

Reazione di Schmidt sui flavanoni. Sintesi di 2.3-diidro-2-fenil-1.4-benzossazepin-5-(4H)-oni

DOMENICO MISITI e VALENTINO RIMATORI

Laboratori di Chimica Terapeutica

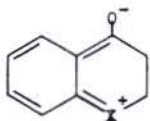
Riassunto. — La reazione di Schmidt sul 6-metil, 6-nitro e 8-nitro-flavanone porta essenzialmente alla formazione di 2.3-diidro-2-fenil-1.4-benzossazepin-5-oni per alchil-migrazione accanto a piccole quantità di composti derivanti dall'aril-migrazione. Sono confrontati i rapporti alchil : aril migrazione ottenuti per questi flavanoni con quelli relativi al flavanone.

Summary (*The Schmidt reaction on flavanones: synthesis of 2.3-dihydro-2-phenyl-1.4-benzoxazepin-5-(4 H)-ones*). — 6-methyl, 6-nitro and 8-nitro flavanones were submitted to the Schmidt reaction giving 2.3-dihydro-2-phenyl-1.4-benzoxazepin-5-ones as major compound. The ratio of the respective isomeric products by alkyl and aryl migration have been determined and compared with that of the flavanone.

Il meccanismo della reazione di Schmidt su chetoni asimmetrici è influenzato da effetti sterici ed elettronici (SCHMIDT, HUNGER & HOFFMANN, 1956; ARCUS, COOMBS & EVANS, 1956; SMITH & ANTONIADES, 1960; MIREK, 1962). In particolare è stato dimostrato che la reazione di Schmidt su chetoni aromatici, quali ad esempio l'acetofenone, l'1-indanone e l'1-tetralone, porta essenzialmente alla formazione di N-aril-ammidi attraverso una migrazione del gruppo arile (WOLFF, 1946; SMITH, 1963). Inoltre, nella reazione di Schmidt sull'1-indanone, sostituito in posizione *orto* o *para* al carbonile con un gruppo metossi, si ottengono quantità equimolecolari dei prodotti derivanti dalla aril-migrazione e dalla alchil-migrazione (MINAMI *et al.*, 1965; BARSKY & BENCZE, 1971). L'influenza dell'effetto elettronico è ancora più evidente nella reazione sui 4-cromanoni non sostituiti in posizione 5 (HUCKLE, LOCKHART & WRIGHT, 1965; EVANS & LOCKHART, 1965; SIDHU, THYAGARAJAN & BHALERAO, 1966; BHALERAO & THYAGARAJAN, 1968), sul flavanone (LOCKHART, 1968; MISITI & RIMATORI, 1970) e sull'iso-

flavanone (MISITI & RIMATORI, 1971) in cui è stato sempre isolato come prodotto principale il 2.3-diidro-1.4-benzossazepin-5-(4H)-one derivante dalla alchil-migrazione piuttosto che il corrispondente 2.3-diidro-1.5-benzossazepin-4-(5H)-one derivante dalla aril-migrazione. Analogamente, abbiamo dimostrato che gli 1.2.3.4-tetraidro-4-chinolinoni, sottoposti alla reazione di Schmidt, danno come prodotto principale gli 1.2.3.4-tetraidro-1.4-benzodiazepin-5-(4H)-oni risultanti dall'alchil-migrazione, essendo quest'ultima favorita dall'effetto elettronico dell'etero atomo in posizione *orto* al gruppo carbonilico (MISITI, GATTA & LANDI-VITTORY, 1971).

La formazione del prodotto derivante dalla alchil-migrazione come prodotto principale della reazione di Schmidt sui cromanoni, flavanoni e tetraidrochinolinoni riportati, è stata spiegata postulando una struttura di risonanza che può ostacolare la aril-migrazione.



X = O, NH, NR

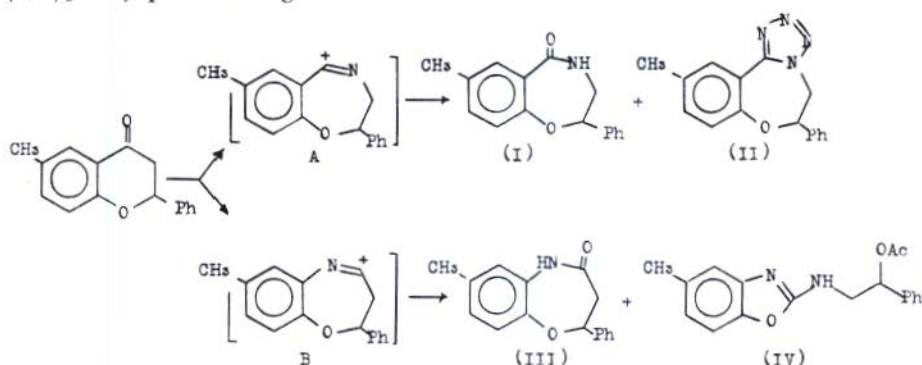
L'effetto dei sostituenti sull'anello aromatico sull'orientamento nel riarrangiamento di Schmidt è stato già riportato sui cromanoni (SIDHU, THYAGARAJAN & BHALERAO, 1966; BHALERAO & THYAGARAJAN, 1968) e da noi sui tetraidrochinolinoni (MISITI, GATTA & LANDI-VITTORY, 1971). In base ai risultati riportati è stato concluso che la presenza di sostituenti elettron-attrattori o di sostituenti elettron-donatori sull'anello aromatico non modifica sensibilmente il rapporto alchil: aril migrazione, essendo l'alchil-migrazione di gran lunga favorita.

Il presente lavoro riporta un esame della reazione di Schmidt su flavanoni sostituiti con gruppi elettron-donatori e rispettivamente elettron-attrattori ed il confronto del rapporto alchil: aril migrazione ottenuto per ognuno di essi, con quello riportato per il flavanone non sostituito.

La reazione di Schmidt sui flavanoni può essere considerata un efficace metodo di preparazione dei 2.3-diidro-2-fenil-1.4-benzossazepin-5-(4H)-oni, preferibile ad altri metodi di sintesi più laboriosi. L'interesse per questi composti è di natura farmacologica e chimica. Essi infatti presentano un'attività di tipo centrale come antidepressivi (KRAPCHO & TURK, 1966; 1967; BERNSTEIN, 1967; SQUIBB, 1969; BERNSTEIN, 1970) e, da un punto di vista chimico, danno luogo ad un nuovo tipo di riarrangiamento intramolecolare, catalizzato dagli acidi, messo in evidenza da noi recentemente (MISITI & RIMATORI, 1972).

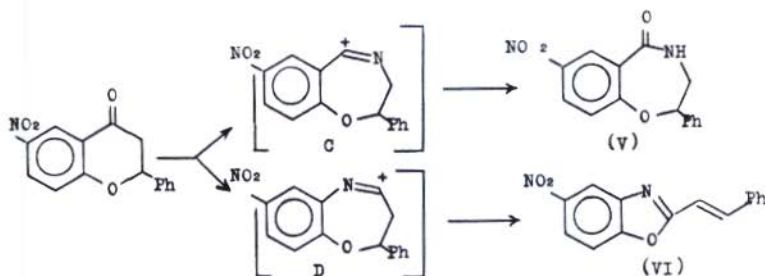
In particolare la reazione è stata applicata al 6-metil-flavanone, al 6-nitro-flavanone e all'8-nitro-flavanone.

Il 6-metil-flavanone con NaN_3 in una miscela di acido acetico e solforico reagisce rapidamente dando: 2.3-diidro-2-fenil-7-metil-1.4-benzossazepin-5-(4H)-one (I) (80% ca.) e il tetrazolo derivato corrispondente (II) (3,5% ca.) per alchil-migrazione e il 2.3-diidro-2-fenil-7-metil-1.5-benzossazepin-4-(5H)-one (III) (3,5% ca.) insieme al benzossazolo derivato (IV) (0,5% ca.) per aril-migrazione.



Il benzossazolo derivato (IV) si forma probabilmente attraverso un meccanismo che preveda l'apertura dell'anello eterociclico per l'attacco dell'ione acetato, presente nell'ambiente di reazione, sul C-2 benzilico dell'intermedio B; la formazione di una urea sostituita, con sequenza Ar-NH-CO-NH-CH_2 - (SMITH, 1963) e successiva chiusura dell'anello benzossazolico fra il carbonile dell'urea e l'ossidril fenolico.

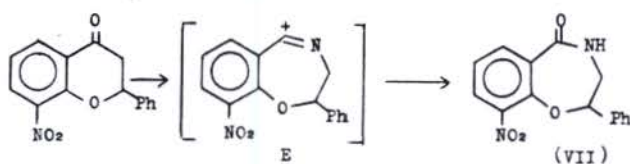
L'alchil-migrazione è predominante anche nel riassetamento di Schmidt del 6-nitro-flavanone. Quest'ultimo flavanone nelle condizioni di reazione usuali reagisce molto lentamente dando il 2.3-diidro-2-fenil-7-nitro-1.4-benzossazepin-5-(4H)-one (V) (70% ca.) per alchil migrazione ed il 2-stiril-5-nitro-benzossazolo (VI) (5% ca.) per aril migrazione.



La formazione del benzossazolo (VI) può essere spiegata con un riassetamento intramolecolare dell'intermedio carbocatione D (*).

(*) Un analogo riarrangiamento avviene nella reazione di Schmidt sul 2'-idrossi-calcone (MISITI, 1973).

Infine, si osserva soltanto alchil-migrazione nel caso della reazione di Schmidt sull'8-nitro-flavanone. Quest'ultimo reagisce molto lentamente ed anche prolungando notevolmente i tempi di reazione si recupera in parte inalterato. L'unico prodotto di reazione isolato è il 2.3-diidro-2-fenil-9-nitro-1.4-benzossazepin-5-(4H)-one (VII) (62% ca.).



I risultati sono riassunti e confrontati con quelli ottenuti sul flavanone nella Tab. 1.

TABELLA 1

CHERONE	RESA %	RAPPORTO ISOMETRI	
		% Alchil migrazione	% Aril migrazione
Flavanone	91	97	3
6-Metil-flavanone	87,5	95,4	4,6
6-Nitro-flavanone	75	93	7
8-Nitro-flavanone	62 (*)	100	—

(*) Resa ottenuta sottraendo il prodotto di partenza che non ha reagito.

Alla luce dei risultati preliminari ottenuti si può concludere che l'introduzione di sostituenti elettron-donatori o di sostituenti elettron-attrattori sull'anello aromatico condensato, non influenza sostanzialmente la orientazione del riassetamento di Schmidt sui flavanoni.

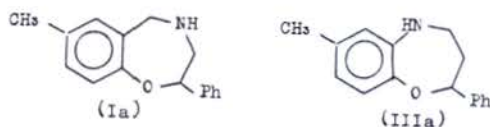
Questi risultati sono in accordo con quanto già osservato precedentemente per i cromanoni sostituiti (SIDHU, THYAGARAJAN & BHALEROA, 1966; BHALEROA & THYAGARAJAN, 1968) e gli 1.2.3.4-tetraidrochinolin-4-oni sostituiti (MISITI, GATTA & LANDI-VITTORY, 1971).

L'effetto dei sostituenti influenza invece notevolmente la reattività dei flavanoni; in particolare sostituenti anche debolmente elettron-donatori aumentano la velocità di reazione e al contrario sostituenti elettron-attrattori la diminuiscono notevolmente.

Assegnazione delle strutture

L'assegnazione della struttura dei due lattami isomeri (I) e (III) è stata fatta in base alle evidenze chimiche e spettroscopiche, in modo simile a quanto già descritto per gli analoghi lattami ottenuti nella reazione di

Schmidt sul flavanone (MISITI & RIMATORI, 1970). In particolare: l'idrolisi acida del lattame (I) con formazione di acido 5-metil-salicilico e fenil-acetaldeide; la differenza fra l'assorbimento del carbonile di (I) (ν_{CO} 1650) e quello di (III) (ν_{CO} 1665) nello spettro I.R.; la presenza di un segnale a campi magnetici bassi (7.62 δ) assegnato al protone sul C-6 aromatico nello spettro R.M.N. di (I) ed inoltre la differenza fra il segnale assegnato al gruppo $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$ di (I) (3.53 δ) e quello assegnato al gruppo $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$ di (III) (3.05 δ); la differenza di massa fra i picchi di maggiore intensità nello spettro di massa di (I) m/e : 224 (M^+-29) (*), 135 $\left(\text{CH}_3-\text{C}_6\text{H}_3(\text{C}=\text{O})-\text{OH}\right)^+$, 119 $(\text{PhC}_2\text{H}_4\text{N})^+$ e di (III) m/e : 131 $(\text{PhCH}=\text{CH}-\text{C}\equiv\text{O})^+$, sono i dati che permettono di assegnare ad (I) la struttura di 2.3-diidro-2-fenil-7-metil-1.4-benzossazepin-5-(4H)-one ed a (III) la struttura di 2.3-diidro-2-fenil-7-metil-1.5-benzossazepin-4-(5H)-one. L'assegnazione delle suddette strutture è confermata dai prodotti ottenuti per riduzione con LiAlH_4 :



Lo spettro di R.M.N. di (Ia) presenta un segnale caratteristico di un $-\text{CH}_2-$ benzilico (3.92 δ) mentre un tale segnale è assente nello spettro di (IIIa). Inoltre dallo spettro di quest'ultimo si può derivare, mediante esperimenti di «spin decoupling», la sequenza $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{Ph}$ compatibile soltanto con la struttura di (IIIa). Infine la struttura di (I) è ulteriormente confermata per confronto del suo N-acetil-derivato con il corrispondente N-acetil-2.3-diidro-2-fenil-1.4-benzossazepin-5-(4H)-one ottenuto per acetilazione dell'1.4-benzossazepin-5-one derivato dal flavanone.

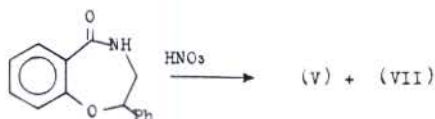
La riduzione con LiAlH_4 trasforma il tetrazolo derivato (II) nella benzossazepina (Ia) e permette di assegnargli la struttura di 2.3-diidro-2-fenil-tetrazol-[1,5-d]-1.4-benzossazepina.

L'assegnazione della struttura di 2-(2-acetossi-fenilettil-ammino)-5-metil-benzossazolo al composto (IV) è basata essenzialmente sull'interpretazione del relativo spettro I.R. e di R.M.N. Nello spettro I.R., infatti, si nota la presenza di due bande nella regione del carbonile, rispettivamente a 1730 (estere) e 1639 ($-\text{C}=\text{N}$) cm^{-1} e di una banda nella regione dell'OH o dell'NH. D'altra parte nello spettro di R.M.N. è presente un segnale a bassi campi (7.10 δ) assegnato a un protone aromatico deschermato da gruppi elettron-

(*) La perdita di massa di 29 a.m.u. è stata osservata negli spettri di massa di lattami del tipo benzammide (MISITI & RIMATORI, 1972).

attrattori in posizione *orto*, ed inoltre il segnale relativo al $-\overset{|}{\text{C}}\text{H}-\text{Ph}$ è spostato verso più bassi campi (5.95 δ) in quanto sostituito con un gruppo OAc.

