

Su alcuni aspetti della biologia di *Blatta orientalis* L. (*)

MARCELLO RICCI

Laboratori di Parassitologia

Riassunto. — Vengono riferiti i risultati dello studio di alcuni aspetti della biologia di *Blatta orientalis* L. e precisamente: durata del periodo di preovposizione; ritmo di ovposizione in funzione della temperatura; dimensioni delle ooteche in linea assoluta ed in funzione della temperatura di allevamento e dell'ordine della loro deposizione; durata dello sviluppo embrionale a varie temperature; numero delle larve che schiudono da una ooteca, e sue relazioni con le dimensioni dell'ooteca; durata dello sviluppo post-embriionale a varie temperature; rapporto tra i sessi.

Summary. — The Author has studied some aspects of the biology of *B. orientalis*. The following results were obtained.

The preovposition period appears to vary according to temperature, oscillating between the extremes: 10.40 ± 0.37 days at 30°C and 35.50 ± 0.87 at 18°C .

The rhythm of ovoposition is more intense at 30°C , but the ovoposition period is shorter. The optimal temperature to obtain the largest number of oothecae was shown to be between 22° and 24°C .

The dimensions of oothecae, under natural and experimental conditions, vary between 6.5 and 13.5 mm; the majority, however, are long 10-11.5 mm.; breeding temperature does not influence the dimensions of oothecae, while these dimensions are affected by the deposition order: the last oothecae tend to be gradually smaller.

The incubation period varies in function of temperature, oscillating between the extremes: 40.79 ± 0.32 days at 30°C and 65.24 ± 0.90 at 22°C .

The number of hatched larvae from one ootheca varies in these experiments between 6 and 17; the number of larvae depends on the dimensions of the oothecae, eventhough marked variations can be observed in the production of oothecae of the same size.

The study of postembryonal development confirmed that it is more rapid in crowded breedings, and that males generally mature

(*) Questo lavoro è apparso in *Riv. Parassitol.*, 24, 185 (1963).

earlier than females. The duration of development has shown small differences between 30°C and 22°-24°C only in crowded breedings. Yet, the period of development at room temperature oscillating between 15° and 26°C appeared definitely longer.

The sex-ratio of individuals bred at 30° and 22°-24°C does not appear to be statistically different from the theoretic ratio of 1:1.

INTRODUZIONE

In una precedente pubblicazione ⁽¹⁾ sono stati illustrati i risultati di una prima serie di ricerche sulla biologia di *Blatta orientalis* L., e precisamente: capacità riproduttiva; fattori influenzanti il ritmo di ovoposizione, con particolare riguardo alla temperatura; durata della vita dello stadio adulto nei due sessi a varie temperature.

Successivamente a tale pubblicazione scarsi, a quanto risulta dallo spoglio bibliografico, sono stati gli studi in argomento, per cui la maggior parte dei punti non ben chiariti della biologia di *B. orientalis* che in essa venivano elencati — « l'esatto rapporto numerico tra i sessi, la longevità, l'esistenza o meno di un ciclo stagionale, la prolificità, la durata dello sviluppo embrionale e di quello postembrionale » — sono rimasti ancora tali.

Nel corso degli ultimi anni, in più riprese, sono state eseguite altre ricerche, soprattutto dirette ad indagare più a fondo alcuni aspetti dell'attività riproduttiva; esse hanno consentito la raccolta di una notevole messe di dati che, se anche non sempre conclusivi, portano un sensibile contributo all'allargamento delle conoscenze in argomento. Alla illustrazione di tali dati è dedicata la presente nota.

MATERIALI E METODI

Le blatte utilizzate nel presente studio provenivano sia da una popolazione naturale che da allevamenti di massa e parziali (coppie o femmine isolate servite in precedenti esperienze).

Per gli allevamenti sono stati utilizzati speciali contenitori costituiti da una serie di 10-12 dischi di legno sovrapposti; essi vengono tenuti insieme da un'asse metallica che, fissata al disco di base, passa per il centro forato di ciascun disco; i dischi, che hanno un diametro di cm 15 ed uno spessore di mm 7-8, sono distanziati tra loro di circa cm 1 mediante l'interposizione tra l'uno e l'altro di rondelle metalliche; un anello posto alla sommità dell'asta metallica consente facilmente il trasporto dell'intero contenitore.

