

Valori ponderali dello sviluppo di alcuni miceti in atmosfere rarefatte di ossigeno

ANNA TESTI CAMPOSANO

Centro Internazionale di Chimica Microbiologica

Riassunto. — Si è studiato lo sviluppo ponderale di trenta ifomiceti in rapporto alla concentrazione di ossigeno nell'atmosfera ambientale di colture sommerse agitate. Le specie esaminate appartengono ai generi *Mucor*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*, *Gloesporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Alternaria*, *Deightoniella*, *Fusarium*, *Epicoccum*. Le conclusioni che possono trarsi da questo studio sono :

a) che nel complesso i funghi inferiori mostrano capacità di accrescimento anche in concentrazioni minime di O_2 ;

b) che il rapporto (N/C) tra il peso secco raggiunto in carenza di O_2 e quello raggiunto nelle beute di controllo è maggiore in un terreno sintetico che in un terreno naturale più ricco ;

c) che *Mucor*, *Rhizopus*, *Cunninghamella* e *Aspergillus* mostrano valori N/C relativamente elevati, ciò che indica una maggiore adattabilità di questi miceti alla carenza di O_2 ;

d) che *Penicillium* e *Aspergillus* si comportano assai diversamente rispetto alla rarefazione di O_2 : per il primo si hanno valori N/C molto bassi, per il secondo invece il valore N/C si avvicina a quello dei Ficomiceti (*Mucor*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*), mostrando un certo grado di indipendenza dalla concentrazione di O_2 nel mezzo ambiente.

Summary. — The variation of ponderal development of thirty strains of *Hyphomycetes* was studied as a function of oxygen rarefaction, in shaken liquid culture. The species examined belong to the genera *Mucor*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*, *Gloesporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Alternaria*, *Deightoniella*, *Fusarium* and *Epicoccum*. The results of measurements of dry weight of washed mycelia after fermentation lead to the following conclusions :

a) in general lower fungi are able to grow even in minimal oxygen concentrations ;

b) the ratio (N/C) between the dry weight of mycelia grown in the absence of oxygen and that of mycelia grown in usual conditions is higher in a semisynthetic medium than in a natural rich one;

c) *Mucor*, *Rhizopus*, *Cunninghamella* and *Aspergillus* show rather high ratios which means a higher adaptability to oxygen deficiency;

d) *Penicillium* and *Aspergillus* behave differently, with respect to oxygen rarefaction: the former shows very low values of N/C while for the latter the ratio is similar to that of the *Phycomycetes* (*Mucor*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*), showing a certain independency from the oxygen concentration in the medium.

Scopo del presente lavoro era di studiare comparativamente l'effetto della rarefazione dell'ossigeno, sullo sviluppo ponderale di alcuni miceti, rappresentanti famiglie appartenenti alla Classe dei Ficomiceti e dei Deuteromiceti (Adelomiceti), sviluppati in cultura sommersa.

La germinazione e la crescita dei funghi in concentrazioni di ossigeno diverse da quella atmosferica sono state oggetto di numerosi studi e la opinione che i funghi siano microrganismi aerobi, è stata trovata fondamentalmente esatta.

Tuttavia si è spesso constatata una crescita di miceti in ambienti scarsamente provvisti di ossigeno, come ad esempio al fondo di recipienti pieni di liquido, o nel profondo della polpa dei frutti, nelle acque stagnanti o nel sottosuolo in presenza di alte percentuali di anidride carbonica e con pressione di ossigeno ridotta.

Già BROWN, nel 1922 (1), sperimentando l'effetto della concentrazione di ossigeno sulla germinazione di *Botrytis cinerea*, aveva trovato che atmosfere contenenti l'1 % di ossigeno davano luogo a germinazioni pari al 20 % delle spore presenti concludendo che l'effetto della concentrazione di ossigeno sulla germinazione è trascurabile entro ampi limiti.

Considerando la crescita fungina, lo stesso A., in esperienze condotte su *Sphaeropsis*, aveva mostrato che non esistono differenze tra lo sviluppo del fungo cresciuto in atmosfera con 8 % e col 20 % di ossigeno.

GOTTLIEB (2) nella sua rassegna bibliografica dei fattori che influenzano la germinazione delle spore dei miceti, ha riportato che in *Neurospora tetrasperma*, *Ustilago avenae*, *Cryptococcus hiemalis* e *Actinomyces scabies* le spore, poste a sviluppare in atmosfera di azoto non germinano, mentre le stesse trasferite in aria danno luogo ad una normale crescita.

LIN (3) ha trovato che *Sclerotinia fructicola* germina in anaerobiosi sebbene la percentuale di germinazione rispetto a quella osservata in aria sia

ridotta. Così come *Achlya prolifera*, secondo HEMMY e ABE (⁴), cresce moderatamente in assenza di ossigeno.

Tra i Ficomiceti acquatici *Blastocladia* cresce ugualmente bene in aria o in azoto con una pressione parziale di ossigeno pari a 0,7 mm Hg (⁵).

Alcune specie di *Penicillium* sono ritenute da GOLDING (⁶) e da WILLIAMS (⁷) semi-anaerobiche sebbene le osservazioni si riferiscano ad una crescita in atmosfera con pressione parziale di ossigeno non al disotto di 15 mm Hg.

Questi dati tuttavia mancano di valutazioni quantitative rispetto allo sviluppo di controllo in aria.

In un lavoro sulla germinazione in anaerobiosi di spore di *Mucoraceae* A. WOOD BAKER (⁸) ha notato che in *Mucor rouxii* e *Mucor ramannianus*, che sono dei buoni fermentatori, le spore germinano in alta percentuale anche in assenza totale di ossigeno (azoto assoluto purificato con pirogallolo) mentre *Mucor hiemalis*, *Phycomices blakeslanus* e *Rhizopus stoloniferum*, che sono deboli fermentatori, non danno luogo a germinazione al di sotto del 2 % di ossigeno.

J. S. WAID (⁹) infine, in un recente studio sulla influenza dell'ossigeno sulla crescita e respirazione di funghi isolati da radici di graminacee (spelta, segale) ha osservato, coltivando su terreno solido i funghi isolati dalle parti più esterne ed altri isolati dagli strati più interni, una differente tollerabilità alla rarefazione dell'ossigeno nel senso che i primi risentono maggiormente la limitazione di ossigeno sia nella crescita della colonia, sia nella produzione di spore che non quelli degli strati più interni. L'A. fa tuttavia alcune riserve sul metodo adottato nella valutazione della crescita delle colonie su agar.

Il presente lavoro, effettuato in colture sommerse e in due differenti terreni colturali, esamina la risposta di gruppi fungini, tra loro lontani sistematicamente, alle variazioni di concentrazioni d'ossigeno nell'atmosfera.

MATERIALI E METODI

Terreni colturali.

I ceppi sono stati coltivati in coltura sommersa su due terreni di cui il primo indicato con la lettera A era costituito da Czapek Dox addizionato dell'1 % di glucosio e del 0,4 % di Sib Brodo Base (COSTANTINO) (pH 5,5); il secondo indicato con B era costituito da *corn-steep* 3 g, saccarosio 4 g, KH_2PO_4 0,1 g, acqua distillata 100 ml (pH 4,5).

Beute agitate.

Beute da 500 ml a collo largo erano riempite con 50 ml del terreno colturale. Tali beute erano poste su agitatore rotatorio e termostate a 30° C.

Le beute di controllo erano normalmente tappate con cotone, quelle con flusso di gas erano chiuse con tappi di gomma a due fori attraversati da tubicini di vetro, attraverso cui passava il flusso di gas.

Le beute in duplice replica erano collegate tra loro in serie e in esse veniva erogato un flusso di gas, assai vivace nelle prime ore, poi stabilizzate sui 500-600 ml/h circa.

Gas.

Le miscele azoto-ossigeno nelle proporzioni del 10 %, 5 %, 2 % di ossigeno, erano erogate da bombole fornite dalla Ditta Caracciolo; l'azoto indicato come N_2 era quello commerciale che contiene tracce di ossigeno non superiori allo 0,8-1,3 %.

In alcune esperienze è stato adoperato un flusso di azoto puro. Questo era ottenuto facendo gorgogliare il gas commerciale in tre torrette di lavaggio contenenti pirogallolo. L'assenza di tracce di ossigeno veniva controllata, in uscita, da una quarta torretta contenente una soluzione di blu di metilene decolorata, la quale, durante i giorni di fermentazione, doveva mantenersi incolore.