I due lattami (V) e (VII) ottenuti per reazione di Schmidt sul 6-nitro- e sull'8-nitro-flavanone sono derivati tipo-benzammide e danno per idrolisi acida l'acido 5-nitro- e 3-nitro-salicilico rispettivamente. La loro struttura è stata provata per nitratura diretta del 2.3-diidro-2-fenil-1.4-benzossazepin-5-(4H)-one



L'assegnazione delle due strutture si basa essenzialmente sull'interpretazione dei segnali nella parte aromatica dello spettro di R.M.N. dei due lattami (Tab. 2).

Il benzossazolo (VI) è risultato identico in ogni dettaglio ad un campione autentico ottenuto per altra via (BUELL, 1963).

PARTE SPERIMENTALE

(in collaborazione con G. CAMARDA)

I punti di fusione determinati con apparecchio Kofler non sono corretti. Gli spettri IR sono stati registrati su uno spettrometro Perkin-Elmer mod. 21 a doppio raggio, in soluzione di CHCl₃. Gli spettri RMN sono stati registrati con uno spettrometro Varian-T-60. I « chemical shifts » sono misurati in p.p.m. (δ) usando TMS come standard interno. Gli spettri di massa (MS) sono stati ottenuti usando uno spettrometro Hitachi RMU6D (fuoco singolo) con un potenziale di ionizzazione di 70 eV. I campioni sono stati introdotti direttamente nella sorgente riscaldata a 200°. Le cromatografie su strato sottile (CSS) sono state eseguite usando lastre di Silica Gel (Merck GF₂₅₄).

Reazione di Schmidt sui flavanoni : condizioni generali

Acido solforico conc. (3,5 ml) viene aggiunto sotto agitazione ad una sospensione del flavanone (5g) e di NaN₃ (2g) in AcOH glaciale (15 ml). La temperatura di reazione è mantenuta intorno ai 35-40° e la velocità varia con i sostituenti sull'anello aromatico. Terminata la reazione la miscela viene raffreddata efficacemente, neutralizzata con una soluzione acquosa di Na₂CO₃ ed estratta ripetutamente con AcOEt. Gli estratti riuniti, seccati su Na₂SO₄, forniscono un residuo grezzo dopo eliminazione del solvente.

6-metil-flavanone.

La reazione è completa dopo ca.1 ora. Il residuo solido grezzo ottenuto, per trattamento con AcOEt separa 2.3-diidro-2-fenil-7-metil-1.4-benzossaze-

TABELLA 2

Prodotti di riarrangiamento e derivati

		R.M.N. (δ), (CDCl ₃)					
Formula (a)	p. f. Solv. cristall. (p. eb./mmHg)	I.R., cm ⁻¹	NH (δ)	aromatici (vinilici)	—CH—Ph —CH ₂ —	—CH ₃	
I	C ₁₈ H ₁₁ NO ₂ 157-8 EtOH-H ₂ O	ν_{NH} 3350, 3150 ν_{CO} 1650	7.60 b	7.62 d (H—6); 7.22 dd (H—8); 6.92 d (H—9); 7.32 m (Ph) (e)	5.37 q	3.53 m (d)	2.32 s
I, N-acetil	C ₁₈ H ₁₇ NO ₂ 113-5 AcOEt-esano	ν_{CO} 1680		8.03 d (H—6); 7.20 d (H—9); 7.70 m (H—6, Ph) (e)	5.73 q	4.83 q (IH) 4.13 q (IH)	2.75 s (NCOCH ₃) (e) 2.48 s (CH ₃ arom)
Ia	C ₁₈ H ₁₁ NO 87-8 benzene-esano	ν_{NH} 3250 (f)	1.88 b	7.33 m (Ph); 6.90 (3H)	4.55 q	3.17 m 3.92 d (benzili- lico)	2.95 s
II	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O 185-6 AcOEt-esano	ν_{CO} —N 1610	8.61 b	8.32 d (H—6); 7.20 dd (H—8); 6.99 d (H—9); 7.45 m (Ph) (e)	5.58 q	5.25-4.57 m	2.34 s
III	C ₁₄ N ₁₃ NO ₂ 138-9 benzene-esano	ν_{NH} 3300, 3130 ν_{CO} 1665		7.35 m (Ph); 6.86 m (3H)		3.05 m	2.27 s
IIIa	C ₁₄ H ₁₇ NO (105-7/0.001)	ν_{NH} 3270 (f)	3.50 b	6.90 d (H—9); 6.57 dd (H—8); 6.50 d (H—6); 7.40 m (Ph) (e)	4.83 q	3.80-2.80 m (CH ₂ —NH) 2.20 m (CH —CH ₂ —) (g)	2.27 s
IV	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₂ (165-8/0.001)	ν_{NH} 3367 ν_{CO} 1730, ν_{CO} —N 1639	5.40 b	7.10 d (H—6); 6.90 d (H—7); 6.75 dd (H—6); 7.38 (Ph) (e)	5.95 q	3.80 m	2.35 s (CH ₃ arom) 2.03 s (OCOCH ₃)
V	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₄ 183-5 AcOEt-esano	ν_{NH} 3356, 3125, 2941 ν_{CO} 1661	8.00 bt	8.93 d (H—6); 8.30 dd (H—8); 7.23 d (H—9); 7.47 bs (Ph) (e)	5.65 t	3.80 t (h)	
VI	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₄ 178-9 (i) AcOEt	ν_{CO} —N 1639		8.55 d (H—4); 8.27 dd (H—6); 7.50 m (H—7, Ph) (e) (7.87 d (IH), 7.63 d (IH)) (l)			
VII	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₄ 159-60 AcOEt-esano	ν_{NH} 3356, 3125, 2941 ν_{CO} 1661	7.10 bt	8.04d, 7.94dd (H—6, H—8); 7.30 t (H—7); 7.35 bs (Ph) (e)	5.64 t	3.97-3.37 m (m)	

(a) Le microdeterminazioni analitiche di C₁₈H₁₁N di tutti i composti sono in accordo con le strutture proposte: (b) Il segnale scompare dopo scambio con D₂O; (c) valori osservati; J orto=9cps; J meta 2.5cps; (d) Il segnale si trasforma in quartetto dopo scambio con D₂O; (e) Il segnale dell'N-acetil nel corrispondente 4-acetil-2,3-didro-2-fenil-1,4-benzosazolin-5-one (parte speriment.) è a 2.75 δ ; (f) film; (g) Le assegnazioni dei segnali dei due gruppi —CH₂— sono state eseguite mediante esperimenti di "spin decoupling"; (h) Il segnale si trasforma in apparente doppietto dopo scambio con D₂O; (i) letteratura (13) p.f. 176; (l) J osservato=17 cps; (m) Il segnale si trasforma in un quartetto di doppietti centrato a 3.66 δ .

pin-5-(4H)-one (I), praticamente puro (62% ca.) che viene ulteriormente purificato per ricristallizzazione. MS: m/e (1%), 253 (16.6) M⁺, 224 (8.9), 195 (19.2), 162 (11.0), 135 (22.3), 119 (100), 105 (9.2), 91 (11.3), 78 (12.1), 77 (19.8), 65 (5.5), 51 (12.0), 39 (8.7), 28 (12.7), 18 (35.6). Ioni metastabili: 119, 117, 84.5, 56.

Riduzione con LiAlH₄ di (I). — La 1.4-benzossazepina (Ia) si ottiene con buone rese per riduzione di (I) con soluzione eterea di LiAlH₄ a ricadere per 12 ore. Dopo trattamento con H₂O e alcali diluiti, la miscela di reazione viene estratta con etere. Il residuo grezzo dopo distillazione in apparecchio a bolle (p.eb. 90-5°/0,001 mm) solidifica totalmente e viene ulteriormente purificato per ricristallizzazione.

N-acetil-derivato di (I). — Riscaldando a ricadere per 30 minuti una soluzione di benzossazepinone (I) in Ac₂O-piridina 10 : 1, si ottiene l'N-acetil-2.3-diidro-2-fenil-7-metil-1.4-benzossazepin-5-one, praticamente puro.

Idrolisi acida di (I). — Il benzossazepinone (I) sospeso in HCl concentrato viene riscaldato a ricadere per 5-6 ore. La miscela di reazione viene estratta con etere. La soluzione eterea, estratta con soluzione di Na₂CO₃, seccata su Na₂SO₄ lascia, dopo eliminazione dell'etere, fenilacetaldeide (confronto mediante gas-cromatografia con un campione autentico). La fase acquosa alcalina per acidificazione separa acido 5-metil-salicilico, identico ad un campione autentico (p.f. misto, spettro IR).

Le acque madri di (I) tirate a secco lasciano un residuo grezzo che viene purificato per cromatografia su colonna di Silice. Eluendo con miscele di esano e acetato di etile, arricchite gradualmente in AcOEt si ottiene per primo la 2.3-diidro-2-fenil-7-metil-tetrazol-[1,5-d]-1.4-benzossazepina (II) (3,5% ca.) praticamente pura, che viene ulteriormente ricristallizzata.

Riduzione con LiAlH₄ del tetrazolo-derivato (II). — La 1.4-benzossazepina (Ia) si ottiene con buone rese per riduzione con una soluzione eterea di LiAlH₄ del tetrazolo (II), a ricadere per 12 ore.

Per eluizione successiva si ottiene il 2(2-acetossi-fenilettil-ammino)-benzossazolo (IV) impuro, che viene purificato per cromatografia su strato sottile preparativa (eluente AcOEt-esano 1 : 2) e poi distillato in apparecchio a bolle sotto vuoto (0,5% ca.).

Le frazioni cromatografiche successive contengono il 2.3-diidro-2-fenil-7-metil-1.5-benzossazepin-4-(5H)-one (III) (3.5% ca.) puro. MS: m/e (1%), 253 (16.7) M⁺, 234 (4.9), 149 (26.5), 137 (4.2), 131 (100), 123 (10), 119 (10.2), 104 (15.7), 103 (22.0), 78 (11.4), 77 (14.6), 66 (5.2), 65 (5.2), 51 (6.9), 39 (5.8), 28 (5.2), 18 (7.7).

Riduzione con LiAlH₄ di (III). — La 1.5-benzossazepina (IIIa) si ottiene con buone rese riscaldando a ricadere per 12 ore l'1.5-benzossazepin-4-one (III) con una soluzione eterea di LiAlH₄. Dopo la consueta elaborazione il composto (IIIa) grezzo ottenuto viene purificato per distillazione sotto vuoto.

Eluendo infine la colonna con AcOEt si ottiene una ulteriore quantità di 1.4-benzossazepin-5-one (I) (18% ca.) praticamente puro.

N-acetil-2.3-diidro-2-fenil-1.4-benzossazepin-5-(4H)-one.

Il suddetto N-acetil derivato si ottiene per acetilazione del 2.3-diidro-2-fenil-1.4-benzossazepin-5-(4H)-one (MISITI & RIMATORI, 1972), ottenuto dal flavanone, in modo del tutto analogo all'N-acetil derivato di (I). L'N-acetil derivato grezzo è un olio che solidifica col tempo. Dopo cristallizzazione da AcOEt-esano, fonde a 90-1°0. $C_{17}H_{15}NO_3$. IR: ν_{CO} 1680 cm^{-1} ; RMN, (δ): 8.30dd (H-6); 8.00dd (H-8); 7.33dd (H-9); 7.73m (H-7, Ph); 5.76q (-CH-Ph); 4.83q, 4.13q (-CH₂-); 2.75s (NCOCH₃).

6-nitro-flavanone.

La reazione è completa dopo 7 ore ca. Il residuo grezzo ottenuto viene cromatografato su colonna di Silice. Eluendo con miscele di AcOEt-esano arricchite gradualmente in AcOEt, si ottiene dapprima il 2-stiril-5-nitrobenzossazolo (VI) (5% ca.) (BUELL, 1963) ulteriormente purificato per ricristallizzazione.

Per eluizione successiva si ottiene il 2.3-diidro-2-fenil-7-nitro-1.4-benzossazepin-5-(4H)-one (V) (70% ca.) puro.

Idrolisi acida di (V). — L'idrolisi acida condotta seguendo le modalità dell'idrolisi di (I) fornisce acido 5-nitro-salicilico (identico ad un campione autentico) e fenil-acetaldeide (confronto gas-cromatografico con un campione autentico).

8-nitro-flavanone.

La reazione anche dopo 24 ore non è completa. Il residuo viene cromatografato su colonna di Silice. Eluendo con miscele AcOEt-esano sempre più ricche di AcOEt, si eluisce dapprima l'8-nitro-flavanone che non ha reagito (35% ca.) e poi una complessa miscela di prodotti (ca. 20%) che non è possibile risolvere.

La successiva eluizione fornisce infine il 2.3-diidro-2-fenil-9-nitro-1.4-benzossazepin-5-(4H)-one (VII) praticamente puro (35% ca.).

Idrolisi acida di (VII). — L'idrolisi acida di (VII) fornisce acido 3-nitro-salicilico (identico ad un campione autentico) e fenil-acetaldeide (confronto gas-cromatografico con un campione autentico).

Nitratura del 2.3-diidro-2-fenil-1.4-benzossazepin-5-(4H)-one.

Il 2.3-diidro-2-fenil-1.4-benzossazepin-5-(4H)-one (MISITI & RIMATORI, 1970) (0,2g) in Ac₂O (2ml) viene nitrato per cauta aggiunta sotto agitazione a ca 0° di HNO₃ al 65% (0,3 ml). Si lascia a ca. 0° per un'ora e poi si fa tor-

nare a temperatura ambiente. Si diluisce con acqua e si estrae con AcOEt. Gli estratti seccati (Na_2SO_4) ed evaporati, forniscono un residuo grezzo che viene purificato su colonna di Silice. Eluendo con AcOEt-esano 1:1 si ottiene dapprima una frazione contenente impurezze e di seguito il 2.3-diidro-2-fenil-7-nitro-1.4-benzossazepin-5-(4H)-one (V) (45% ca.) (identico per confronto con il prodotto ottenuto precedentemente) e il 2.3-diidro-2-fenil-9-nitro-1.4-benzossazepin-5-(4H)-one (VII) (25% ca.) (identico per confronto con il prodotto ottenuto precedentemente).

Ricevuto il 6 aprile 1973.

Accettato il 14 aprile 1973.

