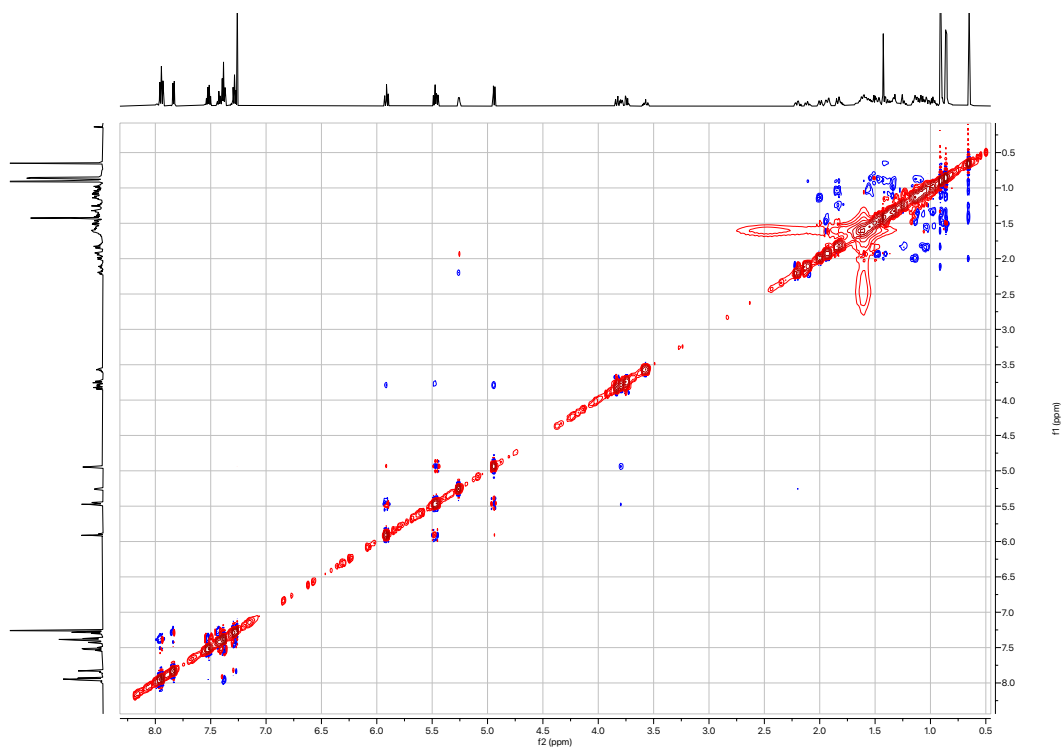


Figura 50: NOESY NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **6**.

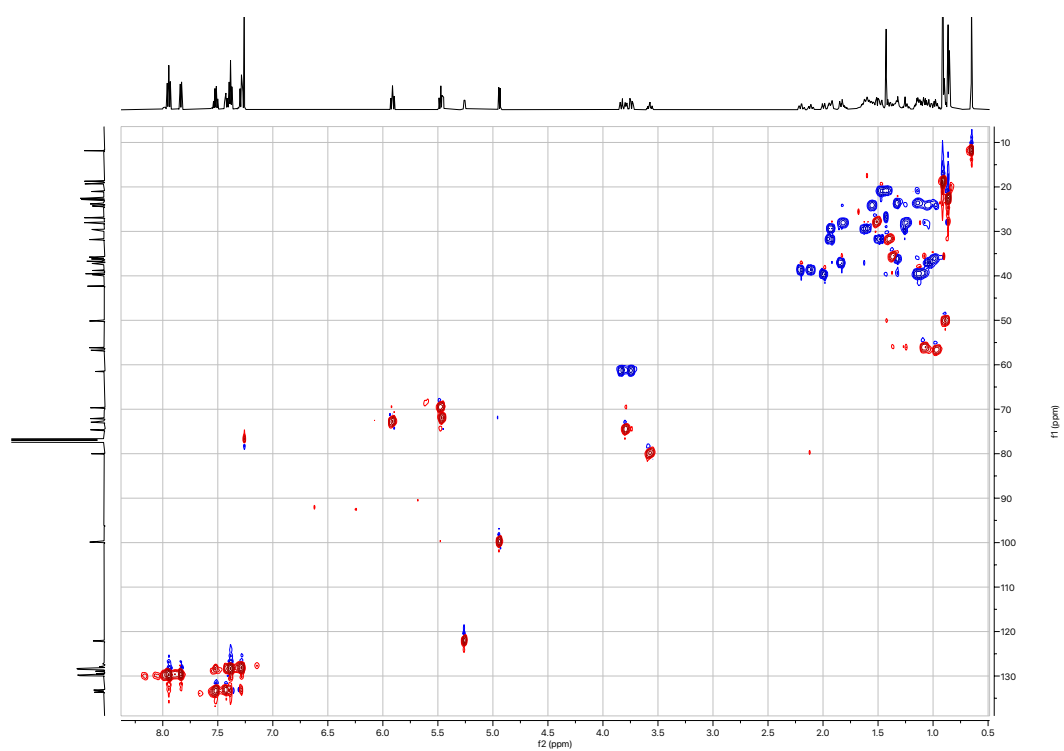


Figura 51: HSQC NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **6**.