Ceppi.

I trenta ceppi saggiati, appartenenti a 13 generi, fanno parte delle seguenti famiglie:

Mucorales (*Mucor*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*);

Melanconiaceae (*Gloeosporium*);

Moniliaeae (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*);

Dematiaceae (*Alternaria*, *Deightonella*);

Tuberculariaceae (*Fusarium*, *Epicoccum*).

Valutazione dello sviluppo.

Il contenuto delle beute, dopo 72 ore di fermentazione, veniva filtrato per Buchner su carta tranee che per *Cephalosporium* e *Fusarium* che erano filtrati su cartoncino.

Il micelio lavato era essiccato a 100° per 24 ore indi pesato. Il peso secco dei miceli è espresso in grammi per 100 ml di brodo culturale.

RISULTATI

Dopo le prime esperienze si è accertato che tutti i ceppi si sviluppavano bene nei due terreni nutritivi impiegati, in beute agitate e con flusso di gas contenente O_2 nella proporzione del 10 %, 5 % e perfino del 2 %. Tale ridu-

Sviluppo miceliare nei terreni A e B ottenuto in beute agitate
con flusso di O₂ ed N₂ (*) e in beute di controllo

Pesi secchi espressi in g per 100 ml di terreni colturali.

	Flusso di O ₂		Controlli (C)		Flusso di N ₂ (N)		R = $\frac{N}{C}$	
	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>Mucor</i> sp F. 54	—	—	0,216	1,426	0,092	0,417	0,42	0,29
<i>Mucor</i> sp F. 54	—	—	0,192	1,576	0,078	0,405	0,40	0,26
<i>Mucor roseus</i> F. 101	—	—	0,147	0,903	0,033	0,119	0,23	0,13
<i>Mucor roseus</i> F. 101	—	—	0,164	0,951	0,042	0,121	0,26	0,13
<i>Rhizopus nigricans</i> F. 477	—	—	0,329	0,954	0,089	0,160	0,27	0,16
<i>Rhizopus nigricans</i> F. 477	0,584	1,404	0,476	1,273	0,135	0,294	0,28	0,23
<i>Cunninghamella elegans</i> F. 454	—	—	0,727	0,962	0,304	0,212	0,42	0,22
<i>Cunninghamella elegans</i> F. 454	—	—	0,397	1,426	0,160	0,244	0,40	0,17
<i>Cunninghamella</i> sp F. 457	—	—	0,183	1,076	0,085	0,179	0,46	0,17
<i>Aspergillus flavus</i> F. 420	0,560	—	0,525	1,353	0,179	0,206	0,34	0,15
<i>Aspergillus terreus</i> F. 165	0,270	—	0,251	1,485	0,092	0,173	0,37	0,12
<i>Aspergillus alliaceus</i> F. 36	0,558	—	0,546	1,649	0,217	0,399	0,39	0,24
<i>Aspergillus niger</i> F. 250	0,520	—	0,560	1,589	0,235	0,440	0,42	0,28
<i>Aspergillus niger</i> F. 250	0,354	—	1,048	1,752	0,296	0,322	0,28	0,18
<i>Aspergillus</i> sp. F. 674	0,455	—	0,480	1,393	0,188	0,225	0,39	0,16
<i>Penicillium commune</i> F. 14	—	—	0,493	0,759	0,074	0,033	0,14	0,04
<i>Penicillium commune</i> F. 14	0,610	—	0,608	1,497	0,136	0,025	0,21	0,02
<i>Penicillium citrinum</i> F. 212	0,533	—	0,411	1,011	0,071	0,020	0,17	0,02
<i>Penicillium chrysogenum</i> PF15	0,525	0,864	0,602	1,074	0,108	0,046	0,18	0,04
<i>Penicillium chrysogenum</i> PF15	0,575	0,830	0,614	1,077	0,081	0,043	0,13	0,04
<i>Penicillium</i> sp. F 668	—	0,860	0,642	0,895	0,080	0,030	0,12	0,03
<i>Penicillium</i> sp. F. 669	0,433	1,045	0,385	1,151	0,107	0,126	0,28	0,11
<i>Botrytis cinerea</i> F. 468	0,637	1,331	0,663	1,546	0,171	0,168	0,26	0,11
<i>Botrytis cinerea</i> F. 475	0,393	0,882	0,328	1,193	0,088	0,017	0,27	0,01
<i>Botrytis cinerea</i> F. 475	—	0,947	—	1,001	—	0,015	—	0,01

(*) Azoto commerciale, con tracce di ossigeno non superiori allo 0,8-1,3 %.

Segue : TABELLA 1

	Flusso di O ₂		Controlli (C)		Flusso di N ₂ (N)		R = $\frac{N}{C}$	
	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>Trichoderma lignorum</i> F. 540	0,128	0,907	0,118	1,165	0,038	0,139	0,32	0,12
<i>Trichoderma lignorum</i> F. 540	—	0,965	—	1,139	—	0,099	—	0,09
<i>Trichoderma</i> sp. F. 311	0,499	1,481	0,487	1,444	0,138	0,138	0,28	0,09
<i>Trichoderma</i> sp. F. 311	—	—	—	1,974	—	0,134	—	0,07
<i>Cephalosporium</i> sp. F. 471	0,320	0,378	0,478	1,202	0,077	0,098	0,16	0,08
<i>Cephalosporium</i> sp. F. 280	0,550	1,154	0,605	1,943	0,068	0,074	0,11	0,04
<i>Cephalosporium</i> sp. F. 280	—	—	—	0,966	—	0,017	—	0,02
<i>Cephalosporium acremonium</i>								
F. 318	0,433	0,454	0,394	1,159	0,104	0,013	0,26	0,01
» » F. 318	0,257	1,703	0,458	1,861	0,107	0,110	0,23	0,06
» » F. 318	0,358	1,686	0,384	1,746	0,103	0,062	0,27	0,03
<i>Deightoniella torulosa</i> F. 482	0,230	0,342	0,270	0,562	0,075	0,077	0,27	0,13
» » F. 481	0,121	0,361	0,673	1,173	0,156	0,165	0,23	0,14
» » F. 482	0,280	0,654	0,302	0,609	0,081	0,084	0,27	0,14
» » F. 482	—	0,674	—	0,937	—	0,140	—	0,15
<i>Alternaria tenuis</i> F. 297	0,417	1,176	0,470	1,122	0,120	0,092	0,25	0,08
» » F. 115	—	0,522	—	0,777	—	0,022	—	0,03
» » F. 115	—	0,924	—	1,045	—	0,618	—	0,02
<i>Gloeosporium musarum</i> F. 478	0,304	—	0,294	0,795	0,107	0,120	0,36	0,15
» » F. 478	0,627	1,119	0,513	0,952	0,162	0,215	0,31	0,22
» » F. 479	0,434	1,711	0,459	1,590	0,150	0,270	0,33	0,17
<i>Fusarium</i> sp. F. 474	0,442	0,634	0,529	0,738	0,081	0,142	0,15	0,19
» » F. 474	0,274	1,018	0,337	1,168	0,158	0,226	0,47	0,19
» » F. 474	0,628	1,162	0,650	1,302	0,224	0,342	0,34	0,26
<i>Epicoecum</i> sp. 665	0,662	1,558	1,078	1,995	0,143	0,143	0,13	0,07

zione della pressione parziale dell'O₂ nell'atmosfera di sviluppo di questi ifomiceti non comportava una proporzionale riduzione della crescita quantitative delle colonie fungine.

Si è passati allora ad esaminare le condizioni limiti, cioè la crescita miceliare in flusso di N assoluto; il gas commerciale impiegato, conteneva tracce di O₂ nella misura da 0,8 a 1,3 %.

Lo sviluppo miceliare è stato valutato quantitativamente ed espresso in grammi di peso secco per 100 ml di terreno colturale dopo 72h di fermentazione in beute agitate.

I risultati sono esposti nella tabella 1.

In essa, nella prima colonna, sono riportati i valori ponderali dei miceli sviluppati in flusso di O₂; nella seconda colonna quelli dei controlli in aria, nella terza quelli in flusso di N₂. Ogni colonna è suddivisa in due distinte con A e B che rappresentano i due terreni colturali impiegati.