BIBLIOGRAFIA

- ARCUS, C.L., M.M. COOMBS & J.V. EVANS, 1956. *J. Chem. Soc.*, 1498.
 BARSKY, L.I. & W.L. BENCZE, 1971. *J. Med. Chem.*, **14**, 40.
 BERNSTEIN, J., 1967. Brev. U.S. 3.341.521 (*Chem. Abst.* **68**, 95875 e, 1968).
 BERNSTEIN, J., 1970. Brev. Brit. 1.198.853 (*Chem. Abst.* **73**, 77295 q, 1970).
 BHALERAO, U.T. & G. THYAGARAJAN, 1968. *Can. J. Chem.*, **46**, 3367.
 BUELL, B.G., 1963. Brev. Belg. 623.386 (*Chem. Abst.*, **61**, 9617 a, 1964).
 EVANS, D. & I.M. LOCKHART, 1965. *J. Chem. Soc.*, 4806.
 HUCKLE, D., I.M. LOCKHART & M. WRIGHT, 1965. *J. Chem. Soc.*, 1137.
 KRAPCHO, J. & C.F. TURK, 1966. *J. Med. Chem.*, **9**, 191.
 KRAPCHO, J. & C.F. TURK, 1967. Brev. U.S. 3.309.361 (*Chem. Abst.*, **68**, 2930f, 1968).
 LOCKHART, I.M., 1968. *Chem. Ind. (London)*, 1844.
 MINAMI, S., N. TOMITA, H. TAKAMATSU & S. UYEO, 1965. *Chem. Pharm. Bull. (Japan)*, **13**, 1084.
 MIREK, J., 1962. *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Chim.*, **10**, 421.
 MISITI, D., 1973. *Ann. Ist. Super. Sanità*, 1973, **9**, 174.
 MISITI, D., F. GATTA & R. LANDI-VITTORY, 1971. *J. Heter. Chem.*, **8**, 231.
 MISITI, D. & V. RIMATORI, 1970. *Tetrahedron Letters*, 947.
 MISITI, D. & V. RIMATORI, 1971. *Gazz. Chim. Ital.*, **101**, 167.
 MISITI, D. & V. RIMATORI, 1972. *J. Heter. Chem.*, **9**, 1305.
 SCHMIDT, H.J., A. HUNGER & K. HOFFMANN, 1956. *Helv. Chim. Acta.* **39**, 607.
 SIDHU, G.S., G. THYAGARAJAN & U.T. BHALERAO, 1966. *J. Chem. Soc. (C)*, 969.
 SMITH, P.A.S., 1963. *Molecular Rearrangements*, parte I, P. de Mayo, Ed. Interscience, New York, p. 457 e referenze ivi riportate.
 SMITH, P.A.S. & E.P. ANTONIADES, 1960. *Tetrahedron*, **9**, 210.
 SQUIBB, E.R. & SONS, Inc., 1969. Brev. Fr. 1.552.840 (*Chem. Abst.*, **72**, 31855 y, 1970).
 WOLFF, H., 1946. *Org. Reactions*, **3**, 307.

Carboidrati dietetici e lipidi corporei: effetti del fruttosio

Da qualche tempo ci stiamo occupando dell'effetto di differenti tipi di carboidrati dietetici sulla composizione lipidica di organi e tessuti di ratti ricevuti sia diete a normale contenuto lipidico che diete iperlipidiche e ipoproteiche integrate con colesterolo (1-4).

Nel caso delle diete normolipidiche abbiamo potuto mettere in chiara evidenza la spiccata azione lipogenica dei carboidrati solubili. Nel fegato dei ratti ricevuti saccarosio o glucosio si riscontrano infatti più elevate quantità di trigliceridi rispetto a quelle rilevabili con amido, con un contemporaneo innalzamento delle attività enzimatiche del ciclo dei pentosi (glucosio-6-fosfato- e 6-fosfogluconico-deidrogenasi) che, come è noto, sembrano presentare cambiamenti adattativi in funzione della diversa qualità dei carboidrati introdotti con la dieta.

Impiegando diete « aterogene » (contenenti il 20% di lipidi e il 10% di protidi, e integrate con colesterolo, ac. colico e tiouracile) la lipogenesi appare ovviamente depressa e le variazioni attribuibili alla qualità del carboidrato dietetico riguardano soltanto il colesterolo. Nel siero, nel fegato e nelle pareti aortiche dei ratti ricevuti saccarosio o glucosio l'infiltrazione colesterolica appare più marcata rispetto a quanto non si ottenga quando il carboidrato dietetico è costituito da amido.

I risultati ottenuti ci hanno indotto ad estendere le nostre ricerche al fruttosio, alla cui presenza nella molecola del saccarosio è stata attribuita la spiccata azione lipogenica di questo disaccaride 4.

Nelle nostre prove abbiamo adottato delle sostituzioni con il carboidrato in questione sia totali (60%) che parziali (30% di fruttosio con 30% di glucosio o di amido).

Nel caso delle diete a normale contenuto lipidico, sia le deidrogenasi che i trigliceridi epatici sono apparsi più elevati nei ratti ricevuti fruttosio (da solo o con glucosio) o saccarosio rispetto a quelli ricevuti glucosio o trattati con amido. La presenza di fruttosio nella dieta nella proporzione del 30% insieme ad amido non si è dimostrata invece in grado di mettere in evidenza l'azione lipogenica del monosaccaride. Come per gli altri carboidrati studiati, non sono state rilevate differenze a carico dei trigliceridi ematici.

La Tab. I riassume i risultati di due serie di esperimenti condotti impiegando diete « aterogene ». Per comodità di confronto sono riportati i risultati ottenuti con le corrispondenti diete normolipidiche.

Come si può osservare, le due serie di esperimenti hanno confermato, a livello soprattutto del siero e delle aorte, la spiccata azione ipercolesterolemizzante del saccarosio e in minor grado del glucosio, rispetto all'amido. Questa azione si esplica soltanto con le diete integrate con colesterolo.

Singolare appare il comportamento del fruttosio. La presenza di questo monosaccaride nella dieta « aterogena », nella proporzione del 30% insieme a glucosio, provoca costantemente una infiltrazione colesterolica della parete aortica perfino più elevata di quella ottenuta col saccarosio.

Variabili appaiono invece i risultati ottenuti impiegando nella dieta « aterogena » il fruttosio, da solo, nella proporzione del 60%. L'infiltrazione colesterolica è apparsa sorprendentemente modesta nel primo esperimento. All'inverso ha raggiunto o superato

TABELLA I

Effetti della presenza di differenti carboidrati in diete « aterogene » sul colesterolo del siero, del fegato e delle aorte di ratto
(trattamento per 60 giorni)

	Dieta	Glucosio 60 %	Saccarosio 60 %	Amido 60 %	Fruttosio 60 %	Fruttosio 30 % Glucosio 30 %	Fruttosio 30 % Amido 30 %
SIERO (mg colesterolo totale/100 ml) (valori medi su 24 ratti \pm D.S.) (colesterolo totale)	basale (normolipidica)	102 \pm 14	100 \pm 17	110 \pm 21	101 \pm 36	109 \pm 12	103 \pm 16
	aterogena (I esperim.)	1297 \pm 424	1248 \pm 307	737 \pm 141	854 \pm 403	1421 \pm 400	1301 \pm 338
	aterogena (II esperim.)	1547 \pm 196	1549 \pm 234	875 \pm 331	1916 \pm 340	1842 \pm 267	1493 \pm 509
FEGATO (mg colesterolo totale/g tessuto fresco) (valori medi su 24 ratti \pm D.S.) (colesterolo totale)	basale (normolipidica)	4,4 \pm 0,3	4,0 \pm 0,11	3,8 \pm 0,3	3,8 \pm 0,4	3,8 \pm 0,6	3,2 \pm 0,5
	aterogena (I esperim.)	121 \pm 21	142 \pm 25	154 \pm 29	61 \pm 16	130 \pm 23	75 \pm 14
	aterogena (II esperim.)	147 \pm 34	149 \pm 31	159 \pm 26	149 \pm 41	139 \pm 31	185 \pm 66
AORTA (μ g colesterolo esterificato/100mg tessuto fresco) (valori medi su 4 pools 6 ratti \pm D.S.) (colesterolo esterificato)	basale (normolipidica)	27 \pm 7	34 \pm 12	19 \pm 7	26 \pm 6	28 \pm 7	29 \pm 8
	aterogena (I esperim.)	47 \pm 13	71 \pm 14	59 \pm 9	61 \pm 9	89 \pm 12	72 \pm 6
	aterogena (II esperim.)	58 \pm 4	74 \pm 10	60 \pm 2	70 \pm 6	91 \pm 9	80 \pm 4

SIERO: Differenze significative ($P < 0,05$) fra carboidrati solubili e amido, eccetto fruttosio 60 % nel primo esperimento.

FEGATO: Valori significativamente inferiori ($P < 0,01$) a quelli di tutti gli altri gruppi con fruttosio 60 % e con fruttosio + amido, nel primo esperimento.

AORTE: Differenze significative ($P < 0,05$) fra fruttosio (60 % e 30 %) o saccarosio e glucosio o amido, eccetto fruttosio 60 % nel primo esperimento.

Differenze significative ($P < 0,05$) fra fruttosio + glucosio e saccarosio, in ambedue gli esperimenti.

i livelli ottenuti con saccarosio nella seconda serie di prove. Risposte in parte variabili sono state ottenute somministrando il fruttosio nella proporzione del 30 % insieme ad amido.

La riscontrata variabilità di risultati ottenuti col fruttosio nelle diete ipercolesterolemizzanti trova conferma in letteratura nei dati di Staub e Thiessen⁵ del 1968, ottenuti in successive serie di analoghi esperimenti. Gli AA. non sono riusciti a individuare le ragioni di questo singolare comportamento anche dopo una attenta verifica dell'identità delle condizioni sperimentali adottate nelle diverse prove.

Per quanto riguarda i nostri esperimenti abbiamo operato un rigoroso controllo sulla esistenza di possibili variabili. Ambedue le serie di prove sono state condotte su ratti dello stesso ceppo Wistar, di uguale sesso (maschile), età, peso corporeo, posti per randomizzazione in ugual numero per ciascun gruppo, alimentati in controllato « pair feeding », per un uguale periodo (60 giorni). È stata altresì controllata la preparazione delle diete, la provenienza dei materiali, ecc.

Dall'esame complessivo dei risultati sperimentali ci sembra di poter trarre le seguenti conclusioni.

L'azione lipogenica del fruttosio, rilevabile dall'aumento dei trigliceridi e dalla esaltazione delle attività deidrogenasiche del fegato, appare indiscussa nei ratti riceventi la dieta normolipidica.

Quando il fruttosio è presente nelle diete « aterogene » (iperlipidiche e ipoproteiche con integrazione di colesterolo), è possibile metterne in evidenza l'effetto ipercolesterolemizzante e aterogenico.

Tuttavia questo effetto risulta assolutamente costante e perfino più marcato di quello ottenuto col saccarosio, soltanto quando si realizzano condizioni ottimali di somministrazione, nel nostro caso con la miscela di fruttosio 30 % e glucosio 30 %. In situazioni diverse i risultati non appaiono sempre riproducibili.

Questi fatti ci sembrano interessanti, perchè mettono in evidenza come per esprimere un giudizio sull'effetto dei carboidrati dietetici sul metabolismo lipidico sia necessario scegliere i parametri e le sedi più opportuni e le condizioni sperimentali più adatte. Ciò può infatti spiegare le discordanti osservazioni presenti talora in letteratura.

Confermano infine l'ipotesi già da noi precedentemente discussa che le variazioni del colesterolo nell'organismo, dipendenti dal tipo di carboidrato dietetico, evidenziabili soltanto quando il colesterolo è largamente presente nella dieta, siano legate all'influenza dei carboidrati somministrati sul destino metabolico del colesterolo nel tratto intestinale.

Ricevuto il 9 settembre 1972.

Accettato il 12 novembre 1972.

RAFFAELE ANGELICO e LUCIA MORETTA
Laboratori di Biologia

¹ ANGELICO, R., L. MORETTA, G. IMPROTA & P. L. IALONGO. *Nutr. Metabol.*, **12**, 179 (1970).

² ANGELICO, R. *Proc. 7^o Intern. Meeting on « Nutrition and Cardiovascular Diseases »*, Centro Studi Lipidi Alimentari - Biologia e Clinica della Nutrizione, Fond. Sasso, Rimini, Morgagni Ed. Scient., Roma, 1970, p. 115.

³ ANGELICO, R. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **6**, 414 (1970).

⁴ ANGELICO, R. *Giorn. Arteriosclerosi*, **9**, 25 (1971).

⁵ STAUB, H. W. & R. THIESSEN, JR. *J. Nutr.*, **95**, 633 (1968).

Metodo per calcolare il titolo dei tre tipi di poliovirus presenti nel vaccino antipoliomielitico trivalente per uso orale

Il vaccino antipoliomielitico orale è ora distribuito come preparazione trivalente in sospensioni di tutti e tre i tipi. Il controllo di stato del vaccino richiede che le singole preparazioni contengano non meno di un certo numero di dosi infettanti; ne deriva la necessità di stabilire il titolo dei singoli virus presenti nelle varie preparazioni.

Effettuando la titolazione della miscela trivalente, si ottiene il titolo complessivo delle dosi infettanti e non quello dei monotipi presenti nella miscela. Per conoscere il quantitativo dei singoli componenti, è necessario procedere alla titolazione di ciascuna «sospensione madre» prima che queste vengano mescolate. In alternativa si possono titolare i singoli tipi nel trivalente mediante la tecnica della neutralizzazione parziale dei virus per mezzo di antisieri monospecifici. In questa nota sono esposti i risultati ottenuti con questo metodo.

Materiali e metodi

- a) *Cellule*: sono state usate cellule di rene di scimmia rhesus (*Macaca mulatta*) in coltura primaria.
- b) *Virus*: sono state utilizzate sia sospensioni monotipiche o trivalenti preparate in laboratorio sia quelle poste in commercio.
- c) *Sieri*: i sieri di cavallo immuni sono stati inattivati a 56° C per 30 min e quindi posti a contatto per 4 h a 37° C e la notte a 4° C con preparazioni concentrate dei due tipi di virus diversi da quello usato per ottenere il siero, in modo da eliminare eventuali anticorpi ad essi correlati. La miscela siero-virus veniva poi posta a centrifugare a 60.000 rpm per 3 h; si raccoglieva il soprannatante, che veniva usato per le neutralizzazioni dopo essere stato sottoposto ad un controllo per verificare l'assenza di particelle virali ancora infettanti.

Titolazione di ciascun tipo di virus nella miscela trivalente.

I virus dei singoli tipi sono stati titolati dopo neutralizzazione degli altri due tipi: la sospensione trivalente veniva inizialmente diluita 10^{-3} e ad 1 ml di essa si aggiungeva 1 ml di ciascun antisiero usato.