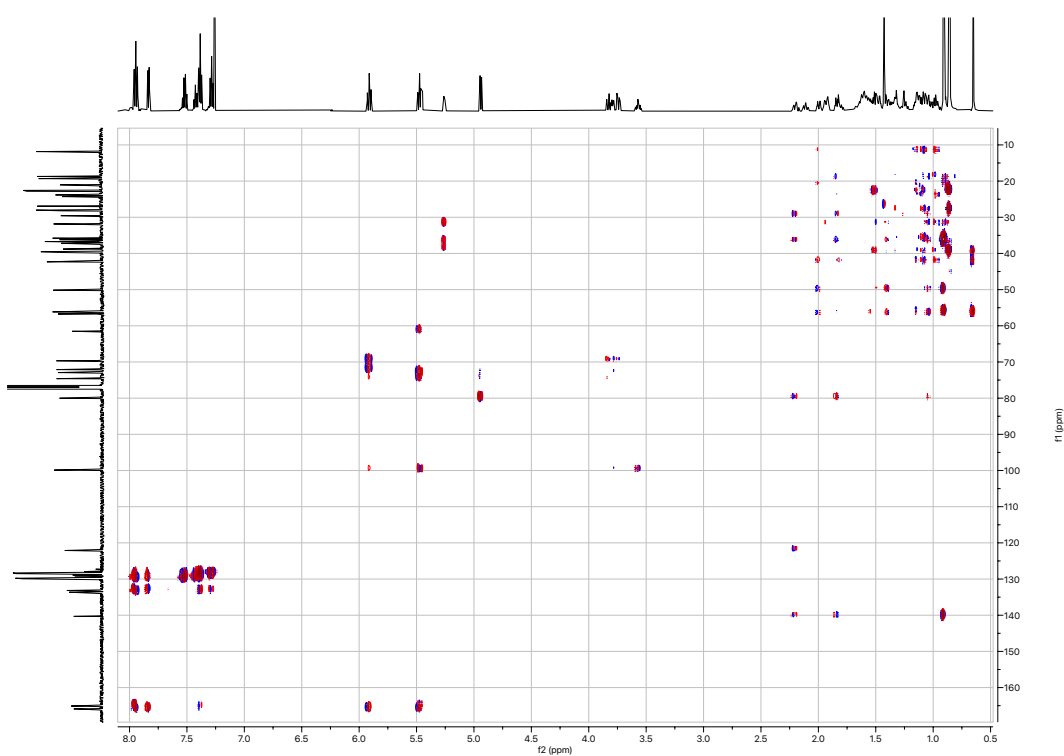


Figura 52: HMBC NMR (600 MHz) in CDCl_3 di **6**.

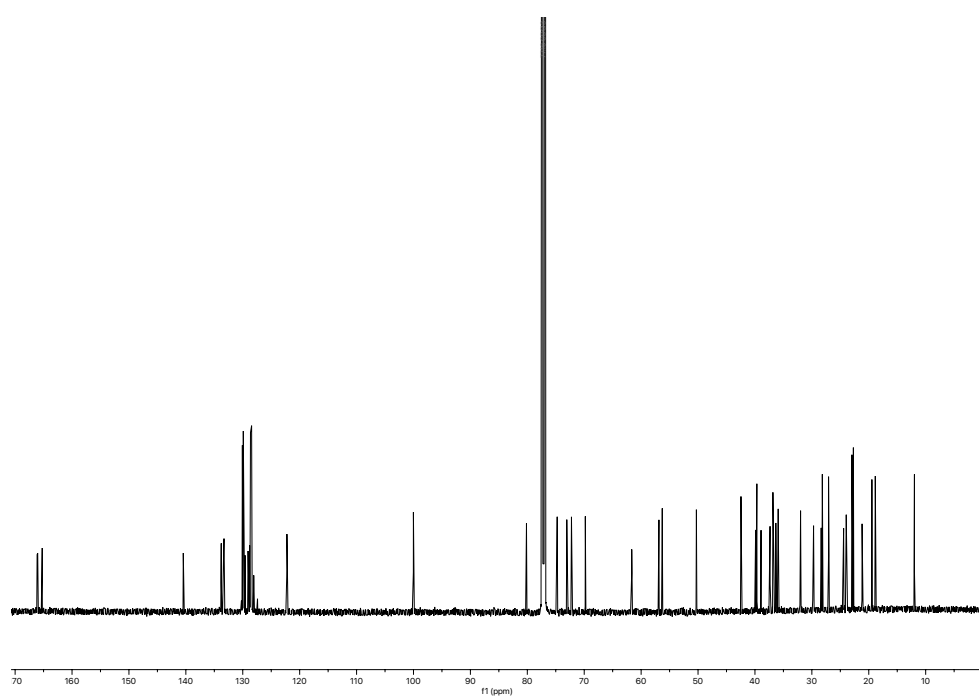


Figura 53: ^{13}C NMR (150 MHz) in CDCl_3 di **6**.