In tabella non appaiono i dati relativi alla crescita miceliare in atmosfera di N purificato con pirogallolo poichè questa è risultata scarsissima ed irrilevante, sebbene si possa affermare che persino nella condizione di totale assenza di O₂ è stata constatata la germinazione di spore e un minimo accrescimento miceliare.

Sul lato destro della tabella 1 è riportato il valore $\frac{N}{C}$ esprimente il rapporto tra il peso secco miceliare in beute con flusso di N ed il peso secco in beute controllo. Tale rapporto si ricava dai relativi valori tabulati e rappresenta il peso secco miceliare in N riferito al controllo fatto uguale a 100.

DISCUSSIONE

Dall'esame dei dati riportati nella tabella 1 si rileva:

a) Lo sviluppo miceliare nel terreno completo B e quindi il peso secco, è assai maggiore che non nel terreno sintetico A segnatamente per i controlli, mentre per lo sviluppo in flusso di N₂ tale differenza risulta attenuata.

Il rapporto $\frac{N}{C} \left(\frac{\text{peso secco in flusso di N}_2}{\text{peso secco nel controllo}} \right)$ varia dunque col mezzo colturale e risulta superiore in terreno A. Ciò sta ad indicare che per lo sviluppo miceliare in atmosfera di N₂ il valore percentuale (fatto il controllo uguale a 100) del peso secco miceliare nel terreno A è sempre maggiore che in B. Nel terreno A dunque l'effetto limitante della carenza di O₂ si risente di meno.

b) Nei gruppi fungini esaminati, si nota un maggior adattamento alla carenza di O₂ tra le *Mucorales* (*Mucor*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*).

Attenendoci alla osservazione delle crescite nel terreno B, si vede che il peso secco in flusso di N_2 è relativamente alto (120-417 mg per 100 ml) in questo gruppo di miceti, mentre per gli altri gruppi esclusi *Aspergillus*, *Gloeosporium* e *Fusarium* i valori si aggirano tra 13 e 170 mg per 100 ml.

Gli *Aspergillus*, per quanto concerne i ceppi qui sperimentati, si avvicinano molto alle *Mucorales* sotto l'aspetto della adattabilità alla rarefazione di O_2 .

In questa condizione infatti i pesi secchi registrati sono simili a quelli di *Mucor*, *Rhizopus* e *Cunninghamella*.

Anche *Gloeosporium* e *Fusarium* si discostano dal comportamento degli altri Deuteromiceti.

Notevolissima la differenza di comportamento tra gli *Aspergillus* ed i *Penicillium*. Questi ultimi richiedono condizioni ottimali per il loro sviluppo ed hanno crescita minima in condizioni critiche (rarefazione di O_2).

Il rapporto $\frac{N}{C}$ in ambedue i terreni e soprattutto nel terreno B è molto più basso di quel che si riscontra nel gruppo degli *Aspergillus*, ciò indica la scarsa adattabilità del *Penicillium* alla rarefazione dell' O_2 .

L'autore desidera esprimere la sua riconoscenza al Prof. E. B. CHAIN, F.R.S., per aver suggerito e seguito con interesse il presente lavoro e ringraziare i Sigg. G. MOCHI e G. OBERHOLTZER per l'efficiente assistenza tecnica svolta.

11 aprile 1964.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BROWN W. - Ann. Botan. 36, 257 (1922).
- (2) GOTTLIEB D. - Botan. Rev. 16, 229 (1950).
- (3) LIN C. K. - Cornell Univ. Agr. Exptl. Sta. Mem., 233, 1 (1940).
- (4) HEMMY T. e ABE T. - Japan J. Botan. 4, 113 (1928).
- (5) EMERSON R. e CANTINO E. C. - Am. J. Botan. 35, 157 (1948).
- (6) GOLDING N. S. - J. Dairy Sci. 23, 891 (1940).
- (7) WILLIAMS C. et al. - Food Res. VI, 1, 69 (1941).
- (8) WOOD BAKER A. - Trans. Brit. Myc. Soc. 38, (3), 291 (1955).
- (9) WAID J. S. - Trans. Brit. Myc. Soc. 45, (4), 479 (1962).

Impiego di colture di tessuti *in vitro* per lo studio dei sistemi enzimatici

I - Perossidasi nella radice e nel mezzo di coltura di piantine di *Pisum sativum*

MARIA A. CIASCA e M. ANNA LUCHETTI (*)

Laboratori di Chimica biologica

Riassunto. — È stata studiata la liberazione di perossidasi nel mezzo di coltura da parte di piante di *Pisum sativum* coltivate *in vitro*.

La quantità di perossidasi presente nel mezzo aumenta col crescere dell'età della pianta.

Summary. — The release of peroxidase from *Pisum sativum* plants cultured *in vitro* was studied.

The amount of peroxidase in the medium increases with the growing of plants.

La coltura dei tessuti vegetali *in vitro*, realizzata soprattutto per merito di GAUTHERET, oltre che un interesse biologico e fisiologico offre un nuovo strumento all'indagine biochimica per lo studio dei sistemi enzimatici, sia che si determinino in funzione dei vari stadi di sviluppo della pianta, sia che si studino sotto l'influenza di alcuni fattori chimici o fisici capaci di modificare le condizioni della coltura ed il metabolismo della pianta.

In questa prima nota di una serie di ricerche volte a mettere in evidenza le possibilità di questa tecnica, abbiamo studiato le perossidasi nel *Pisum sativum* soprattutto cercando di vedere se vi fosse diffusione dell'enzima nel mezzo di coltura.

Questo fatto può essere di estremo interesse anche nell'interpretazione dei processi di formazione dell'humus.

In un precedente lavoro, volto a studiare la possibilità di produrre alcaloide dello *Skytanthus* da tessuti *in vitro*, si era potuto osservare ⁽¹⁾ un passaggio dell'alcaloide nel terreno di coltura.

(*) Borsista dei Laboratori di Chimica biologica.

Questo passaggio di una sostanza chimica dalla pianta al mezzo di coltura, trova un suo precedente nelle osservazioni di BRAKKE e NICKELL (2-3) che riuscirono a mettere in evidenza per la prima volta la presenza di un enzima, l' α -amilasi, nel terreno di coltura di tessuti tumorali di *Rumex acetosa*.

Sebbene gli studi di liberazione di enzimi nel mezzo colturale siano stati effettuati soprattutto su colture di tessuti anormali, per esempio su colture di tessuti derivati da « crown gall » (4), ed anche se i suddetti BRAKKE e NICKELL (3) non riuscirono a mettere in evidenza una secrezione di α -amilasi in colture di radici normali di *Rumex*, la liberazione di enzimi nel mezzo colturale non è una caratteristica del tessuto malato, in quanto anche in mezzi di coltura di tessuti sani di piante superiori STRAUS e CAMPBELL (5) dimostrarono la presenza di vari enzimi.

Date le molte ipotesi sul meccanismo del passaggio dell'enzima nel mezzo e le osservazioni di GAUTHERET al lavoro citato di BRAKKE e NICKELL (3) circa la possibilità che l'enzima passi nel mezzo per stiramento e rottura di cellule durante l'accrescimento, ci è sembrato interessante seguire la liberazione di un enzima nel mezzo di coltura da parte di una pianta intera e non di un tessuto isolato.

In questa ricerca si è scelto il *Pisum sativum* var. verdone nano particolarmente adatto per il suo rapido sviluppo e si è dosata la perossidasi sia nell'estratto di radice totale che nel mezzo di coltura, a vari tempi.

PARTE SPERIMENTALE

Semi di *Pisum sativum* var. verdone nano sono stati fatti germinare in capsule sterili su cotone umido. Le plantule sono state fatte crescere, sempre in condizioni sterili, in un terreno liquido contenente la soluzione di sali di Heller + 2 % di glucosio, in una stanza termostata a 26° C e illuminata per 18 ore al giorno. A vari tempi la pianta è stata estratta dal mezzo e la radice totale asciugata, pesata e omogenata in tampone fosfato 0,5 M a pH 6, in ragione di 1 ml di tampone per 100 mg. di radice.

L'omogenato è tenuto a 4° C per una notte, centrifugato, separato il supernatante ed il residuo estratto ancora una volta con egual volume di tampone. Nuovamente si centrifuga ed il nuovo estratto si unisce al precedente.