Dopo aver tenuto la miscela per 4 h a 37° C e la notte a 4° C, venivano aggiunti 7 ml di terreno di mantenimento in modo da ottenere una diluizione 10^{-4} ; da questa si procedeva per avere le altre diluizioni (10^{-5} - 10^{-7}). Per ogni diluizione sono stati inoculati 10 tubi con 0,5 ml di miscela per tubo. Gli antisieri, aventi titoli neutralizzanti le 100 DICT₅₀ rispettivamente di 1 : 500, 1 : 1000 e di 1 : 500 per i tipi 1, 2 e 3 sono stati usati alla diluizione 1 : 20. Dopo prove preliminari atte a stabilire quale fosse la diluizione ottimale alla quale si avesse la neutralizzazione del virus omotipico, si era scelta la diluizione che non produceva un effetto tossico sulle cellule. Allo scopo di escludere la presenza dei virus neutralizzati dai rispettivi antisieri, per ogni tubo con effetto citopatico veniva tipizzato il virus in causa.

Risultati

Nella Tab. 1 sono riportati, limitatamente ai tipi 1 e 3, i valori ottenuti nelle titolazioni delle sospensioni monotipiche preparate in laboratorio, confrontati con le titolazioni degli stessi virus dopo la miscela nel trivalente. Da essa si può rilevare come i titoli presentino variazioni minime e tutte entro i limiti di un errore consentito.

TABELLA 1

Titoli, in DICT 50/ml, dei tipi 1 e 3 nella miscela trivalente

Sospensione madre tipo 1	Tipo 1 dal trivalente	Sospensione madre tipo 3	Tipo 3 dal trivalente
10 ^{6,6}	10 ^{6,5}	10 ^{6,5}	10 ^{6,4}
10 ^{6,6}	10 ^{6,7}	10 ^{6,6}	10 ^{6,7}
10 ^{6,2}	10 ^{6,1}	10 ^{6,8}	10 ^{6,7}

TABELLA 2

Titoli, espressi in DICT 50/ml, dei singoli tipi dei virus, delle sospensioni del commercio, nelle sospensioni-madre e nella miscela trivalente

Madre tipo 1	Tipo 1 dal trivalente	Madre tipo 2	Tipo 2 dal trivalente	Madre tipo 3	Tipo 3 dal trivalente
10 ^{6,0}	10 ^{5,8}	10 ^{5,5}	10 ^{5,7}	10 ^{6,3}	10 ^{6,1}
10 ^{5,9}	10 ^{5,9}	10 ^{5,8}	10 ^{5,7}	10 ^{6,3}	10 ^{6,5}
10 ^{6,3}	10 ^{6,1}	10 ^{5,7}	10 ^{5,8}	10 ^{6,2}	10 ^{6,2}
10 ^{6,2}	10 ^{6,4}	10 ^{5,8}	10 ^{6,0}	10 ^{6,5}	10 ^{6,5}
10 ^{6,3}	10 ^{6,3}	10 ^{5,9}	10 ^{5,8}	10 ^{6,4}	10 ^{6,5}
10 ^{6,3}	10 ^{6,2}	10 ^{5,7}	10 ^{5,9}	10 ^{6,6}	10 ^{6,4}
10 ^{6,2}	10 ^{6,3}	—	—	10 ^{6,5}	10 ^{6,7}
10 ^{6,4}	10 ^{6,2}	—	—	10 ^{6,4}	10 ^{6,3}

Ricevuto il 2 novembre 1972.

Accettato il 15 gennaio 1973.

Nella Tab. 2 sono invece riportati i risultati delle titolazioni eseguite sulle sospensioni di vaccino del commercio; anche in essa sono confrontati i titoli delle sospensioni monotipiche con quelli ottenuti (per i medesimi tipi) nella miscela trivalente; come per le sospensioni preparate nel laboratorio, gli scarti fra i titoli sono tutti contenuti entro limiti accettabili (al massimo 0,2 log).

Conclusione

I risultati ottenuti dimostrano come i titoli di ciascun tipo di virus, calcolati sia nelle sospensioni monotipiche, sia nella miscela trivalente col metodo usato, si corrispondano sempre entro limiti accettabili, con differenze che non superano mai 0,2 log. Inoltre, le tipizzazioni eseguite sui tubi risultati positivi hanno sempre escluso la presenza dei virus neutralizzati.

Pertanto si ritiene che questa tecnica possa essere seguita nella titolazione dei singoli virus poliomielitici della miscela trivalente.

GIUSEPPE FREZZA (*)
Laboratori di Microbiologia

(*) Ospite dei Laboratori di Microbiologia.

A study on the mechanism of the sodium bicarbonate test in the differentiation of saprophytic and pathogenic leptospirae

As pointed out in a previous work ¹, a medium containing 1‰ sodium bicarbonate can be used as a criterion for the differentiation of saprophytic and pathogenic leptospirae, because it causes growth inhibition of the latter. Although, in that publication, an accuracy of 99.60% was indicated, in the work of Fagiolo ² who checked many differential tests on a higher number of strains, a figure of 99.24% was reported.

The method suggested, which was the result of a casual observation, was subsequently improved in an empirical way, although in accordance with findings emerged from experimental observations.

We found it convenient to investigate the mechanism of this differential method, taking into account: 1) the fact that sodium bicarbonate, when dissolved, gradually dissociates into sodium carbonate and CO₂, starting from 20°C, and that this dissociation terminates when the boiling temperature is attained; 2) the possible influence exerted by the type of peptone used.

Materials and methods

Solutions of each component of bicarbonate medium ¹ were prepared separately, and each container was sterilized either by filtration or by autoclave. All solutions were prepared in a concentration that was twice that of the original technique, that is, in a 2‰ concentration of peptone or bicarbonate, and mixed 1:1 before use. Then 10% rabbit serum was added after performing a pH check.

The media were marked with numbers as follows:

Medium n° 1 - NaHCO₃ (filtered)

Medium n° 2 - NaHCO₃ (filtered) + Proteosa-peptone n° 3 (filtered)

Medium n° 3 - NaHCO₃ (filtered) + Proteosa-peptone n° 3 (autoclave)

Medium n° 4 - NaHCO₃ (autoclave)

Medium n° 5 - NaHCO₃ (autoclave) + Proteosa-peptone n° 3 (filtered)

Medium n° 6 - NaHCO₃ (autoclave) + Proteosa-peptone n° 3 (autoclave)

Media n° 1 and 4 were diluted 1:1 with distilled water to obtain the correct 1‰ concentration of bicarbonate.

The purpose of these combinations of solutions, the sterilization method of which varied as specified above, was that of establishing whether sodium bicarbonate, when heated during the sterilization process, was responsible of the different action of the medium or whether such an action was developed by peptone, in view of the considerations set forth in the original work; or else, if particular combinations occurred between bicarbonate or carbonate, and peptone, and if these combinations possibly occurred in autoclave or merely by mixing.

The solutions, that had been sterilized by filtration, were not subjected to any heating, in order to decrease the bicarbonate transformation and to prevent an appreciable peptone alteration.

The differential technique adopted was that described originally ¹, but more advanced, having been used for these tests the water strains Patoc 1 and Fons, and the pathogenic strains Robinson and 3705.

Results and discussion

Our findings indicate that the differentiation occurs through the transformation of bicarbonate into carbonate at the time of sterilization; this effect should not be ascribed to pH; in fact the solutions do not show a pH change of appreciable extent; before and after sterilization the pH value is in the range between 6.9 and 7.3.

When strains are easily classified owing to their clear characteristics as pathogenic (strains 3705) or as saprophytic (Strain Patoc 1) the former are inhibited by medium n. 4 but not by medium n° 1; on the other hand water strains grow in both media giving excellent density. In the second passage through the peptonized medium at 33°C strains Patoc 1 grows easily while strain 3705 is inhibited completely whatever medium is employed for the first passage.

When strains are difficult to classify by means of this differential technique, as it happens with water strain Fons ond pathogenic strain Robinson, the passage on media n° 4 at room temperature does not allow, as in the previous case, to separate pathogenic from saprophytic strains. In this instance it is absolutely necessary to perform the second passage in peptonized medium and to incubate at 33°C. Filtered media n° 2 and n° 3 can not be used as selective media.

It is not advisable to incubate the second passage at room temperature, or to change the type of peptone used, although there are some peptones giving good possibilities; these peptones, according to our observations, are always inferior to proteose-peptone n° 3.

It should be also pointed out that it is more advisable to use sodium bicarbonate than sodium carbonate, which permits to take advantage of the dissociation of sodium bicarbonate during heating. Our results have shown that the 1‰ concentration of sodium carbonate is the most suitable, but the results obtained are inferior to those obtained through the original technique.

In view of our present knowledge, we deem it unadvisable to eliminate the first passage of the original technique, in medium without peptone, for none of the variations we used gave reliable results.

We think that all subsequent investigations should be centered upon this method, upon the choice of a lower incubation temperature since temperatures higher than 33°C present the disadvantages pointed out in the previous work.

It should be noted, however, that Percedol 1, which Fagiolo² indicated as one of the other strains not differentiable through the bicarbonate technique, is capable of growing in a medium without peptone at room temperature, but it is impossible to obtain its growth in a peptonized medium either at room temperature or in incubator.

Conclusions

- 1^o) The differentiation between saprophytic and pathogenic leptospirae by bicarbonate medium occurs through the transformation of bicarbonate in carbonate at the time of sterilization.
- 2^o) The substitution of sodium bicarbonate by sodium carbonate in the medium is not advisable. The type of peptone used in this work gives the best results.

Received November 16, 1972.

Accepted July 24, 1973.

J. MAZZONELLI * and G. T. DORTA DE MAZZONELLI **
Department of Microbiology

¹ MAZZONELLI, J. & M. CASTELLANI. Efecto del bicarbonato de sodio en la diferenciacion de leptospiras saprofitas y patogenas. *Veter. (UNNE)*, 1, 1 (1968).

² FAGIOLO, F. Criteri e metodi di differenziazione fra leptospire parassite e leptospire saprofitte, Tesi, Università degli Studi di Roma (1969).

* Assistant Professor, Chair of Infections Diseases of the Faculty of Agronomy and Veterinary Sciences-Corrientes (Argentine), guest of the Department of Microbiology of I.S.S.

** Assistant Professor, Chair of Public Health, Faculty of Veterinary Sciences, La Plata, Buenos Aires (Argentine), guest of the Department of Microbiology of I.S.S.

Utilizzazione del glucosio ^{14}C nel muscolo di *Carassius auratus*

Introduzione

Nel corso di una precedente indagine sulla distribuzione nei vari organi e tessuti di *Carassius auratus* della radioattività del glucosio marcato ^{14}C , è stato osservato che oltre il 50% della radioattività totale iniettata si ritrovava, ad un'ora dall'iniezione, nel tessuto muscolare. Inoltre l'analisi cromatografica dell'estratto alcoolico di tale tessuto aveva messo in evidenza una più elevata marcatura del G1P rispetto al G6P¹.

Con le esperienze riportate nella presente nota, si è cercato di estendere ed approfondire le osservazioni sopra riportate, polarizzando principalmente l'attenzione sulla valutazione dell'attività specifica dei due esoso-fosfati sopraindicati. Altre misure sono state effettuate per rendere più completo il quadro metabolico risultante dalla utilizzazione del glucosio nell'organismo eterotermo da noi preso in esame.

Metodica ed apparecchiature

Sono stati impiegati animali del peso medio di 20 g tenuti a digiuno da 24 h, iniettati per via intramuscolare all'inizio dell'esperienza con 10 μl di glucosio- ^{14}C uniformemente marcato [Glu- ^{14}C (U)], pari a 20 μC . L'attività specifica del tracciante era di 5×10^6 dpm/mole in una prima serie di esperienze, e di $6,7 \times 10^8$ dpm/mole in una seconda. Ad una ora dall'iniezione, durante la quale la temperatura della vasca era mantenuta a 16°C, l'animale era sacrificato e se ne prelevava la carcassa privata della pelle e dei vari organi interni. Questa era pesata ed omogenizzata a freddo in etanolo 60%, nel rapporto di 5 ml per grammo di tessuto fresco, al fine di estrarre i prodotti intermedi del metabolismo del glucosio². Lo omogenizzato era poi centrifugato, a 4°C, per 30 min a 20.000 rpm e si isolava così un surnatante limpido sul quale si effettuavano le successive procedure analitiche. La misura della radioattività totale era effettuata in apparecchiatura a scintillazione, usando microaliquote del campione addizionate di 10 ml di liquido di Bray³. Il rimanente dell'estratto era evaporato a freddo, ripreso con acqua e quindi cromatografato su colonna a scambio ionico, caricata con resina AG 1 \times 4 Cl, 200/400 mesh, dalle dimensioni di 30 \times 1 cm secondo la tecnica descritta da Bedetti *et al.*⁴. Sulle frazioni raccolte nel processo di eluizione si misurava la radioattività con il metodo sopraindicato, e si confermava la natura chimica dei metaboliti radioattivi isolati e la loro concentrazione col metodo descritto da Lowry⁵.

Le determinazioni di glicogeno erano effettuate con il metodo Walaas & Walaas⁶.

Risultati e discussione

Nella Tab. 1 sono riportate le quantità percentuali di radioattività incorporate nei metaboliti: glucosio (Glu), glucosio-1-fosfato (G1P), glucosio-6-fosfato (G6P) e acido lattico (Lact), a un'ora dall'iniezione di Glu- ^{14}C (U). Nella Fig. 1 è riportato un esempio rappresentativo del profilo cromatografico d'insieme risultante dalla misura della radioattività sulle frazioni eluite nel modo indicato nella sezione «Metodica e apparecchiature».

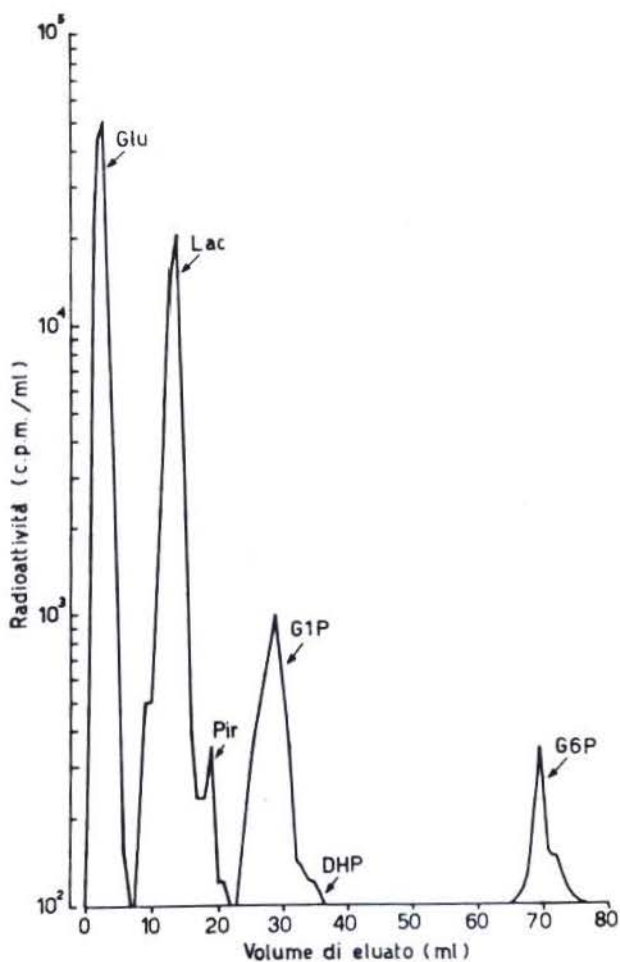


Fig. 1 — Radio-cromatogramma di un estratto di tessuto muscolare di *C. auratus* a 1 ora dall'iniezione di $\text{Glu-}^{14}\text{C}$ (U).