Tali contenitori, che ricreano sostanzialmente condizioni ambientali molto prossime a quelle che le blatte prediligono almeno nelle case, sono risul-

tati assai pratici sia perchè consentono una notevole concentrazione degli insetti in uno spazio relativamente piccolo, sia perchè permettono di trasferire facilmente le blatte da un recipiente all'altro senza che si verifichino fughe — le blatte stesse tendono a ritirarsi all'interno appena il contenitore viene sollevato —; essi consentono inoltre agevolmente il recupero delle ooteche e l'eventuale prelievo di insetti.

I contenitori erano posti in ampi cilindri o vasche di vetro. Per nutrimento venivano somministrati a giorni alterni insalata fresca e pane o crusca, integrando una volta alla settimana con un poco di latte in polvere addizionato di un 5 % di lievito di birra. L'umidità era assicurata mediante una vaschetta ripiena di cotone bagnato.

RICERCHE SULLA OVOPOSIZIONE

Preovoposizione.

Il tempo intercorrente tra la muta allo stadio adulto e la deposizione della prima ooteca è risultato variare, in femmine isolate appena mature insieme ad un maschio, a seconda della temperatura di allevamento. I dati raccolti sono esposti nella Tabella 1: il numero medio dei giorni di preovoposizione aumenta progressivamente con il diminuire della temperatura.

TABELLA 1

Durata della preovoposizione in *B. orientalis* a varie temperature.

Temperatura di allevamento	Numero delle osservazioni	Durata della preovoposizione in gg	
		Estremi della distribuzione	$\bar{x} \pm \frac{s}{x}$
30°	10	9—12	10,40 ± 0,37
26°	6	12—14	12,83 ± 0,31
24°	17	16—25	20,00 ± 0,61
22°	6	24—30	26,33 ± 1,44
18°	4	34—38	35,50 ± 0,87

Tali dati, presi singolarmente, concordano solo in parte con quelli riferiti da altri AA. Il periodo di preovoposizione è risultato infatti a GOULD e DEAY (2) di 18-22 gg ad una temperatura ambiente tra 18° e 27°, e di 13-27 gg ad una temperatura costante di 28°, mentre LAING (3) parla genericamente di 10-14 gg, e WILLIS, RISER e ROTH (4) (5) lo hanno determinato a 30° in 12,2 ± 1,1 gg.

Ritmo di ovoposizione.

Sul ritmo di ovoposizione in funzione della temperatura su individui isolati nulla c'è da aggiungere a quanto già pubblicato, tutti i nuovi dati essendo di conferma ai precedenti. Si può solo osservare che nel nuovo complesso di ricerche non si è mai riusciti ad avere serie molto lunghe di ooteche prodotte da una singola blatta, i massimi verificati essendo di 5 ooteche a 30°, di 11 a 24°, di 7 a 22° e di 3 a 18°; vero anche però che i massimi a 24° e 22° sono stati osservati in blatte prelevate già mature da allevamenti di massa (rispettivamente il 9.5 ed il 2.5) e non si può quindi escludere che non avessero precedentemente prodotto anche numerose ooteche. Per le blatte tenute sotto controllo fin dalla loro muta allo stadio adulto i massimi osservati sono stati: 7 ooteche a 26°, 8 a 24° e 5 a 22°.

L'azione della temperatura sul ritmo di ovoposizione di blatte in gruppo è stata invece studiata mediante il seguente esperimento.

Tre gruppi di 20 maschi e 20 femmine, tutti maturati tra 8 e 20 giorni prima dell'inizio dell'esperimento, sono stati posti — in identiche condizioni per quanto si riferisce al nutrimento ed all'ambiente (un contenitore ciascuno in una grande vasca di vetro) — uno a 30° (gruppo A), uno a 22°-24° (gruppo B) ed uno a 17°-19° (gruppo C). L'esperimento ha avuto inizio il 25 aprile e termine il 22 settembre, con la morte dell'ultima femmina del gruppo A; il controllo dello stato dell'allevamento e la raccolta delle ooteche deposte sono stati effettuati, con totale svuotamento del contenitore, una volta alla settimana.