0,1 ml della miscela è usato per l'analisi della perossidasi secondo il metodo di SUMNER e GJESSIG (6) e cioè aggiunto ad una miscela formata da : 15 ml di acqua distillata + 2 ml di tampone fosfato a pH 6 + 2 ml di pirogallolo al 5 % preparato di fresco + 1 ml di acqua ossigenata all'1 %, il tutto già equilibrato a 22° C in bagno maria.

Dopo 5' la reazione è arrestata dall'aggiunta di 2 ml di acido solforico 2 N. Ogni campione viene poi estratto con 25 ml di etere etilico e la densità

ottica dell'estratto etereo viene letta a 425 $m\mu$ e confrontata con una curva costruita con varie quantità di purpurogallina. Tale purpurogallina, che si forma dal pirogallolo per azione della perossidasi e dell'acqua ossigenata, è stata ottenuta portando a secco l'estratto etereo e cristallizzando il residuo fino a p. f. 270° C.

Per l'analisi dei mezzi di coltura si usano 15 ml del mezzo stesso.

Tutti i valori sono espressi in milligrammi di purpurogallina formatasi e sono riportati a 100 mg di radice sia per gli estratti che per i mezzi.

Età pianta (in giorni)	Perossidasi in 100 mg di radice	Perossidasi nel mezzo corrispondente a 100 mg di radice	Perossidasi nel mezzo come % di quella del tessuto
3	9,8	0,00	—
6	34,6	0,28	0,80
8	32,0	0,39	1,21
10	36,3	0,46	1,27
15	38,4	0,60	1,56
30	49,0	1,40	2,80

ogni valore è la media di tre determinazioni.

Dai dati della tabella risulta evidente il passaggio di perossidasi dalle radici normali di *Pisum sativum* nel mezzo di coltura.

Non è possibile dire per ora quale sia il meccanismo che regola questo passaggio. C'è da osservare che il contenuto di perossidasi aumenta con l'età delle cellule. È interessante osservare che la perossidasi è legata al metabolismo cellulare e varia con l'età a seconda delle piante esaminate.

28 aprile 1964

BIBLIOGRAFIA

- (1) LUCHETTI A., MARINI-BETTÒLO G. B., e CASINOVI C. G., in corso di stampa.
- (2) BRAKKE M. K. e NICKELL L. G. - Arch. Bioch. Biophys. 32, 28 (1951).
- (3) BRAKKE M. K. e NICKELL L. G. - Ann. Biol. 31, 215 (1955).
- (4) WITHAM F. H. e GENTILE A. C. - J. Exptl. Bot. 12, 188 (1960).
- (5) STRAUS J. e CAMPBELL W. A. - Life Sci. 1, 50 (1963).
- (6) SUMNER J. B. e GJESSIG E. C. - Arch. Biochem. 2, 291 (1943).

Reazione di Clibbens-Nierenstein sull'1,4-benzodiossan-2-carbossicloruro. Reattività al diazometano del 2-cloroacetil-1,4-benzodiossano (*)

DOMENICO MISITI, FRANCO DE MARCHI (**) e VITTORIO ROSNATI

Laboratori di Chimica terapeutica

Riassunto. — Nella preparazione del 2-cloroacetil-1,4-benzodiossano dall'1,4-benzodiossan-2-carbossicloruro e diazometano in eccesso secondo la reazione di Clibbens-Nierenstein, è stato isolato come prodotto secondario il 2-idrossi-2-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,3-dicloropropano. Si è dimostrato che questa cloridrina deriva dall'azione dell'acido cloridrico sull'1-clorometil-1-(1,4-benzodiossan-2-il)-etilenossido formatosi intermediariamente per azione del diazometano sul 2-cloroacetil-1,4-benzodiossano.

La eccezionale reattività di questo α -clorochetone è stata dimostrata da uno studio preliminare sulla cinetica della sua reazione con diazometano.

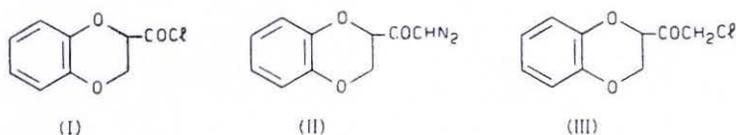
Summary. — 2-Hydroxy-2(1,4-benzodioxan-2-yl)-1,3-dichloropropane has been isolated as a by-product in the course of preparation of 2-chloroacetyl-1,4-benzodioxane from 1,4-benzodioxane-2-carboxychloride and an excess of diazomethane, according to the Clibbens-Nierenstein's reaction. It has been shown that this chlorohydrin is formed by ring opening with hydrochloric acid of the 1-chloromethyl-1-(1,4-benzodioxan-2-yl)-ethylenoxide, resulting intermediately from the reaction of diazomethane on 2-chloroacetyl-1,4-benzodioxane. The remarkable reactivity of this α -chloroketone towards diazomethane has been proved by a preliminary study of the kinetics of this reaction.

Il 2-cloroacetil-1,4-benzodiossano (III) è stato preparato secondo la reazione di Clibbens-Nierenstein facendo reagire l'1,4-benzodiossan-2-carbossicloruro (I) con una soluzione eterea di diazometano e trattando suc-

(*) Questo lavoro è apparso in *Gazz. Chim. Ital.*, 93, 1046 (1963).

(**) Borsista dei Laboratori di Chimica terapeutica.

cessivamente la miscela di reazione con acido cloridrico secco, senza isolare il 2-diazoacetil-1,4-benzodiossano (II) formatosi intermediariamente (1).



Recentemente è stato da noi osservato che, quando questa reazione è stata condotta in presenza di un eccesso di diazometano, accanto al clorochetone (III), si formava invariabilmente il 12-13 % di una sostanza cristallina $C_{11}H_{12}Cl_2O_3$.

Lo spettro infrarosso di questa sostanza (vedi fig. 1) non mostrava alcuna banda di assorbimento nella regione del carbonile, mentre l'intensa

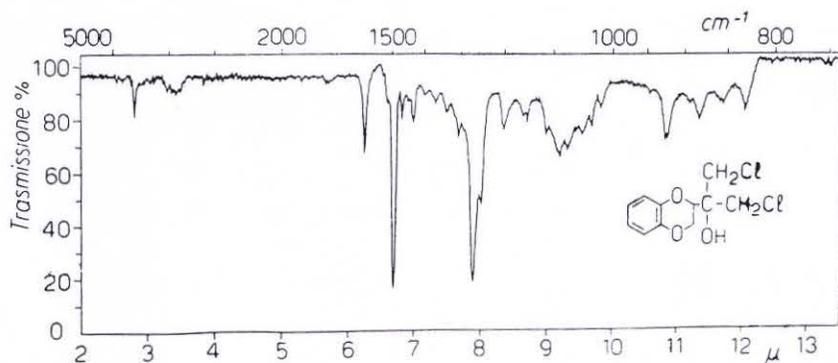


Fig. 1. - Spettro I.R. in CCl_4 .

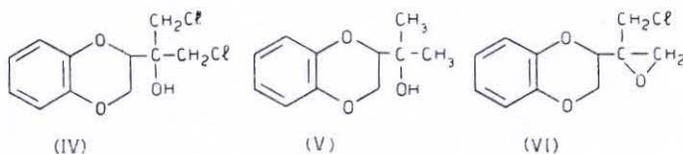
banda a 3571 cm^{-1} indicava chiaramente la presenza di un ossidile alcolico.

Lo spettro di risonanza magnetica nucleare della sostanza $C_{11}H_{12}Cl_2O_3$ (vedi fig. 2) risultava di non facile interpretazione per la sua complessità nella zona compresa tra 3,7 e 4,5 p.p.m.; esso consentiva di trarre informazioni immediate soltanto per quello che riguardava i segnali a 6,8 e a 2,58 p.p.m., sicuramente attribuibili rispettivamente a quattro protoni aromatici e ad un protone di un ossidile alcolico (2).

La struttura di 2-idrossi-2-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,3-dicloropropano (IV) fu subito proposta per la sostanza $C_{11}H_{12}Cl_2O_3$.

Sulla base della struttura (IV), la molteplicità dei segnali nella zona tra 3,7 e 4,5 p.p.m. dello spettro RMN avrebbe potuto essere spiegata con gli accoppiamenti degli spin derivanti dalla non equivalenza: a) dei due

protoni del metilene incorporato nel sistema benzodiossano-2-sostituito;
b) dei quattro protoni dei gruppi gem-clorometilici.