TABELLA I

Radioattività dei metaboliti in esame espressa in % di quella del campione iniettato

Exp.	Glu %	Lact %	G1P %	G6P %	G1P/G6P %
1	56	40	2,6	0,96	2,7
2	35	60	2,7	1,80	1,5
3	59	38	1,6	0,55	3,0
4	77	21	1,6	0,41	4,0
5	79	18	1,2	0,40	3,0

I risultati della Tab. 1 confermano la nota, elevata variabilità biologica tipica della specie esaminata ^{7,8}. In ogni caso, tuttavia, si osserva che il rapporto G1P/G6P è sempre maggiore di 1.

L'analisi enzimatica per misurare la quantità dei metaboliti radioattivi isolati cromatograficamente, ha dato i seguenti valori medi:

Glucosio	: 1550	± 233	mμmoli totali
G-1-P	: 272	± 38	mμmoli totali
G-6-P	: 352	± 66	mμmoli totali
Lattico	: 525	± 525	mμmoli totali

Nella Tab. 2 e nella Tab. 3 sono riportati i dati relativi alla determinazione del contenuto di glicogeno (Glyc) del muscolo e del fegato di animali a diversi intervalli di tempo dalla iniezione di glucosio marcato e alla misura della percentuale della radioattività totale inoculata, incorporata nel glicogeno stesso.

TABELLA 2

Contenuto in glicogeno del tessuto epatico e radioattività incorporata in esso

Tempo min	mg Glyc. % mg tess.	dpm % mg tess. (*).	Rad. perc. incorp. %
30	1,3	350	0,004
30	4,1	500	0,005
45	4,4	3100	0,030
60	4,4	25000	0,200
60	3,8	17500	0,070
120	2,7	40000	0,200
120	1,4	12500	0,100

(* La radioattività totale iniettata varia nella serie di esperienze; per questo viene data come significativa, ai fini di un confronto, la radioattività percentuale incorporata nel Glyc.

TABELLA 3

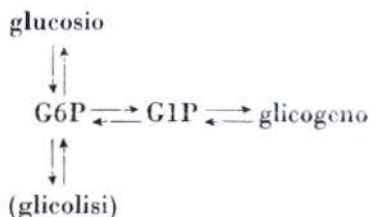
Contenuto in glicogeno del tessuto muscolare e radioattività incorporata in esso

Tempo min	mg Glyc. % mg tess.	dpm % mg tess. (*).	Rad. perc. incorp. %
60	0,70	220	0,002
60	0,80	308	0,003
120	0,46	353	0,030
120	0,24	2100	0,070

(* La radioattività incorporata nel Glyc. a 30 min è trascurabile in questo tessuto.

I dati sopra riportati confermano dunque che, nelle nostre condizioni sperimentali, la radioattività del glucosio marcato si ritrova in maggior quantità nel G1P che non nel G6P. Poiché la concentrazione chimica del secondo nel tessuto analizzato è maggiore di quella del primo, ne deriva che l'attività specifica del G1P è più elevata di quella del G6P.

Una situazione del genere è del tutto ingiustificabile in base alla concezione corrente del metabolismo glicolitico, secondo la quale i metaboliti interessati sono correlati tra loro in funzione dei seguenti equilibri dinamici:



È evidente che, fintanto che a monte esiste una significativa concentrazione di glucosio marcato, non può verificarsi, in base allo schema sopra indicato, la condizione da noi osservata sperimentalmente.

Poichè l'esistenza degli equilibri sopra indicati è ormai un dato fermamente acquisito, l'ipotesi che può essere avanzata per giustificare i fatti da noi osservati è quella della esistenza di eventuali pool metabolici separati per effetto di una qualche compartimentazione cellulare. In tal modo i valori analitici ottenuti sull'omogenato totale sarebbero giustificabili in quanto valori medi derivanti dal mescolamento dei pool al momento della rottura cellulare.

Già nel 1959 Shaw e Stadie⁹ avevano proposto l'esistenza di due sistemi di Embden-Meyerhof nel diaframma di ratto. Nel 1967 Landau e Sims¹⁰ hanno confermato ed esteso tale osservazione giungendo alla conclusione che nel diaframma di ratto esistono due pool di G6P.

Gli AA. ringraziano il Sig. Carlo Cantello per la collaborazione tecnica prestata.

Ricevuto il 12 marzo 1973.

Accettato il 13 aprile 1973.

RAFFAELLA CATANZARO e GIOVANNA DE BENEDICTIS (*)
Laboratori di Chimica Biologica

- ¹ CATANZARO, R. & G. DE BENEDICTIS. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **8**, 149 (1972).
- ² BELOFF-CHAIN, A., R. CATANZARO, E.B. CHAIN, I. MASI, F. POCCHIARI & C. ROSSI. *Proc. Royal Soc. Sez. B*, **143**, 481 (1955).
- ³ BRAY, G.A. *Am. Biochem. I.*, 279 (1960).
- ⁴ BEDETTI, G., G. D'AGNOLO & F. POCCHIARI. *J. Chromatog.*, **49**, 53 (1970).
- ⁵ LOWRY, O.H., J.V. PASSONEAU, F.X. HASSELBERG, & D.W. SCHULZ. *J. Biol. Chem.*, **239**, 18 (1964).
- ⁶ WALAAS, O. & E. WALAAS. *J. Biol. Chem.*, **187**, 769 (1950).
- ⁷ BROWN, W.D. *J. Cellular Comp. Physiol.*, **55**, 81 (1960).
- ⁸ DEAN, J.M. *Comp. Biochem. Physiol.*, **29**, 185 (1969).
- ⁹ SHAW, W.N. & W.C. STADIE. *J. Biol. Chem.*, **234**, 2491 (1959).
- ¹⁰ LANDAU, B.R. & E.A.H. SIMS. *J. Biol. Chem.*, **242**, 163 (1967).

(*) Borsista dei Laboratori di Chimica Biologica.

Separazione e determinazione automatica di glucosammina e galattosammina mediante cromatografia a scambio ionico

È nota l'importanza biologica degli amminozuccheri in generale e principalmente della glucosammina e della galattosammina quali componenti di molte proteine (glicoproteine, mucoproteine, mucopolisaccaridi, glicolipidi, ed il problema relativo alla loro determinazione è stato affrontato da diversi AA. A seconda dei metodi scelti per la loro rivelazione e del materiale di partenza, può essere indispensabile separare gli amminozuccheri dagli amminoacidi e dagli eventuali peptidi risultanti dall'idrolisi delle proteine.

Molte, a tale riguardo, sono le metodologie proposte¹⁻⁹, ma non esistono, fra queste, tecniche analitiche di veloce attuazione.

La tecnica messa a punto nel nostro laboratorio consente la separazione e determinazione della Gluc-NH₂ e della Gal-NH₂ nel tempo di 75 min circa, impiegando la stessa metodica e strumentazione adoperata per l'analisi degli amminoacidi. Con l'uso di una colonna adatta alla separazione degli amminoacidi basici, l'eluizione delle esosammine avviene dopo l'eluizione degli amminoacidi acidi e neutri non separati, precedendo quella degli amminoacidi basici.

Materiali e metodi

Per la separazione e la rivelazione delle esosammine si è adoperato un analizzatore automatico per amminoacidi Beckman mod. 121 provvisto del dispositivo per prelievo, misura e immissione automatica del campione. Il sistema utilizza due colonne corte una delle quali viene rigenerata mentre l'altra è in condizioni di analisi.

TABELLA 1

Programma del procedimento automatico e condizioni sperimentali di analisi

TAPPE DEL PROGRAMMA	TIPO DI OPERAZIONE	TEMPI (min)	
		Singola tappa	cumulativi
1	Prelievo campione colonna 1 ; rigenerazione colonna 2; analisi colonna 2	2,5	2,5
2	Immissione campione colonna 1; rigenerazione colonna 2; analisi colonna 2	2,5	5,0
3	Rigenerazione colonna 2 ; analisi colonna 1	20,0	25,0
4	Equilibrio colonna 2 ; analisi colonna 1	50,0	75,0
5	Prelievo campione colonna 2 ; rigenerazione colonna 1; analisi colonna 1	2,5	77,5
6	Immissione campione colonna 2; rigenerazione colonna 1; analisi colonna 1	2,5	80,0
7	Rigenerazione colonna 1 ; analisi colonna 2	20,0	100,0
8	Equilibrio colonna 1 ; analisi colonna 2	50,0	150,0

CONDIZIONI SPERIMENTALI DI ANALISI
 tipo di resina: Aminex 7 (Biorad)
 dimensioni delle colonne: 25 x 0,9 cm
 altezza della resina: 16 cm
 temperatura: 55° C
 flusso tampone: 50 ml/h
 flusso ninidrina: 25 ml/h
 tampone citrato: pH: 4,25, conc. Na 0,38 N

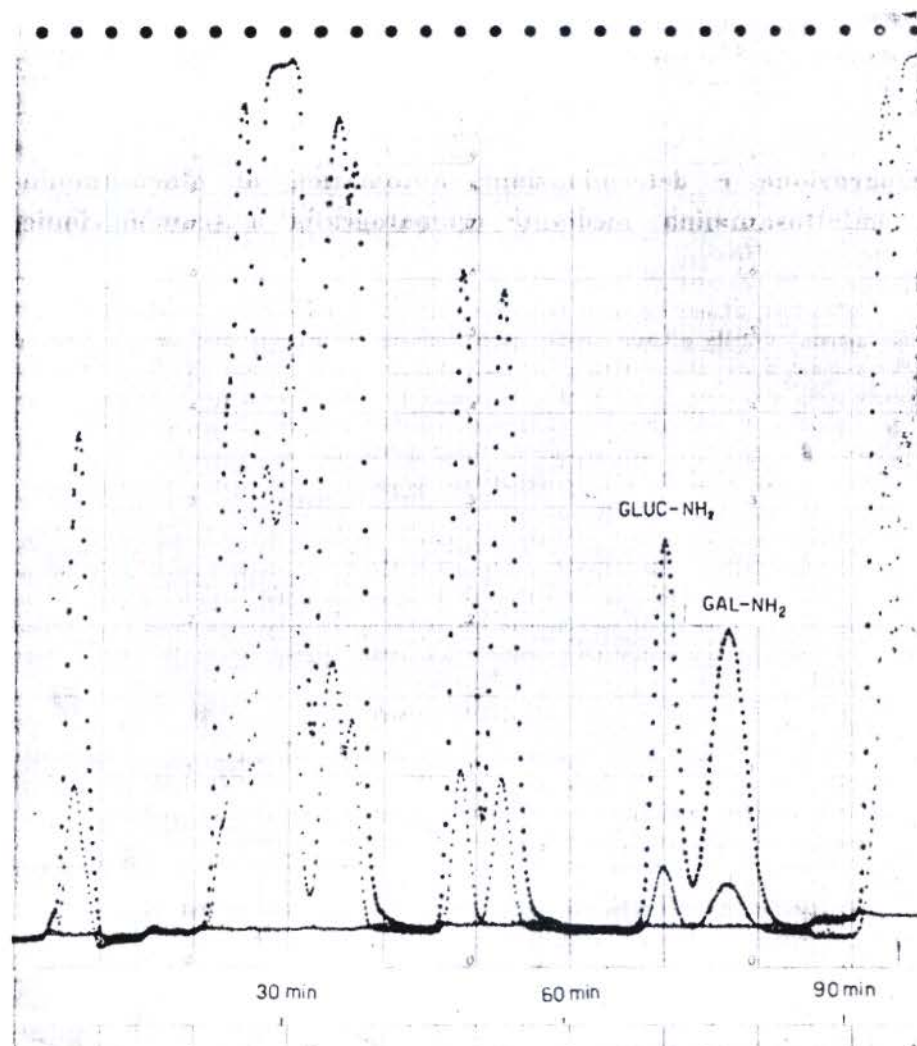


Fig. 1 — Separazione di Gluc-NH₂ e Gal-NH₂ da una soluzione contenente una miscela standard di aminoacidi.

TABELLA 2

Confronto fra dato e trovato e deviazione standard per una serie di determinazioni eseguite su campioni a varie concentrazioni di Gluc-NH₂ e Gal-NH₂

DATO		TROVATO		DEVIAZIONE STANDARD	
μmoli/ml				%	
Gluc-NH ₂	Gal-NH ₂	Gluc-NH ₂	Gal-NH ₂	Gluc-NH ₂	Gal-NH ₂
0,050	0,050	0,048	0,051	± 3,8	± 5,1
0,100	0,100	0,098	0,098	± 2,1	± 2,5
0,250	0,250	0,249	0,255	± 1,8	± 1,2
0,500	0,500	0,501	0,500	± 2,0	± 2,1
1,000	1,000	0,989	1,004	± 2,2	± 1,9

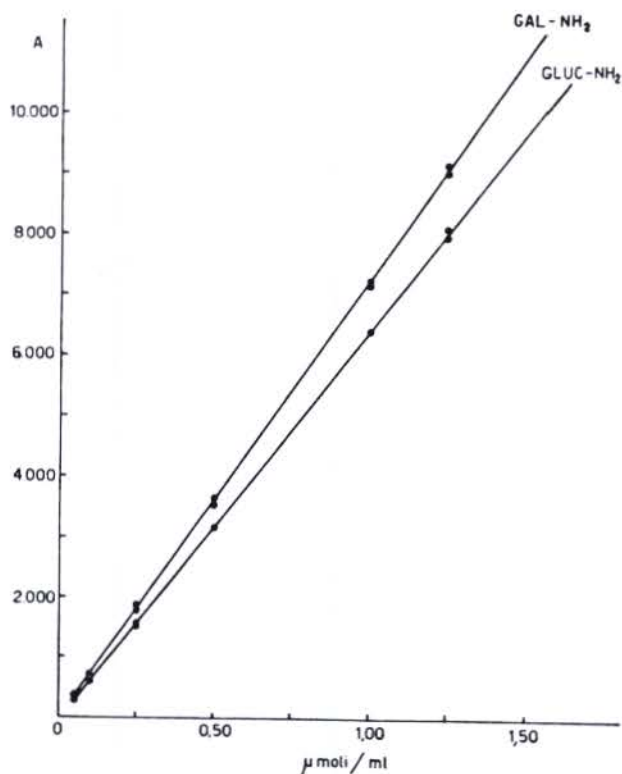


Fig. 2. — Relazione fra area del picco (in unità arbitrarie) e concentrazione, osservata in una serie di determinazioni di Gluc-NH₂ e Gal-NH₂.

metodo è convalidata dalle deviazioni standard (Tab. 2) relative ad una serie di determinazioni eseguite su campioni di Gluc-NH₂ e Gal-NH₂ a diverse concentrazioni: per ogni campione la determinazione è stata ripetuta 10 volte.