L'andamento dell'esperienza, per quanto riguarda il ritmo di deposizione ed il numero delle ooteche prodotte è illustrato nella Tabella 2 — con inizio dal 28 aprile e, per brevità, di due in due settimane —. Si ricava da esso che la produzione delle ooteche è stata, sia in senso assoluto che relativo, nettamente superiore nel gruppo B, esso presentando fin dall'inizio un ritmo pari a quello del gruppo A — a determinare tale comportamento potrebbe entrare in gioco qualche fattore relativo all'affollamento — e continuando a produrre ooteche in buon numero molto tempo dopo la fine dell'ovoposizione nel gruppo A stesso, fino a presentare al momento in cui è stata arrestata l'esperienza, e cioè dopo 151 gg, un valore del rapporto ooteche/femmina nettamente superiore a quello degli altri due gruppi. Per il gruppo A è chiaramente evidente la rapida usura vitale: le ooteche sono state deposte entro breve lasso di tempo, appena 95 gg; al momento dell'emissione delle ultime ooteche sopravvivevano solo due femmine, una delle quali ha persistito per i successivi 56 giorni di esperimento, sopravvivendo quindi 49 + 1-7 gg senza produrre altre ooteche. Nel gruppo C il ritmo di ovoposizione è stato inizialmente assai basso, 1/4-1/6 di quello degli altri due gruppi, ed ha continuato per molto tempo a mantenersi inferiore a quello del gruppo B; ad

un certo punto però (28 luglio) ha pareggiato il ritmo di questo gruppo e poi ha finito per superarlo. Alla fine dell'esperimento sopravvivevano ancora 2 femmine ed 1 maschio nel gruppo B e 5 femmine e 2 maschi nel gruppo C.

TABELLA 2

Ovodeposizione in 3 gruppi di 20 ♀♀ e 20 ♂♂ ciascuno, a varie temperature.

Data	A (30°)		B (24°)		C (18°)	
	Ooteche prodotte	Totale	Ooteche prodotte	Totale	Ooteche prodotte	Totale
28-4	8	8	8	8	2	2
5-5	19	27	23	31	3	5
12-5	18	45	15	46	11	16
19-5	14	59	11	57	5	21
26-5	14	73	11	68	12	33
2-6	7	80	13	81	3	36
9-6	7	87	19	100	8	44
16-6	13	100	17	117	10	54
23-6	3	103	8	125	5	59
30-6	2	105	7	132	4	63
7-7	4	109	15	147	5	68
14-7	1	110	12	159	9	77
21-7	1	111	10	169	5	82
28-7	2	113	7	176	7	89
4-8	—	—	6	182	5	94
11-8	—	—	6	188	5	99
18-8	—	—	2	190	4	103
25-8	—	—	2	192	3	106
1-9	—	—	1	193	—	106
8-9	—	—	1	194	3	109
15-9	—	—	—	194	1	110
22-9	—	—	1	195	4	114
Ooteche/ /femmina	5,65		9,75		5,70	

È stata anche confermata l'osservazione del rallentamento del ritmo di ovoposizione con il progredire dell'età della blatta. Si può ancora aggiungere in proposito che con notevole frequenza si verifica l'intercorrere di periodi abbastanza lunghi di tempo tra la deposizione dell'ultima ooteca e la morte della femmina. I dati a disposizione sono raccolti nella Tabella 3;

TABELLA 3

Tempo tra ultima ovoposizione e morte.

Temperatura di allevamento	Numero delle osservazioni	gg tra l'ultima ovoposizione e la morte	
		Estremi della distribuzione	$\bar{x} \pm \frac{s}{x}$
30°	47	0—25	6,74 \pm 0,86
26°	25	3—84	23,16 \pm 4,46
24°	16	8—91	30,75 \pm 5,73
22°	20	0—55	33,65 \pm 3,75
18°	20	6—105	52,45 \pm 6,95

essi dimostrano una notevole variabilità di comportamento delle singole blatte, ma anche, nel complesso, una differenza di comportamento in relazione al variare della temperatura: lunghi o lunghissimi periodi di sopravvivenza senza ovoposizione si rilevano per esempio a tutte le temperature meno che a 30°.