Per verificare in maniera indiretta questa ipotesi, è stato sintetizzato il 2-idrossi-2-(1,4-benzodiossano-2-il)-propano (v), che, per lo studio degli spettri R.M.N., rappresenta un modello semplificato della struttura (iv).

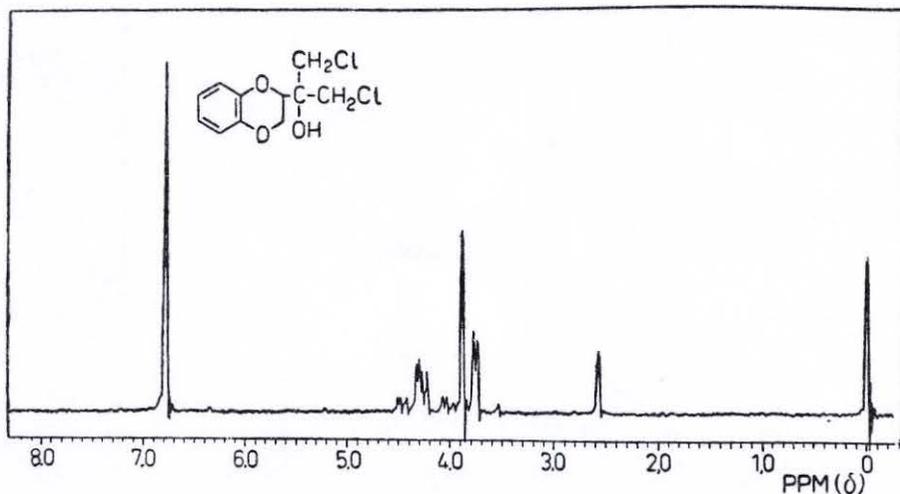


Fig. 2. - Spettro R.M.N. in CCl_4

In accordo con l'ipotesi sopra esposta, lo spettro R.M.N. del carbinolo (v) (vedi fig. 3) rivelò chiaramente che in questa struttura non sono equivalenti tra loro sia i due gruppi gem-metilici che i due protoni del gruppo metilenico presente nel sistema benzodiossano. Infatti i due segnali a 1,26 e 1,31 p.p.m. sono sicuramente attribuibili ai due gruppi metilici, mentre nella zona dello spettro tra 3,7 e 4,6 p.p.m. sono presenti otto segnali attribuibili ad un sistema ABC (*).

(*) La non equivalenza dei gruppi metilici nello spettro R.M.N. del carbinolo (V) è verosimilmente attribuibile ad una rotazione parzialmente impedita del gruppo $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$ intorno al legame tra il carbonio quaternario e il carbonio in posizione 2 sull'anello etilendiossani. Due ragioni potevano essere teoricamente invocate per spiegare questa rotazione non interamente libera: l'esistenza di legami di idro-

Da un punto di vista strettamente chimico, la struttura (IV) fu considerata assai probabile per la sostanza $C_{11}H_{12}Cl_2O_3$, essendo in accordo con un verosimile meccanismo di formazione. Tale sostanza, infatti avrebbe potuto essersi facilmente formata dall'eossido (VI) per apertura dell'anello epossidico da parte dell'acido cloridrico.

Questo meccanismo di formazione comportava l'ipotesi che l'eossido (VI) si fosse preformato per azione del diazometano sul clorochetone (III)

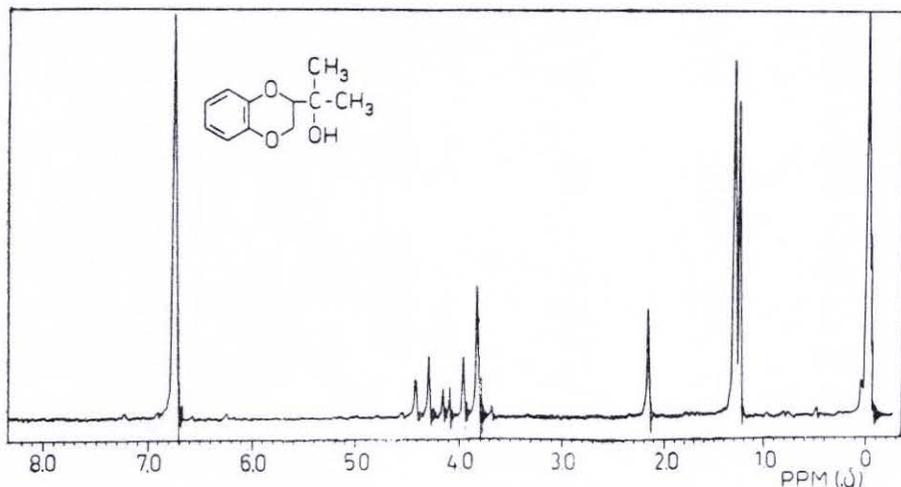


Fig. 3. - Spettro R.M.N. in CCl_4

e che quest'ultimo possedesse quindi una grande reattività nei riguardi del diazometano.

Quest'ultima ipotesi fu immediatamente confermata da uno studio preliminare sulla cinetica della reazione tra diazometano ed il 2-cloro-acetil-1,4-benzodiossano (III).

L'andamento di questa reazione fu seguito per mezzo degli spettri nell'infrarosso misurando nel tempo la variazione del rapporto tra l'inten-

geno intramolecolari tra l'ossidrilico alcolico ed uno degli ossigeni dell'anello, oppure l'esistenza di un vero e proprio impedimento sterico.

Gli spettri I.R. di (V) non consentono di confermare l'esistenza di legami di idrogeno intramolecolari, in quanto la frequenza della banda OH si trova esattamente al limite fra la zona in cui, cadono generalmente le frequenze dovute agli ossidrili liberi e quelle dovute agli ossidrili legati con deboli legami idrogeno ⁽³⁾.

La possibilità teorica di tali legami tra l'ossidrilico alcolico e l'ossigeno in posizione 1, non è d'altra parte esclusa dalla costruzione dei modelli molecolari per le strutture (IV) e (V). Questi modelli, d'altra parte, mettono in evidenza per entrambe le strutture un vero e proprio impedimento sterico che limita la libera rotazione del gruppo sostituito intorno al legame in posizione 2. Tale impedimento risulta naturalmente maggiore nel modello molecolare della cloridrina (IV).

sità della banda carbonilica a 1742 cm^{-1} e l'intensità della banda a 1592 cm^{-1} presa come riferimento (*). Le determinazioni spettrofotometriche (vedi spettri parziali riportati nella fig. 4) indicarono che questa reazione procede abbastanza velocemente anche in soluzione eterea: infatti dopo mezz'ora già un terzo del clorochetone ha reagito e la reazione diviene molto meno

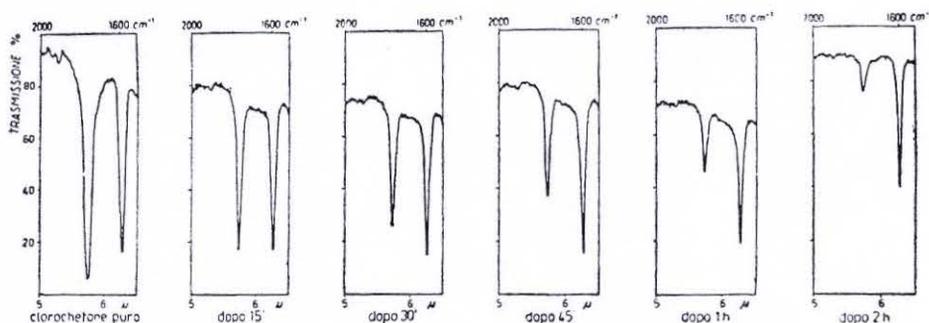


Fig. 4. - Reazione tra diazometano e 2-cloroacetil-1,4-benzodiossano (III). Spettri I.R. parziali in velo liquido: variazione nel tempo della intensità della banda carbonilica (1742 cm^{-1}), rispetto alla banda di riferimento (1592 cm^{-1}).

veloce solo dopo due ore, quando è presente circa il 20 % del clorochetone di partenza. Quando la reazione venne condotta in presenza di metanolo, essa risultò praticamente istantanea, infatti, dopo cinque minuti già il 95 % del clorochetone di partenza risultava trasformato (**).