Ricevuto il 15 aprile 1973.

Accettato il 23 giugno 1973.

GINO MORISI e NORMANNO ACCARDI (*)
Laboratori di Chimica Biologica

- ¹ SALTON, M. R. J. *Ann. Rev. Biochem.*, **34**, 143 (1965).
- ² ELSON, L. A. & W. T. MORGAN. *Biochem J.*, **27**, 1824 (1933).
- ³ LEVY, G. A. & A. McALLAN. *Biochem J.*, **73**, 127 (1959).
- ⁴ GARDELL, S. *Acta Chem. Scand.*, **7**, 207 (1953).
- ⁵ CRUMPTON, M. J. *Biochem J.*, **72**, 479 (1959).
- ⁶ REISSING, J. L. & J. L. STROMINGER. *J. Biol. Chem.*, **217**, 959 (1955).
- ⁷ GREGORY, J. D. & T. C. LAURENT. *J. Biol. Chem.*, **239**, 3312 (1964).
- ⁸ RONDLE, C. J., & W. T. MORGAN. *Biochem. J.*, **61**, 586 (1955).
- ⁹ BOLAZS, E. A., & L. KAROSSA. *Anal. Biochem.*, **12**, 559 (1966).

(*) Borsista dei Laboratori di Chimica Biologica.

Nella Tab. 1 è indicato il programma delle operazioni che automaticamente si susseguono e le condizioni sperimentali di analisi.

Risultati

La Fig. 1 rappresenta il tipico tracciato relativo alla separazione e determinazione della Gluc-NH₂ e della Gal-NH₂ aggiunte ad una miscela standard di aminoacidi.

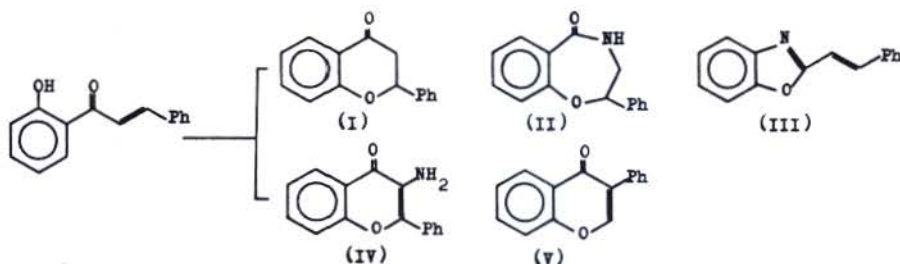
La Fig. 2 mostra la relazione fra concentrazione, espressa in μmoli/ml, e l'area del picco corrispondente (calcolata con un integratore automatico digitale, Beckman, Mod. 125 ed espressa in unità arbitrarie).

È evidente la linearità della risposta per concentrazioni comprese fra 0,050 e 1,50 μmoli/ml.

La riproducibilità del metodo

Reaction of hydrazoic acid with 2'-hydroxy-chalcone

In connection with our studies on the synthesis of heterocyclic compounds by the Schmidt reaction¹⁻⁴, we examined the reaction of hydrazoic acid with 2'-hydroxy-chalcone. In this reaction, carried out in trichloroacetic acid or in a mixture of sulphuric and acetic acid, we were able to isolate, by chromatographic separation, and to identify compounds (I-V), by comparison with authentic samples.



Flavanone (I), formed by acid treatment of the starting 2'-hydroxy-chalcone, undergoes Schmidt rearrangement giving 2.3-dihydro-2-phenyl-1,4-benzoxazepin-5(4H)-one (II), m.p. 125-6° (Yield ca. 15%) as previously described^{1, 4, 5}. 2'-Hydroxy-chalcone by direct attack of hydrazoic acid gives 2-styryl-benzoxazole (III), m.p. 83-4°⁶ (Yield ca. 20%), through an aryl migration generally observed in the Schmidt reaction on aryl-ketones⁷ and *o*-hydroxy-ketones⁸. The mechanism of formation of 3-amino-flavone (IV), m.p. 134-5°⁹ (Yield ca. 15%) and isoflavone (V), m.p. 132-3° (Yield ca. 20%), is not yet proved.

The formation, in a significant yield, of isoflavone from 2'-hydroxy-chalcone is an additional example of the rearrangement of a flavanoid to an isoflavanoid skeleton and involves a 1,2-phenyl-migration. It is of interest to consider that a 1,2-phenyl-migration occurs in the established biosynthetic pathway from chalcones to isoflavones¹⁰. However the above rearrangement has been chemically achieved, through different mechanism, by the thallium¹¹-acetate oxidation of chalcones¹¹, by the reaction of a flavanol with phosphorus trichloride¹², by the lead-tetra-acetate oxidation of flavanones¹³ and finally by the reaction of boron-trifluoride with a chalcone epoxide¹⁴.

The mechanism of isoflavone formation in our conditions is under further investigation.

The author is indebted to Dr. M. Michalska, Dr. R. Bognar and Dr. K. Nakagawa for supplying samples of the compounds III and IV and Miss G. Camarda for her technical assistance.

Received November 15, 1972.

DOMENICO MISITI

Department of Therapeutical Chemistry

(*) La Redazione non si ritiene responsabile delle opinioni espresse dagli Autori nelle Lettere alla Redazione.

- ¹ MISITI, D. & V. RIMATORI. *Tetrahedron Letters*, 947 (1970).
- ² MISITI, D. & V. RIMATORI. *Gazz. Chim. Ital.*, **101**, 167 (1971).
- ³ MISITI, D., F. GATTA & R. LANDI-VITTORY. *J. Heterocyclic Chem.*, **8**, 231 (1971).
- ⁴ MISITI, D. & V. RIMATORI. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **9**, 150 (1973); MISITI, D., V. RIMATORI & F. GATTA. *J. Heterocyclic Chem.*, **10**, 689 (1973).
- ⁵ LOCKHART, I. M., *Chem. Ind. (London)*, 1844 (1968).
- ⁶ NAKAGAWA, K., H. ONOUE & J. SUGITA. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **12**, 1135 (1964). BYWATER, W. G., W. R. COLEMAN, O. KAMM & H. MERRITT. *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 905 (1945); SKRAUP, S., *Ann. Chem.*, **419**, 1 (1919).
- ⁷ SMITH, P.A.S. In: *Molecular Rearrangements*, P. de Mayo, Ed., Interscience, N. Y. 1963, Part I, p. 457; MIREK, J. *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Chim.*, **10**, 421 (1962), *Zeszyty Nauk. Univ. Jagiel. Pr. Chem.*, N° **10**, 61 (1965), *Chem. Abst* **66**, 37125^b (1967); FUSCO, R. & S. ROSSI. *Gazz. Chim. Ital.* **81**, 511 (1951).
- ⁸ PALAZZO, S. & G. MAZZONE. *Ann. Chim. (Rome)*, **48**, 1329 (1958).
- ⁹ MICHALSKA, M. *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Chim.*, **16**, 567 (1968), *Chem. Abst.* **70**, 87466^v (1969); BOGNAR, R. & M. RAKOSI, *Ann. Chem.* **693**, 225 (1966), *Chem. Abst.*, **65**, 8864^b (1966); KASAHARA, A. *Nippon Kagaku Zasshi*, **80**, 416 (1959), *Chem. Abst.* **55**, 5481 (1961); BOGNAR, R., C. O'BRIEN, E. M. PHILBIN, S. USHIODA & T. S. WHEELER, *Chem. Ind. (London)*, 1960, 1186.
- ¹⁰ WONG, E. *Chem. Commun.*, 365 (1968), *Phytochemistry*, **7**, 1751 (1968) and references therein; GRISEBACH, H. In: *Recent Advances in Phytochemistry*, T. J. Mabry, R. E. Alston and V. C. Runeckles, Ed., Appleton-Century-Crofts, N. Y., 1968, ch. 11; In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, T. W. Goodwin, Ed., Academic Press, London, 1965, 279, and references therein; GRISEBACH, H. & W. D. OLLIS. *Experientia*, **17**, 4 (1961).
- ¹¹ OLLIS, W. D., K. L. ORMAND & I. O. SUTHERLAND. *Chem. Commun.*, 1237 (1968); *J. Chem. Soc. (C)*, 119 (1970), *ibidem*, 125 (1970).
- ¹² CLARK-LEWIS, J. W. & W. KORYTNYK. *J. Chem. Soc.*, 2367 (1968); FREUDENBERG, K., G. CARRERA & E. COHN. *Ann. Chem.*, **446**, 87 (1926).
- ¹³ CAVILL, G. W. K., F. M. DEAN, A. MCGOOKIN, B. M. MARSHALL & A. ROBERTSON. *J. Chem. Soc.*, 4573 (1954).
- ¹⁴ HOUSE, H. O. *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2298 (1956); HOUSE, H. O., D. J. REIF & R. L. WASSON. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2490 (1957); HOUSE, H. O. & G. D. RYERSON. *ibidem*, **83**, 979 (1961); GRISEBACH, H. & W. BARZ. *Chem. Ber.*, **97**, 1688 (1964); GRISEBACH, H. In: *Recent Developments in the Chemistry of Natural Phenolic Compounds*, W. Ollis, Ed., Pergamon Press, Oxford, p. 69; LITKEI, G. & R. BOGNAR. *Kemai Kozlem.*, **34**, 249 (1970) and references therein.

The hemoglobin of quail erythrocyte nuclei

Absorption measurements in violet light of thin sections of mature amphibian erythrocytes have indicated the presence of a heme compound, probably hemoglobin, within the chromosomal region of the nucleus¹. D'Amelio and Salvo isolated a small amount of hemoglobin-like substance from exhaustively purified nuclei of chicken erythrocytes². This hemoglobin behaved as a single component as judged by electrophoresis and by immunological tests^{2,3}. In the present study the isolation and some chemico-physical properties of hemoglobin from mature avian erythrocytes are described.

All the experiments concerning the isolation of erythrocytes, and the purification of hemoglobin were carried out at 4° C; the solutions employed contained 10⁻⁴ M EDTA. Adult quails (*Coturnix coturnix*) were used. The blood was obtained by decapitation of birds and collected in chilled acid-citrate-dextrose (ACD) solution. The pooled erythrocytes from several animals were separated from the plasma by centrifugation for ten minutes at 300 × g and subsequently washed four times with 0.9% NaCl solution.

Isolation of erythrocyte nuclei was performed as follows: red cells were hemolysed by shaking for 5 minutes with distilled water plus 0.2 ml of CCl₄ per 1 ml of water (the volume



Fig. 1 — Electron micrograph of nuclei isolated from quail erythrocytes. Fixation: glutaraldehyde-OsO₄ in phosphate buffer pH 6.6 with sucrose and CaCl₂. X 12000

of water was equal to the initial volume of blood). The suspension was immediately centrifuged for 7 minutes at 700 × g; the supernatant and CCl₄ were discarded. Liberated nuclei were resuspended in 20 volumes of 0.25 M sucrose (pH 6.4) and mildly homogenized in a Potter type glass homogenizer for 30 seconds: the suspension was then shaken for 5 minutes and centrifuged for 7 minutes at 700 × g. The washings were repeated 5-6 times until the supernatant appeared to be clear and colorless and the sediment was finally washed once more with a 10⁻⁴ M EDTA. The nuclei thus prepared were examined for purity by light microscope (methyl-green pyronine staining) and also by electron microscope.

Isolation, purification and concentration of the nuclear oxygenated hemoglobin (HbO₂) was accomplished as follows: the purified nuclei were homogenized with a 0.9% solution of NaCl in 0.07 M phosphate buffer (pH 7.4); after 10 minutes the residual gelatinous clot was removed by centrifugation for 15 minutes at 9000 × g. The clear solution of nuclear hemoglobin was dialyzed for 18 hours against 0.01 M phosphate buffer (pH 6.6). The precipitate formed during dialysis was removed by centrifugation and the resulting hemoglobin solution was adsorbed on a

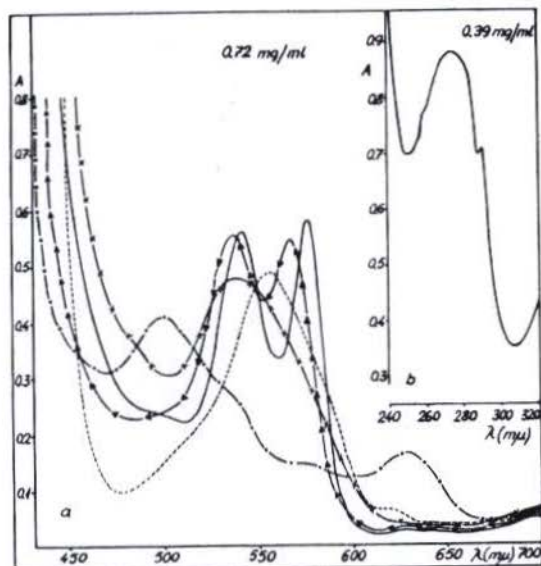


Fig. 2 — a) Spectra in visible light of nuclear: — HbO₂; - - - Hb; - x - x HiCN; - ▲ - ▲ HbCO; - - - HbOH from quail erythrocytes. b) Spectrum in ultraviolet light of nuclear HbO₂ from quail erythrocytes.

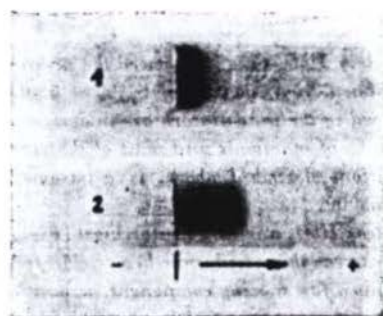


Fig. 4. — Starch-gel electrophoresis of nuclear HbO₂ (1) and HiCN (2) from quail erythrocytes.

Fig. 5. — Polyacrylamide-gel electrophoresis of nuclear HbO₂ (1) and HiCN (2) from quail erythrocytes.



Fig. 3 — Sedimentation patterns of nuclear HbO₂ (4.21 mg/ml) in 2% boric acid buffer pH 8.8 (top) and 0.01 M phosphate buffer pH 6.6 (bottom). The photographs were taken 72 minutes after reaching the full speed of 59780 rpm.



carboxymethyl-cellulose column (Whatman CM-32, 1×2 cm) equilibrated with 0.01 M phosphate buffer (pH 6.6). The elution of non-heme material was completed with 20 ml of phosphate buffer (pH 6.6) and the hemoglobin was subsequently eluted by addition of 5-10 ml of 0.2 M phosphate buffer (pH 8) and dialyzed against the equilibrium buffer.