RICERCHE SULLE DIMENSIONI DELLE OOTECHE

Per le ooteche di *B. orientalis* vengono abitualmente date dimensioni di circa mm 12, e si accenna ad una loro piú o meno notevole variabilità. Non risulta tuttavia che l'argomento sia stato finora oggetto di approfondite indagini.

Nella presente ricerca le dimensioni delle ooteche sono state studiate in linea assoluta ed in relazione alla temperatura di allevamento degli adulti ed all'ordine della loro deposizione.

La fig. 1 illustra la distribuzione percentuale, a seconda della lunghezza: A, del totale delle ooteche misurate; B, di un gruppo di 300 ooteche provenienti da una popolazione naturale; C, di un gruppo di 209 ooteche deposte a 30°; D, di un gruppo di 418 ooteche deposte a 24°; E, di un gruppo di 149 ooteche deposte a 18°.

Nel totale delle ooteche la massima dimensione osservata è stata mm 13,5, e quella minima mm 5,6; la grande maggioranza, oltre il 75 %, ha presentato dimensioni tra mm 10 e mm 11,5. Per quanto riguarda i gruppi di

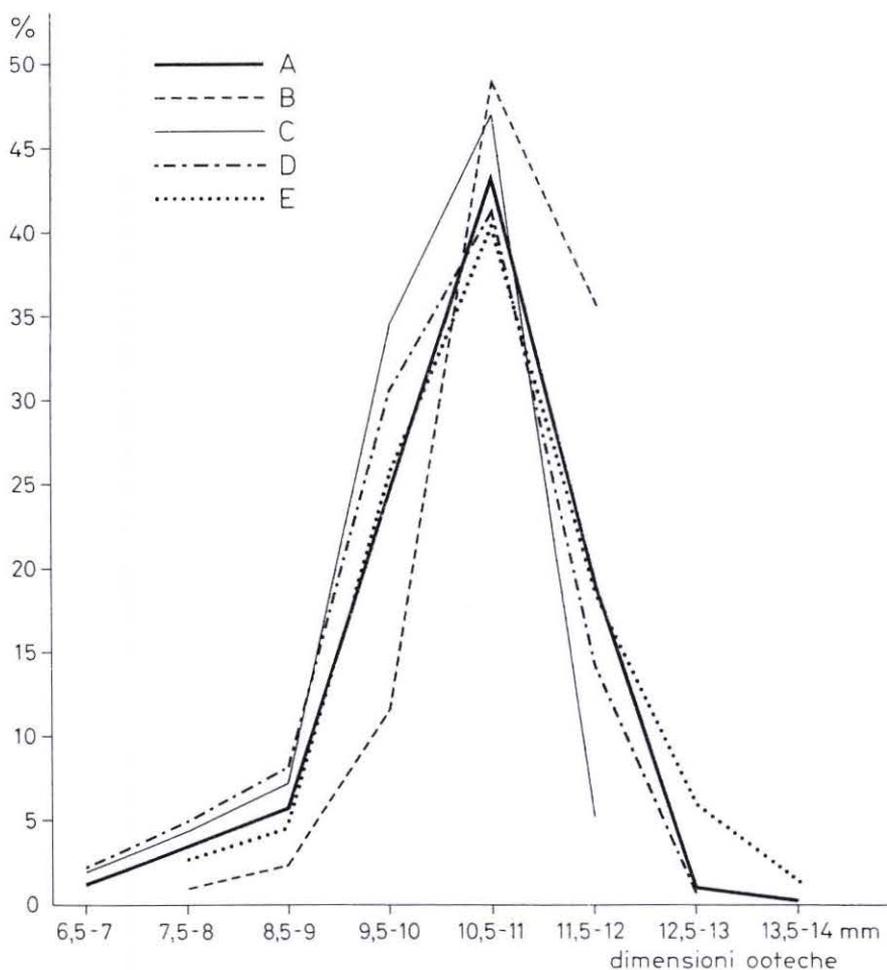


Fig. 1. — Dimensioni delle ooteche di *B. Orientalis*: A) Totale delle ooteche misurate; B) 300 ooteche di popolazione naturale; C) 209 ooteche deposte a 30°; D) 418 ooteche deposte a 24°; E) 149 ooteche deposte a 18°.