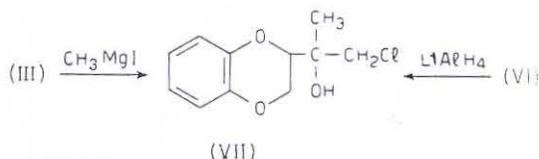
(*) La banda a 1592 cm^{-1} è una delle bande dovute alle vibrazioni di « stretching » del sistema $>C=C<$ nell'anello benzenico dell'1,4-benzodiossano. Essa fu scelta come banda di riferimento perchè la sua intensità è dello stesso ordine di quella della banda carbonilica del chetone di partenza. Più rigorosamente la velocità di scomparsa del clorochetone avrebbe dovuto essere determinata dal confronto fra le aree relative alla banda carbonilica negli spettri I.R. registrati in soluzione in tempi diversi. Per ragioni pratiche, gli spettri I.R. sono stati da noi registrati in velo liquido, per cui le aree in questione risultarono meno facilmente definibili. Il metodo qui adottato (confronto nel tempo del rapporto fra l'altezza della banda carbonilica e quella della banda di riferimento) si è rivelato sufficientemente esatto per valutare in prima approssimazione l'andamento della reazione. Lo scarto tra le percentuali di clorochetone presente calcolate in questo modo e le percentuali dedotte sperimentalmente è risultato al massimo del $\pm 3\%$.

(**) Non sono noti per altri α -clorochetoni dati bibliografici che consentano un confronto tra le relative velocità di reazione con diazometano. Per dare un'idea della eccezionale reattività del 2-cloroacetil-1,4-benzodiossano, si possono qui riportare alcuni dati da noi ottenuti con l' α -cloroacetofenone. La sua velocità di reazione con diazometano in soluzione eterea è praticamente nulla. Operando in soluzione eterea metanolica, dopo un quarto d'ora soltanto l'11% di clorochetone risulta trasformato; dopo due ore il 48% e l'89% dopo 12 ore (7).

L'elaborazione delle miscele di reazione permise poi di isolare in ogni caso, come unico prodotto della reazione, una sostanza $C_{11}H_{11}ClO_3$ a cui, in base alle proprietà chimiche e spettroscopiche, fu assegnata la struttura di 1-clorometil-1-(1,4-benzodiossan-2-il)-etilenossido (VI).

Per azione dell'acido cloridrico gassoso su una soluzione eterea di questo epossido fu poi ottenuta con resa quantitativa una sostanza $C_{11}H_{12}Cl_2O_3$ identica sotto tutti gli aspetti a quella precedentemente isolata.

L'assegnazione delle strutture (IV) e (VI) fu definitivamente confermata dal fatto che una identica cloridrina, il 2-idrossi-2-(1,4-benzodiossan-2-il)-3-cloropropano (VII), fu ottenuta sia dal clorochetone (III) (per reazione con lo ioduro di metilmagnesio), che dall'eossido (VI) (per riduzione con idruro di litio e alluminio).



Stabilita la struttura della sostanza $C_{11}H_{12}Cl_2O_3$ e confermata sperimentalmente l'ipotesi che il suo precursore poteva essere l'eossido (VI), restava da spiegare la formazione di quest'ultimo nel corso della reazione tra un eccesso di diazometano ed il cloruro acido (I).

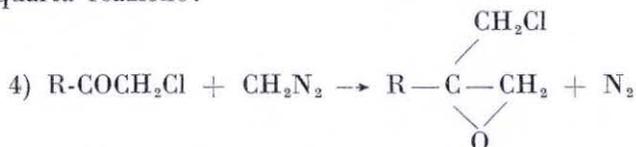
È noto che, quando un cloruro acido viene fatto reagire con diazometano, tre diverse reazioni possono aver luogo contemporaneamente (4, 5):

- 1) $R-COCl + CH_2N_2 \rightarrow R-COCHN_2 + HCl$
- 2) $HCl + CH_2N_2 \rightarrow CH_3Cl + N_2$
- 3) $HCl + R-COCHN_2 \rightarrow R-COCH_2Cl + N_2$

Tuttavia, allorchè si opera in presenza di un forte eccesso di diazometano, il contributo della reazione 3) è in generale trascurabile, perchè il diazometano in eccesso reagisce istantaneamente con l'acido cloridrico, consumandolo all'atto stesso della sua formazione (6).

A questo riguardo, è chiaro che la reazione tra diazometano ed il cloruro acido (I) costituisce un caso singolare per due motivi interdipendenti: a) perchè, come è chiaramente dimostrato dalla formazione della sostanza $C_{11}H_{12}Cl_2O_3$, in questo caso il contributo della reazione 3) è tutt'altro che trascurabile (12-13 %), quand'anche si operi in presenza di un forte eccesso di diazometano; b) perchè, a causa della grande reattività del clorochetone

(III), il bilancio globale della reazione deve, in questo caso, tener conto anche di una quarta reazione:



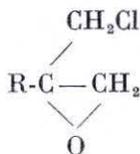
L'eccezionale contributo della reazione 3) è in realtà una misura indiretta della reattività del 2-diazoacetil-1,4-benzodiossano (II). Le reazioni 3) e 4) rappresentano schematicamente il meccanismo di formazione dell'eossido (VI).

Dall'esame delle quattro reazioni concorrenti si può però dedurre che la reazione 3), l'unica che sia indipendente dalla concentrazione del diazometano, costituisce in realtà il passaggio che determina la velocità di formazione dell'eossido (VI). È stato infatti dimostrato che la cloridrina (VI) si forma sempre in quantità costanti (12-13 %), qualunque sia l'eccesso di diazometano presente.

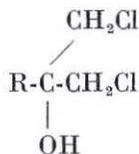
Per quello che riguarda la formazione della sostanza $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{O}_3$ appare estremamente improbabile che essa possa essersi formata per reazione tra l'eossido (VI) e l'acido cloridrico derivante dalla reazione 1); non è infatti verosimile l'ipotesi che l'eossido (VI) possa competere con il diazometano o il diazochetone (II) nella reazione con acido cloridrico. Questa esclusione porta a concludere che la cloridrina (IV) non può essersi formata nel corso della reazione tra diazometano ed il cloruro acido (I), ma soltanto durante il successivo trattamento con acido cloridrico della soluzione eterea contenente l'eossido (VI).

Sulla base di queste considerazioni risulta interamente chiarita la formazione dell'eossido (VI) nel corso della reazione tra diazometano ed il cloruro acido (I).

La formazione di un eossido per azione del diazometano su di un α -clorochetone non è di per sè un fatto eccezionale, essendo stata più volte descritta (7). A nostra conoscenza, tuttavia, non esiste in letteratura un solo esempio di un eossido ottenuto come prodotto secondario nella reazione tra diazometano ed un cloruro acilico, e nemmeno di una cloridrina isolata nella preparazione di un α -clorochetone secondo NIERENSTEIN (8), ARNDT (4) e collaboratori.



(VIII)



(IX)

Si può perciò formulare l'ipotesi che la eccezionale reattività del 2-cloroacetil-1,4-benzodiossano sia da mettersi in relazione con la presenza del radicale 1,4-benzodiossan-2-ile in posizione α alla funzione carbonilica.

Sfortunatamente, non esistono in letteratura dati precisi da cui si possano dedurre le velocità di reazione tra diazometano ed i vari α -clorochetoni; la maggior parte degli autori si è infatti limitata a descrivere i prodotti e le rese ottenute dopo aver lasciato a sè i reagenti per molte ore, o addirittura per molto giorni.

La verifica dell'ipotesi sopra enunciata costituirà l'oggetto di una prossima nota.