The nuclear hemoglobin derivatives: deoxygenated (Hb), cyano-meta (HiCN), carbon monoxide (HbCO) and methemoglobin (HbOH) were prepared as described by Cavallini⁴. Spectral analyses were performed on nuclear hemoglobin derivatives solutions in 0.01 M phosphate buffer (pH 6.6) by means of a Cary 15 recording spectrophotometer in the visible spectrum (700-450 nm) and in the ultraviolet spectrum (320-240 nm). The hemoglobin concentration was determined using the cyano-meta derivative on the basis of the extinction coefficient $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 6.83$ at 540 nm.

Starch-gel electrophoresis was carried out by the technique of Smithies⁵ using the discontinuous buffer system of Huisman⁶. The disc electrophoresis on polyacrylamide-gel was performed in 7×0.6 cm glass columns by means of a Canalco apparatus by the technique described by Ornstein⁷ and Davis⁸.

The sedimentation experiments were performed by means of a Spinco Model E analytical ultracentrifuge; HbO₂ solution (4.21 mg/ml) in two different buffers (2% boric acid buffer, pH 8.8 and 0.01 M phosphate buffer, pH 6.6) were centrifuged at 3° C in Kd F cells at 59780 rpm. The photographic plates were read by a microcomparator. Values of the sedimentation coefficient were reduced in the conventional way to $S_{20,w}$ and expressed in Svedberg units. Prior to centrifugation the hemoglobin solution was equilibrated with the appropriate buffer by dialysis.

The results obtained indicate that the nuclei of mature avian erythrocytes contain hemoglobin. This hemoglobin is easily isolated using the solution at pH above 6.8 in the course of its extraction from the nuclei: in these conditions the nuclear membranes are destroyed.

The nuclear hemoglobin forms typical derivatives whose absorption spectra in the ultraviolet and in the visible range are identical to those of human hemoglobin and of the other known hemoglobins of vertebrates (Fig. 2).

The sedimentation pattern of the unfractionated nuclear HbO₂ (Fig. 3) showed the presence of only one molecular species of heme protein with a sedimentation constant of $S_{20,w} = 4.40$ at pH 8.8, and 4.55 at pH 6.6. The values of $S_{20,w}$ obtained in the present work are in agreement with published data on the hemoglobins from red blood cells of mammals and most of the vertebrates⁹⁻¹¹ and suggest that this hemoglobin, in the conditions described above, is a tetrameric molecule having a molecular weight of about 64000-65000.

The electrophoretic experiments indicate that the nuclear HbO₂ migrates in starch-gel (Fig. 4) and polyacrylamide-gel (Fig. 5) as a single component, whereas the cytoplasmic hemoglobin from the same erythrocytes in the same conditions separates into a fast moving component, accounting for about 20% of the total hemoglobin, and a slow moving component which accounts for the remaining 80%¹². However the nuclear HiCN when submitted to electrophoresis in the same experimental conditions, separates into two components of different electrophoretic mobility. It is therefore possible that the nuclear hemoglobin of avian erythrocytes is heterogeneous; further investigation on this problem is in progress.

The authors wish to express their deep gratitude to prof. D. Bocciarelli for the electron micrographs and to dr. R. Elli for the sedimentation experiments.

Received January 10, 1973.

RYSZARD WIERZBICKI (*), MARIA ORLANDO, LEONARDO TENTORI and GIROLAMO VIVALDI
Department of Biology

(*) Institute of Biochemistry and Physiology, University of Lodz, Poland; fellow in the Department of Biology.

- ¹ TOOZE, J. & H. G. DAVIS. *J. Cell. Biol.*, **16**, 501 (1963).
- ² D'AMELIO, V. & A. M. SALVO. *Exptl. Cell. Res.*, **18**, 364 (1959).
- ³ D'AMELIO, V. *Biochim. Biophys. Acta*, **127**, 59 (1966).
- ⁴ CAVALLINI, D. *Le Emoglobine*, *Il Pensiero Scientifico*, Roma, 1958, p. 165.
- ⁵ SMITHIES, O. *Biochem. J.*, **61**, 629 (1955).
- ⁶ HUISMAN, T. H. J. *Clin. Chim. Acta*, **5**, 709 (1960).
- ⁷ ORNSTEIN, L. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 321 (1964).
- ⁸ DAVIS, B. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404, (1964).
- ⁹ CHIANCONE, E. & G. A. GILBERT. *J. Biol. Chem.*, **240**, 3866 (1965).
- ¹⁰ CHIANCONE, E., L. M. GILBERT, G. A. GILBERT & G. I. KELLETT. *J. Biol. Chem.*, **243**, 1212 (1968).
- ¹¹ TRADER, C. D., J. S. WORTHAM & F. FRIEDEN. *Science*, **139**, 918 (1963).
- ¹² ORLANDO, M., M. SORCINI & M. MARINUCCI. Communication to the 38th General Meeting of The Soc. Ital. Biol. Sper., Alghero, 24-27 september, 1969.

Congélation rapide continue à impulsion de denrées périssables à l'aide d'aérosols de glace sèche (*)

CARMELO CURUNELLA (**), BERNARDO DI GRAZIA e UGO SELLERIO

Laboratoires des Ingénieurs

PREMISSSES

La congélation rapide de denrées périssables à l'aide de la glace d'acide carbonique a été employée déjà depuis quelque temps et on a, à ce sujet, un certain nombre de brevets d'invention qui ont trouvé parfois des applications industrielles d'un certain intérêt; entre autres, on peut ici rappeler un récent brevet américain qui vise à la congélation rapide de certains produits au moyen de glace sèche broyée (1) que on mêle au produit à congeler. Les granules de glace sèche qui ne sont pas sublimés sont séparés du produit et ensuite ils sont remis dans le cycle de refroidissement, ce qui permet leur recouvrement.

Ce procédé et d'autres semblables présentent toutefois l'inconvénient de risquer d'endommager des denrées qui sont particulièrement délicates; de plus, il est possible qu'ils se forment des poches gazeuses qui retardent la congélation, étant donné qu'elles réduisent les transmissions de chaleur entre l'agent réfrigérant et le produit.

En comparaison avec la congélation au moyen d'azote liquide, on a toutefois l'avantage d'une chaleur de sublimation élevée et d'une température qui n'est pas tellement basse de provoquer des chocs thermiques capables de donner lieu à des lésions dans la structure des produits.

En considérant les avantages auxquels peut donner lieu l'emploi de la glace sèche pour la congélation rapide de certaines denrées périssables on est parvenu à la conclusion qu'il est possible d'améliorer les procès technologiques de manière à rendre avantageuse l'utilisation de cet agent frigorifique en quelques cas et d'intégrer d'une quelque façon les méthodes de congélation actuellement existantes.

(*) Communication présentée au Congrès d'Eger de l'Association frigorifique hongroise le 21-26 Août 1972.

(**) Boursier chez les Laboratoires des Ingénieurs.

Le procès dont on dira dans ces notes se base sur l'arrosage intermittent de la surface du produit au moyen d'un jet d'aérosols de glace sèche.

Naturellement, étant donné qu'il s'agit d'acide carbonique, il n'est pas opportun de traiter des denrées qui contiennent de l'hémoglobine sauf si elles sont opportunément protégées par exemple au moyen d'enveloppes en matières plastiques ou bien en aluminium.

DESCRIPTION DU PROCÈS

Il est bien connu que si on dispose d'acide carbonique à l'état liquide et si on oblige ce liquide à passer à travers une soupape de lamination pour déboucher à la fin dans l'ambiant à la pression atmosphérique on aura en même temps deux phases, l'une gazeuse et l'autre solide sous forme d'aérosols. De la soupape de lamination il sort, en bref, un brouillard dont le pourcentage de gaz et de solide est en fonction de la température et de la pression de départ.

On peut donc congeler des produits aussi en arrosant leur surface avec ce brouillard autant plus que les aérosols de glace sèche adhèrent parfaitement à la surface mentionnée; par conséquent, ils soustraient rapidement — étant donné leur basse température égale à — 78,5° C — chaleur aux corps et, pendant ce procès, ils subliment.

En partant de ces considérations, on parvient tout de suite à la conclusion qu'il est inutile de continuer à arroser le produit avec le jet d'aérosols pendant que la couche mince de neige carbonique subsiste sur la surface du corps; il est bien plus avantageux d'arrêter le jet jusqu'au moment où la chaleur transférée du corps même à la neige ne l'ait pas entièrement volatilisée.

Et alors, au moment que la neige carbonique s'évanouit, on envoie un autre jet de brouillard et le procès se répète jusqu'au moment où la température « à coeur » du produit se porte à une valeur établie préalablement et qui, pour la plupart des denrées périssables se trouve autour de — 18° C.

De cette manière, on a un procès de refroidissement continu mais, en même temps, à impulsions avec le double avantage d'économiser de l'acide carbonique et d'éviter, en même temps, la formation de poches gazeuses dues à une accumulation tout à fait inutile de neige carbonique. La continuité du procès de refroidissement est bien assurée par la chaleur de sublimation de la neige et, par conséquent, on n'a aucune contradiction réelle entre la continuité de la soustraction de la chaleur et l'intermittence des jets d'aérosols.

Il faut remarquer, à ce point-ci, qu'au fur et à mesure que la congélation du produit procède, sa température superficielle se réduit et par conséquent on devrait prolonger la durée de la période entre un jet d'aérosols et le jet successif, c'est-à-dire réduire leur fréquence.

Etant donné que la congélation rapide des denrées périssables au moyen de tunnels se réalise en général avec des appareils dans lesquels les produits se déplacent avec une vitesse constante, l'on peut en pratique faire recours à deux solutions différentes: 1) disposer les dispositifs d'arrosage à une distance variable et progressivement croissante à partir de l'entrée jusqu'à la sortie du tunnel; 2) disposer les dispositifs mentionnés à une distance constante et réduire leur débit au fur et à mesure que l'on procède de l'entrée vers la sortie du tunnel.

Le choix entre les deux solutions ou bien l'adoption d'une solution intermédiaire est liée au type de tunnel et aussi aux résultats des recherches expérimentales.

DESCRIPTION DE L'EQUIPEMENT EXPERIMENTAL

L'équipement expérimental que l'on a employé pour ces recherches se compose: a) d'un petit tunnel de congélation à plateau tournant; b) d'un dispositif d'alimentation pour la source du froid; c) d'un dispositif de mesure et d'enregistrement des températures. Chacune de ces parties a posé des problèmes parfois compliqués, et par conséquent on est d'avis qu'il soit utile de lui donner un petit coup d'œil.

a) *Le tunnel expérimental.*

En adoptant une solution à développement linéaire, le tunnel aurait eu des dimensions trop grandes et, comme il advient presque partout, l'espace

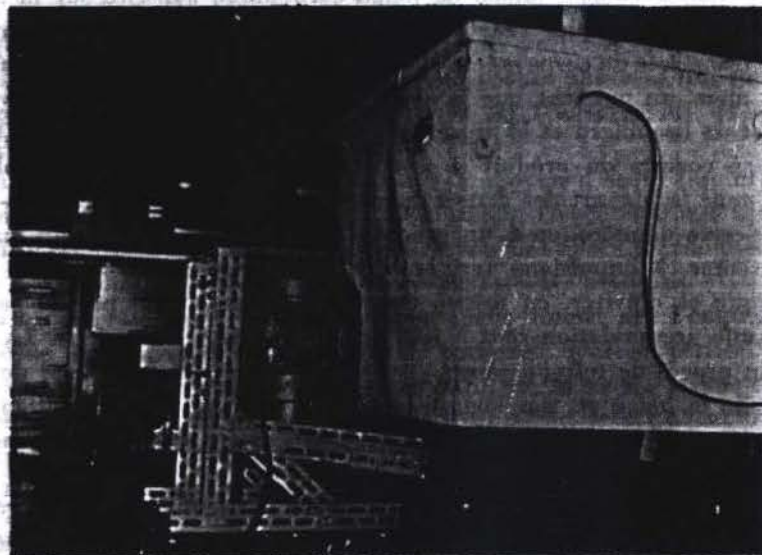


Fig. 1 — Vue d'ensemble du tunnel avec le moteur et le dispositif d'entraînement du plateau tournant.

n'est jamais abondant dans un laboratoire des recherches. Par conséquent, on a été obligé à faire recours à une solution différente et on est parvenu enfin à la conclusion qu'un tunnel à plateau tournant aurait répondu aux buts que l'on s'était proposé.

Ce tunnel est constitué par un coffre en polystyrène expansé ayant une densité très élevée (50 kg/m^3) et une épaisseur de 8 cm revêtu à l'extérieur par une feuille en polyéthylène au but d'assurer l'étanchéité du dispositif (Fig. 1); à son intérieur on trouve un plateau tournant autour d'un axe vertical sur lequel on dispose les produits à congeler (Fig. 2). Le plateau est mis en mouvement par un moteur monophasé à répulsion à vitesse varia-



Fig. 2 — L'intérieur du tunnel avec le plateau tournant; l'on voit à droite l'extrémité de la soupape d'étranglement et, vers gauche, les extrémités des couples thermoélectriques logées dans les produits.

ble et à travers un réducteur de vitesse qui se rend indispensable étant donné que dans ces moteurs-ci le couple change fortement avec le vitesse de rotation.

Dans le tunnel l'on trouve aussi deux soupapes d'étranglement dont on parlera par la suite.

Il faut remarquer que le couvercle du tunnel est fabriqué en matière plastique transparente, de manière à observer directement ce qu'il advient à l'intérieur et d'être par conséquent en condition de régler soit la vitesse du plateau tournant soit la quantité d'aérosols de glace sèche qui sort des soupapes d'étranglement. Le couvercle permet aussi d'introduire les produits à congeler et de les extraire lorsqu'ils sont congelés au coeur à une température préalablement établie.

b) *Le dispositif d'alimentation.*

Pour ne pas trop compliquer les choses on a travaillé pour ces expériences avec de l'acide carbonique liquide à la température ambiante; ce n'est pas le cas de rappeler que de cette manière les pertes dues à l'étranglement comportent une augmentation remarquable du titre de la vapeur à la sortie de la soupape d'étranglement et, par conséquent, dans le cas d'une application

industrielle du procès il faut faire attention pour réduire ces pertes dans le but d'améliorer l'économie du procès. Naturellement, cette question ne se posait pas pour des recherches de laboratoire.