PARTE SPERIMENTALE (*)

Reazione tra diazometano e cloruro dell'acido 1,4-benzodiossan-2-carbossilico (1). — a) Una soluzione di g 66 (0,33 moli) di cloruro acido (I) (9) in 250 cm³ di etere assoluto è aggiunta lentamente, sotto agitazione e raffreddando a 0°, a 950 cm³ di una soluzione eterea di diazometano 0,58 M (0,56 moli). Terminata l'aggiunta si lascia a sè per 6 ore, dopo di che si tratta con una lenta corrente di HCl gassoso secco per 3 ore. Si degasa la soluzione eterea a pressione ridotta e si lava con una soluzione di K₂CO₃ al 20 % fino a neutralità, poi con acqua ed infine si secca su CaCl₂. Eliminato il solvente, si distilla nel vuoto il residuo oleoso. Si ottiene un'unica frazione (p. eb. 115-118° a 0,05 mm; g 68) costituita dal clorochetone (III), liquido vischioso che cristallizza rapidamente. I cristalli vengono ripresi con una miscela di esanobenzolo (10:1), filtrati ed asciugati: si ottengono g 64 (90 %) di prodotto con p.f. 69-70°. Una cromatografia su strato sottile mostra che questo prodotto è privo di impurezze di cloridrina (IV).

b) Una soluzione di g 20 (0,1 moli) di cloruro acido (I) in 125 cm³ di etere assoluto è aggiunta lentamente, sotto agitazione e raffreddamento a 0°, a 635 cm³ di una soluzione eterea di diazometano 0,38 M (0,25 moli). Terminata l'aggiunta, si lascia a sè per 6 ore. Si elimina il diazometano in eccesso e 2/3 del solvente; la soluzione residua è ripresa con 500 cm³ di etere e trattata con una lenta corrente di HCl gassoso secco per 3 ore. L'elaborazione successiva è stata fatta come descritto per il metodo a). La distillazione nel vuoto ha consentito di separare due frazioni. La prima frazione (p. eb. 102-106° a 0,01 mm; g 13,8) è costituita dal clorochetone (III), liquido viscoso che cristallizza rapidamente. Dopo ricristallizzazione da esano, il prodotto fonde a 69-70° e la cromatografia su strato sottile mostra che esso

(*) I punti di fusione non sono corretti. Gli spettri I.R. sono stati registrati con un apparecchio Perkin-Elmer Mod. 21. Gli spettri R.M.N. sono stati registrati con un apparecchio Varian A-60.

è privo di impurezze di cloridrina (IV). La seconda frazione (p. eb. 115-124° a 0,01 mm; g 7) è un liquido viscoso che cristallizza parzialmente. La cromatografia su strato sottile mostra che si tratta di una miscela di clorochetone (III) e di cloridrina (IV); in base all'intensità della banda carbonilica nello spettro I.R., si deduce che i due composti sono presenti in rapporto 1:1. La separazione dei due componenti per distillazione frazionata risulta poco efficace mentre la separazione per cromatografia su Al_2O_3 è sconsigliabile per la grande reattività del clorochetone. La cloridrina (IV) può essere separata quantitativamente dal clorochetone (III) sottoponendo la miscela all'idrogenazione catalitica, secondo il metodo seguente: la frazione (g 7) è sciolta in 125 cm³ di etanolo al 95 % ed idrogenata in presenza di carbone palladato al 10 % (g 1), con una pressione iniziale di 3,5 atmosfere di idrogeno. Dopo 3 ore l'assorbimento di idrogeno è terminato. Si filtra allora il catalizzatore, si lava a fondo con etanolo e si elimina il solvente a pressione ridotta. Il residuo oleoso è frazionato nel vuoto, raccogliendo due frazioni. La prima frazione (p. eb. 70-73° a 0,02 mm; g 2,8) è un olio incolore costituito da 2-acetil-1,4-benzodiossano (3). Il suo spettro I.R. è identico in ogni dettaglio a quello di un campione autentico. Analisi:

trov. %: C 67,68; H 5,45;
 per $C_{10}H_{10}O_3$ calc. : 67,40; 5,66.

La seconda frazione (p. eb. 110-113° a 0,02 mm; g 3,4) è costituita dalla cloridrina (IV), liquido viscoso che per riposo solidifica totalmente. Un campione, ricristallizzato da benzolo-esano 1:5, ha p.f. 63-64°. Spettro I.R.: vedi fig. 1. Spettro R.M.N.: vedi fig. 2. Analisi:

trov. %: C 50,37; H 4,39; Cl 26,97;
 per $C_{11}H_{12}Cl_2O_3$ calc. : 50,21; 4,60; 26,95.

c) Una soluzione di g 20 (0,1 moli) di cloruro acido (I) in 125 cm³ di etere assoluto è trattata con diazometano come descritto nel metodo b). Dopo 6 ore di riposo, si aggiungono ancora 220 cm³ di una soluzione eterea di diazometano 0,36 M (0,08 moli) e si lascia in riposo altre 6 ore. La miscela di reazione è poi trattata con una lenta corrente di HCl gassoso secco per 3 ore. Si elabora poi la soluzione eterea come descritto per il metodo a). La distillazione frazionata nel vuoto consente di isolare una frazione (p. eb. 104-108° a 0,08 mm; g 12,6) costituita dal clorochetone (III) puro ed una seconda frazione (p. eb. 110-130° a 0,08 mm; g 8,7) costituita da un liquido viscoso che cristallizza solo parzialmente. L'idrogenazione catalitica con carbone palladato, secondo quanto descritto nel metodo b), consente di isolare g 4,2 di 2-acetil-1,4-benzodiossano e g 3,3 (12 %) di cloridrina (IV).

2-Idrossi-2-(1,4-benzodiossano-2-il)-1,3-dicloro-propano (iv). — Una soluzione di g 1 (0,0047 moli) di clorochetone (iii) in 30 cm³ di etere viene trattata con 20 cm³ di una soluzione eterea di diazometano 0,9 M (0,018 moli) e poi lasciata a sè per 3 ore. Dopo questo tempo, la reazione praticamente non procede oltre, come è dimostrato dall'esame degli spettri I.R. registrati in tempi successivi; infatti rimane costante il rapporto tra l'altezza della banda carbonilica a 1742 cm⁻¹ e quella dell'anello benzenico a 1592 cm⁻¹. La percentuale di clorochetone ancora presente (calcolata in base all'area corrispondente alla banda carbonilica) è dell'ordine del 10 %. La soluzione eterea viene allora trattata con una lenta corrente di HCl gassoso per 3 ore, quindi degasata, lavata con acqua, con NaHCO₃ diluito, con acqua ed infine seccata su CaCl₂. Eliminato il solvente, si distilla il residuo: dopo poche teste, si ottengono g 1 (86 %) di cloridrina (iv) sotto forma di un olio viscoso con p. eb. 108-110° a 0,01 mm. Il residuo solidifica totalmente per riposo e dopo ricristallizzazione da benzolo-esano 1:5 ha p.f. 63-64°. Spettro I.R.: vedi fig. 1. Analisi:

trov. %: C 50,53; H 4,37; Cl 26,72;
per C₁₁H₁₂Cl₂O₃ calc. : 50,21; 4,60; 26,95.

2-Idrossi-2-(1,4-benzodiossano-2-il)-propano (v). — Grammi 2,5 di magnesio attivato (0,103 moli) vengono coperti con 25 cm³ di etere anidro e, sotto agitazione, si aggiunge una soluzione di g 14,3 di ioduro di metile (0,1 mole) in 50 cm³ di etere anidro. La reazione ha inizio spontaneamente ed è completa dopo circa due ore. La miscela di reazione è diluita con 100 cm³ di etere anidro e scaldata a ricadere per un'ora. Dopo raffreddamento, si aggiunge lentamente sotto agitazione una soluzione di g 5,2 di 2-carbetossi-1,4-benzodiossano (°) (0,025 moli) in 25 cm³ di etere anidro. La reazione è fortemente esotermica e viene completata scaldando per due ore a ricadere. Si raffredda poi con ghiaccio e si aggiungono poco a poco 10 cm³ d'acqua e successivamente 30 cm³ di acido solforico al 20 %. Dopo riposo di una notte, si separano per decantazione i cristalli di solfato di magnesio e lo strato acquoso, separato dallo strato eterico, viene lavato due volte con etere. Gli estratti eterici riuniti sono decolorati con una soluzione satura di Na₂S₂O₃ ed infine seccati su Na₂CO₃. Dopo eliminazione del solvente, si ottiene un residuo solido che viene purificato per distillazione nel vuoto, ottenendo g 4,6 (95 %) di carbinolo (v) con p. eb. 96-97° a 0,08 mm. Un campione, ricristallizzato da esano ha p. f. 59-60°. Lo spettro I.R. (CCl₄) del composto mostra bande di assorbimento a: 3571, 3012, 2950, 2899, 2857, 1595 (m), 1494 (vs), 1464, 1385, 1370, 1329 (m), 1302 (m), 1266 (vs), 1247 (s), 1230, 1198, 1170 (m), 1147, 1131, 1114 (m), 1088, 1074 (s),

1019, 1000, 975, 956, 936, 923, 906, 867 cm^{-1} . Spettro R.M.N. vedi fig. 3.

Analisi:

trov. %: C 67,80; H 6,99;
per $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$ calc. : 68,02; 7,27.

1-Clorometil-1-(1,4-benzodiossan-2-il)-etilen-ossido (VI). — a) Una soluzione di g 4,25 (0,02 moli) di clorochetone (III) in 70 cm^3 di etere è trattata, raffreddando a 0°, con 91 cm^3 di una soluzione eterea di diazometano 0,66 M (0,06 moli). La miscela di reazione è lasciata a sè a temperatura ambiente. Per l'andamento della reazione vedi fig. 4. Dopo 3 ore la reazione si considera praticamente terminata, essendo costante nel tempo il rapporto tra le intensità delle bande a 1472 e 1592 cm^{-1} . La soluzione residua viene allora elaborata eliminando il solvente a pressione ridotta e frazionando nel vuoto l'olio residuo. Si raccolgono due frazioni. La prima frazione (p. eb. 100-103° a 0,01 mm; g 0,95) è costituita da un liquido viscoso incolore, che, in base ai risultati della cromatografia su strato sottile, risulta essere una miscela di epossido (VI) e di clorochetone (III); nello spettro I.R. in velo liquido, il rapporto tra le intensità delle bande indicate mostra che tale miscela è approssimativamente composta dal 40 % di clorochetone e dal 60 % di epossido. La seconda frazione (p. eb. 124-127° a 0,01 mm; g 3,2) è costituita dall'eossido (VI) praticamente puro. Lo spettro I.R. (CCl_4) del composto mostra bande di assorbimento a: 3012, 2941, 2899, 2857, 1595 (m), 1493 (vs) 1466, 1330, 1314, 1302, 1289, 1266 (vs), 1248 (s), 1196, 1147, 1111, 1109 (m), 1043 (m), 978, 954, 945, 924, 910, 853 cm^{-1} . Analisi:

trov. %: C 58,21; H 4,72; Cl 15,61;
per $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClO}_3$ calc. : 58,29; 4,89; 1564.

b) Grammi 2,12 (0,01 moli) di clorochetone (III) sciolti in 40 cm^3 di una miscela etere-metanolo 1:1 vengono trattati raffreddando a 0°, con 55 cm^3 di una soluzione eterea di diazometano 0,55 M (0,03 moli). Si osserva immediatamente sviluppo di azoto che dura per circa cinque minuti. La registrazione dello spettro I.R. nella zona tra 2000 e 1500 cm^{-1} su campioni di soluzione prelevati nel tempo, rivela che la banda carbonilica a 1742 cm^{-1} è completamente scomparsa dopo mezz'ora. La miscela di reazione è evaporata a secco a pressione ridotta ed il residuo oleoso distillato nel vuoto. Si ottengono così g 2 (95 %) di eossido (VI) puro, con p. eb. 124-126° a 0,02 mm.

Una soluzione di g 0,42 di eossido (VI) in 60 cm^3 di etere per trattamento con HCl gassoso fornisce g 0,40 di cloridrina (IV) con p. eb. 104-106° a 0,02 mm e p. f. 63-64° da benzolo-esano. I cristalli di cloridrina così preparati sono identici in tutti i dettagli (p. f. in miscela, spettro I. R.) a quelli

della cloridrina ottenuta direttamente nella reazione tra diazometano ed il cloruro acido (I).

2-Idrossi-2-(1,4-benzodiossan-2-il)-3-cloro-propano (VII). — a) A 37 cm³ di una soluzione eterea di LiAlH₄ 0,3 M (0,011 moli) si aggiunge lentamente sotto agitazione una soluzione di g 2,5 (0,011 moli) di epossido (VI) in 40 cm³ di etere anidro. Si riscalda a ricadere per 6 ore, poi si decompone con H₂O (5 cm³) e con NaOH al 40% (1 cm³). Si separano i sali inorganici che vengono lavati con 100 cm³ di etere e gli estratti eteri riuniti sono seccati su CaCl₂. Per eliminazione del solvente si ottiene un residuo che viene distillato: si raccolgono così g 2,3 di cloridrina (VII) sotto forma di un olio viscoso, incolore con p. eb. 85-86°/0,02 mm. Il prodotto per riposo solidifica ed un campione ricristallizzato da esano mostra p. f. 90-91°. Lo spettro I. R. (CHCl₃) del composto mostra bande di assorbimento a 3534, 2959, 2899, 2853, 1595 (m), 1494 (vs), 1464, 1428, 1379, 1351, 1335, 1303 (m), 1266 (vs), 1250 (s), 1190, 1147, 1109 (m), 1087 (m), 1070 (m), 1034 (m), 1016, 974, 937, 916, 885, 866, 853, 824 cm⁻¹. Analisi:

trov. %: C 57,45; H 5,57; Cl 15,52;
per C₁₁H₁₃ClO₃ calc. : 57,76; 5,73; 15,51.

b) Ad una soluzione di g 15 di clorochetone (III) in 100 cm³ di etere anidro si aggiunge lentamente, sotto agitazione ed in corrente di azoto, una soluzione di reattivo di Grignard preparata da g 2,2 di magnesio attivato e g 15 di CH₃I. Si forma istantaneamente un precipitato arancione il cui colore vira improvvisamente al giallo chiaro una volta terminata l'aggiunta del reattivo. Si lascia a sè sotto agitazione per un'ora, poi si tratta la miscela di reazione con 30 cm³ di HCl 2N. Lo strato eterico viene separato, seccato su Na₂CO₃ e privato del solvente. L'olio residuo viene distillato nel vuoto raccogliendo soltanto la frazione con p. eb. 80-100° a 0,1 mm (g 7 circa) e trascurando il rimanente costituito da una soluzione viscosa molto più alto-bollente. Per riposo l'olio distillato solidifica in grande parte ed i cristalli separati fondono a 74-84°. Dopo 3 cristallizzazioni da benzolo-esano si ottengono cristalli di cloridrina (VII) con p. f. 91-92° senza depressione in miscela con campioni della stessa cloridrina preparata secondo il metodo a). Gli spettri I. R. risultano identici in tutti i dettagli. Analisi:

trov. %: C 57,73; H 5,50; Cl 55,38; O 20,84;
per C₁₁H₁₃ClO₃ calc. : 57,76; 5,73; 15,51; 20,99.

Ringraziamo la Prof.ssa MARGHERITA MARZADRO del Laboratorio di Microanalisi dell'Istituto Superiore di Sanità per avere eseguito le determina-

zioni microanalitiche, la Dott.ssa MARIA LETIZIA SALVI dell'Università Cattolica di Roma per gli Spettri R.M.N. ed il Sig. ANDREA AMATO per l'aiuto prestatoci nella esecuzione della parte sperimentale.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) ROSNATI V. e DE MARCHI F. - *Gazz. Chim. Ital.*, 91, 605 (1961).
- (²) JACKMAN L. M. - *Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Pergamon Press, Londra (1959).
- (³) BELLAMY L. J. - *The Infra-red Spectra of Complex Molecules*, pag. 84, Methuen, Londra (1956).
- (⁴) ARNDT F. e AMENDE J. - *Ber.*, 61, 1122 (1928); ARNDT F., EISTERT B. e AMENDE J. - *Ber.*, 61, 1949 (1928).
- (⁵) BRADLEY W. e SCHWARZENBACH G. - *J. Chem. Soc.*, 2904 (1928).
- (⁶) *Organic Reactions*, BACHMANN W. E. e STRUVE W. S. - John Wiley, New York, 2, 40 (1947).
- (⁷) ARNDT F., AMENDE J. ENDER W. - *Monatsh.*, 59, 202 (1932); ADAMSON D. W. e KENNER J. - *J. Chem. Soc.*, 181 (1939); STEADMAN T. R. - *J. Am. Chem. Soc.*, 62, 1906 (1940).
- (⁸) CLIBBENS D. A. e NIERENSTEIN M. - *J. Chem. Soc.*, 107, 1491 (1915); LEWIS H. H., NIERENSTEIN N. e RICH E. M. - *J. Am. Chem. Soc.*, 47, 1728 (1925); MALKIN T. e NIERENSTEIN M. - *J. Am. Chem. Soc.*, 52, 1504 (1930).
- (⁹) KOO J., AVAKIAN S. e MARTIN G. J. - *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 5373 (1955).