Le dispositif d'alimentation qu'on a ici adopté est très simple, presque rudimentaire; on a donc des bouteilles à gaz pleines d'acide carbonique à l'état liquide qui sont renversées pour éviter l'entraînement des éventuelles traces d'eau. Leur sortie est unie à un filtre-sécheur à chlorure de calcium (Fig. 3). Le liquide desséché qui sort du filtre coule à travers deux soupapes d'étranglement à débit réglable qui sont placées l'une en face de l'autre sur

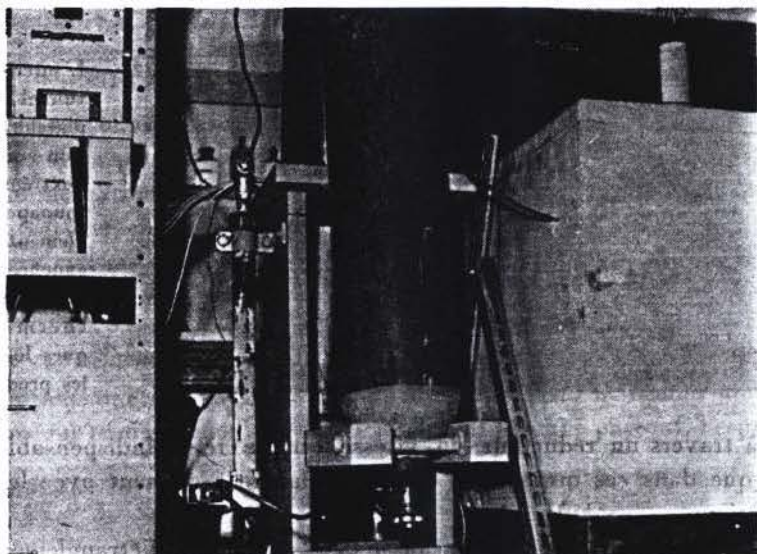


Fig. 3 — Tunnel, bouteilles à gaz et filtre-sécheur

les parois du coffre du tunnel et ayant leurs sorties à l'intérieur du tunnel même de manière à arroser avec les jets de neige carbonique les produits disposés sur le plateau tournant, sur deux faces opposées; d'une telle manière on a constaté qu'il est possible d'obtenir un arrosage complet et aussi uniforme.

L'acide carbonique liquide, avant d'arriver aux deux soupapes mentionnées, vient sous-refroidi au moyen d'un petit échangeur de température qui utilise la chaleur sensible des gaz qui échappent du tunnel.

On règle, en même temps, soit la vitesse de rotation du plateau soit ce débit des soupapes de manière que entre un passage du produit et le successif devant le jet qui sort d'une des soupapes, la couche mince de neige carbonique qui s'est déposée sur sa surface soit entièrement volatilisée.

On a rencontré des difficultés remarquables dans la réalisation des soupapes d'étranglement étant donné qu'il se présentait des obstructions; on a

surmonté le problème en employant des spéciales vannes pointeaux, réalisées avec l'aide de M. l'Ing. Biancalana, Directeur Général de la S.té Pergine de Florence, qu'on veut ici remercier cordialement.

c) *Le dispositif de mesure et d'enregistrement des températures.*

Pour terminer cette description, il faut encore dépenser quelques mots sur le dispositif de mesure et d'enregistrement des températures.

On a employé à ce propos des thermocouples cuivre-constantan qui ont été joints à un thermostat thermoélectrique à zéro et aux instruments de mesure, par le train d'un commutateur tournant, étant donné que l'une des extrémités des thermocouples était introduite dans le produit. Le commutateur a été étudié expressément et a été aussi réalisé dans le Laboratoire. L'ensemble commutateur-thermostat de zéro est en

condition de travailler, en même temps, avec 25 couples thermoélectriques.

L'équipement de mesure et d'enregistrement des températures proprement dit est représenté dans la Figure 4 et il est constitué par un système d'acquisition d'informations qui comprend un balayeur électronique pour l'exploration automatique des 25 thermocouples, un voltmètre électronique digital capable d'effectuer des mesures de l'ordre du microvolt, et enfin une machine à imprimer électronique digitale. Avec ce système il est possible d'avoir un nombre très grand d'informations et d'enregistrer leur valeur d'une manière continue.

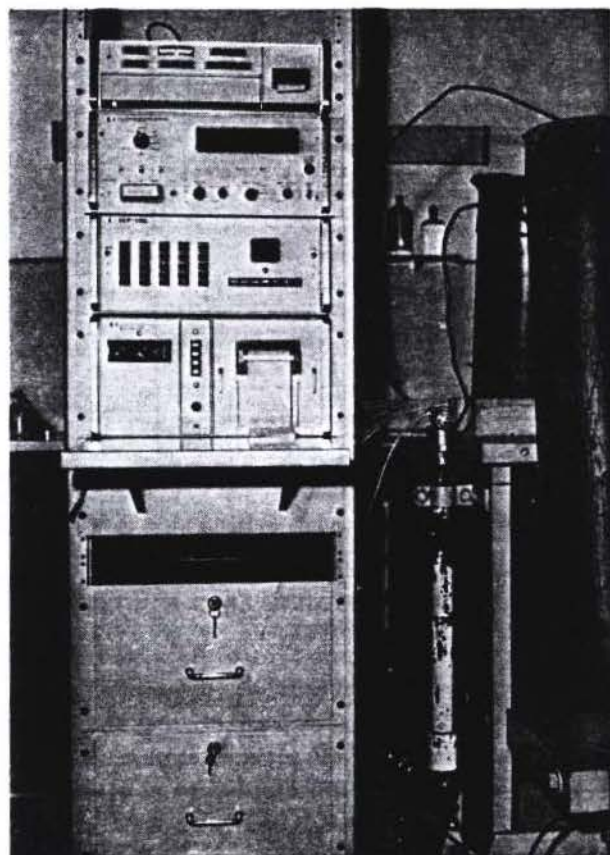


Fig. 4 — Dispositif de mesure et d'enregistrement des températures: le système d'acquisition des informations.

QUELQUES INFORMATIONS SUR LES ESSAIS

Les recherches mentionnées durent d'après trois ans environ et on a eu l'occasion de congeler avec ce système beaucoup de denrées périssables, surtout des végétaux; des essais ont été exécutés avec les produits nus, des autres avec les produits enveloppés sous vide. On a congelé des carottes, des champignons, des artichauts, des épinards, des asperges, des fenouils, des céleris, des chardons, des laitues avec des résultats qu'on peut considérer très satisfaisants. Pour beaucoup de denrées la couleur, après trois ans de conservation à la température de -24°C , est restée telle quelle. Nous avons aussi mangé des chardons vieux de trois ans. Après un an d'une telle conservation on a constaté pour les champignons la tendance au noircissement.

Nous avons aussi congelé des pommes seulement dans le but d'observer la répartition des températures à l'intérieur de ces corps; il faut dire qu'au moment de la décongélation les fruits étaient complètement abîmés, en conditions de n'être absolument plus utilisés.

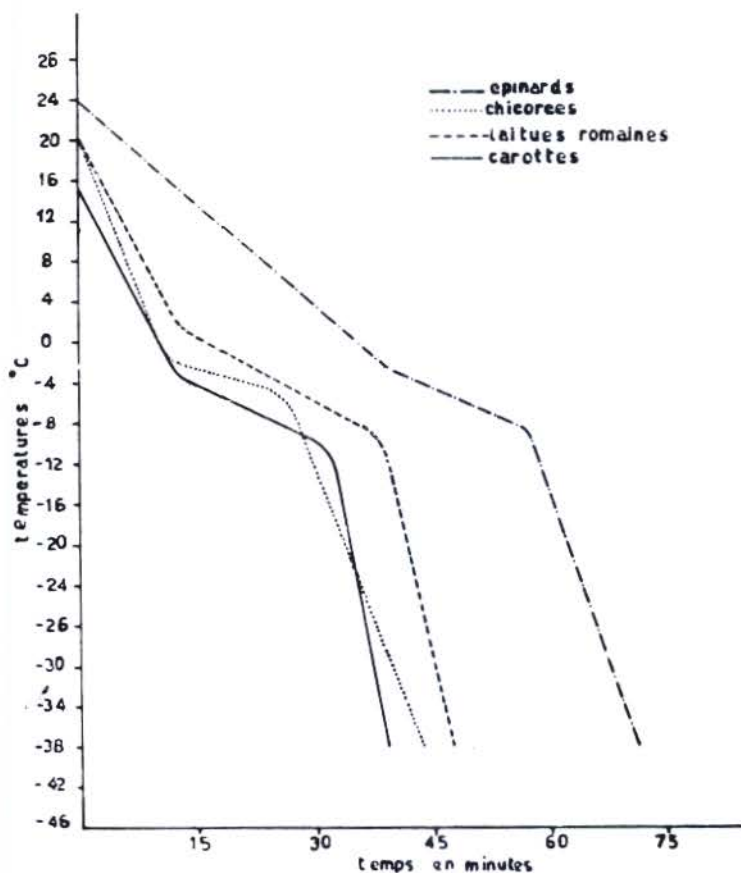


Fig. 5 — Courbes de congélation de certains végétaux.

Dans les Fig. 5 et 6 on a représenté des courbes de congélation pour un certain nombre de végétaux; on peut observer que dans les végétaux qui ne possèdent pas de structure compacte, la durée du procès est remarquable. Il est possible qu'avec un tunnel plus parfait que celui utilisé (ce qui n'est pas difficile à réaliser) on puisse obtenir des temps de congélation plus favorables.

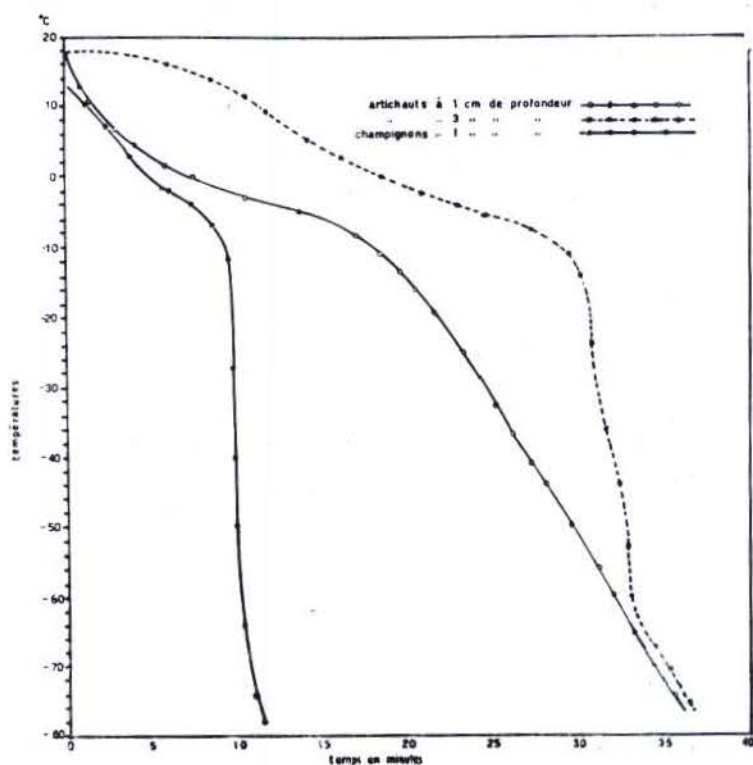


Fig. 6 — Courbes de congélation pour des champignons et des artichauts.

QUELQUES CONSIDERATIONS SUR LA POSSIBILITE D'APPLICATIONS INDUSTRIELLES DU PROCES

L'équipement mentionné n'a pas été conçu pour une production industrielle de denrées congelées mais seulement pour essayer une nouvelle méthode de congélation rapide. Par conséquent, ces recherches n'ont pas le but d'analyser la rentabilité du procès même.

En tout cas, dans les applications pratiques il faut considérer deux questions fondamentales, c'est-à-dire la qualité finale des produits et les frais que comporte un procès par rapport à un autre. Dans ce cas, le coût du tunnel est bien modéré et sa fabrication est simple, mais le coût de l'acide

carbonique liquide change d'une manière remarquable non seulement d'un Pays à un autre mais aussi, parfois, d'une zone à l'autre dans un même Pays.

De plus, il faut s'efforcer d'obtenir d'un kilogramme d'acide carbonique à l'état liquide la plus grande quantité de neige carbonique; pour avoir à la sortie de la soupape d'étranglement une vapeur ayant un titre faible il se rend nécessaire de baisser la température du liquide avant son entrée dans la soupape à -50°C . Il n'est pas avantageux d'arriver à des températures plus basses car il y a alors le risque de la congélation de la masse liquide. On peut obtenir ce refroidissement par exemple au moyen d'une machine frigorifique à R 22 et en utilisant, en même temps, la chaleur sensible des gaz carboniques qui sortent du tunnel.

Pour congeler un végétal jusqu'à arriver au cœur à la température de -20°C il est nécessaire de soustraire environ 120 kcal/kg; un kg de glace sèche permet de soustraire entre chaleur latent et chaleur sensible utilisable à peu près 149 kcal, et, par conséquent, il sera indispensable de disposer de 0,8 kg de glace sèche pour chaque kg de végétal. Dans les conditions de refroidissement du liquide illustrées, on peut obtenir un kg de glace sèche en partant de 1,7 kg d'acide carbonique liquide, à cause des pertes pendant l'étranglement.

Sur la base de ces notes on peut avoir une idée des coûts de congélation avec le procès que l'on vient ici d'exposer.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) BREVET U.S.A. « Procédé et appareil de refroidissement rapide de produits alimentaires », n. 13157/65 au nom de Thermic Corporation Philadelfia 1965.
On a consulté, pendant ces recherches, les travaux dont ci-dessous:
 VELICIANSKI, A. J. *Kholodil'n Tekhn.*, n. 8 (1970).
 TALYANKER, Y. & O. N. KONSTANTINOVA. *Kholodil'n. Tekhn.*, n. 3 (1970).
 FEDOTOV, E. L. *Kholodil'n. Tekhn.*, n. 1 (1970).
 SELLERIO, U. *Quaderni di merceologia.*, 7, fascicule II, (1968).
 BARDON, J. P. *Rev. Gén. Thermique*, 11, n. 5 (1972).
 CRESPI, F. Thèse pour le Doctorat d'Ingénieur, Université de Palermo (1969), Relateur U. Sellerio.
 SELLERIO, U. *Potravinárska A Chladiči Technika*, n. 6 (1971).
 KUPRIANOFF, J. *Die feste Kohlensäure*, Enke, Stuttgart 1953.
 HODGMAN, C. D. *Handbook of Chem. and Phys.*, Chem. Rubber Publ. CO, 1960.
 PLANK, R. & J. KUPRIANOFF *Z. Ges. Kalteind.*, 36, 41 (1929).
 ROTHMAN, A. J. & L. A. BROMLEY. *Ind. Eng. Chem.*, 47, 899 (1955).
 EUCKEN, A. & H. ENGLERT *Z. Ges. Kalteind.*, 45, 109 (1938).
 CRAMER, F. *Chem. Ingr. Tech.*, 27, 484 (1955).
 SWEIGERT, R. L., P. WEBER & R. L. ALLEN. *Ind. Eng. Chem.*, 38, 185 (1946).
 FEDOTOV, E. L. *Kholodil'n. Tekhn.*, n. 5 (1969).
 LEHNER, K. A. *ASHREA J.*, n. 6 (1971).
 HURTEAUX, J. *Rev. Gén. Froid*, n. 7 (1968).
 BAULINO, C. *Trattato di Macchine Termiche*, Ed. Vallardi, Milano, 1957.
 SELLERIO, U. *Lezioni di Tecnica del Freddo*, Ed. Sistema, Roma, 1968.