ooteche deposte a varie temperature, la semplice osservazione della figura consente di rilevare la quasi completa sovrapposizione delle loro distribuzioni, e di concludere quindi che la temperatura di allevamento degli adulti non sembra influire minimamente sulle dimensioni delle ooteche prodotte.

Un fattore che appare decisamente avere influenza sulle dimensioni delle ooteche è invece l'ordine della loro emissione: nella grande maggioranza dei casi di serie sufficientemente lunghe di ooteche deposte da una singola blatta si palesa una riduzione progressiva della lunghezza, fino ad aversi spesso per l'ultima o le ultime dimensioni sensibilmente più piccole di quelle delle ooteche precedenti. In Tabella 4 sono esposti i dati relativi alla ovopo-

TABELLA 4

Dimensioni delle ooteche a seconda dell'ordine di emissione.

Ordine di deposizione	In 17 ♀♀ seguite dalla muta allo stadio adulto e con produzione di almeno 5 ooteche			Nelle ultime 5 ooteche deposte di 28 ♀♀ non seguite dalla muta allo stadio adulto		
	Numero delle ooteche	Lunghezza delle ooteche in mm		Numero delle ooteche	Lunghezza delle ooteche in mm	
		Estremi della distribuzione	$\bar{x} \pm \frac{s}{x}$		Estremi della distribuzione	$\bar{x} \pm \frac{s}{x}$
1	17	9,0—12,0	10,50±0,19	28	8,5—12,0	10,46±0,17
2	17	9,5—12,0	10,50±0,16	28	7,0—12,0	9,93±0,22
3	17	8,5—11,5	10,06±0,23	28	7,0—12,5	9,82±0,23
4	17	9,0—11,5	10,09±0,21	28	7,0—11,0	9,20±0,20
5	17	6,5—11,5	9,24±0,34	28	7,0—10,0	8,48±0,18
6	8	7,0—11,0	8,88±0,48			
7	4	6,5—9,5	7,88±0,69			
8	1	8,5	—			
Ultima ooteca	17	6,5—11,5	8,50±0,30			

sizione di 17 blatte isolate, insieme ad un maschio, al raggiungimento della maturità, seguite fino alla morte ed aventi prodotto almeno 5 ooteche. Tali dati dimostrano come con il progredire dell'ordine di deposizione si abbia un sempre maggiore spostamento verso valori dimensionali più piccoli; particolarmente significativa la differenza che si rileva tra le prime e le ultime ooteche deposte. Nella stessa Tabella 4 sono anche riportati i dati relativi alle misure delle ultime 5 ooteche prodotte da 28 femmine, pure isolate ma non a partire dalla loro muta allo stadio adulto; anche in essi è ben rilevabile la progressiva diminuzione delle dimensioni delle ooteche. Degno di nota l'identico valore medio delle dimensioni delle ultime ooteche deposte dai due gruppi di femmine.

Nella determinazione delle dimensioni delle ooteche entrano poi certamente fattori costituzionali. In varie occasioni è stato infatti possibile osservare sia blatte che hanno prodotto tutte ooteche più piccole della media, sia blatte a comportamento diametralmente opposto.

RICERCHE SULLO SVILUPPO EMBRIONALE

Periodo di incubazione.

Sulla durata dello sviluppo embrionale di *B. orientalis* gli AA. riportano valori diversi. Secondo ZABINSKI (6), a temperature non inferiore a 23°, lo sviluppo dell'ooteca richiede normalmente 2 o 3 mesi; RAU (4) afferma che occorrono 45-46 gg; CROS (8) parla di 45-60, ma solo per le ooteche deposte fino ad agosto in quanto quelle prodotte successivamente resterebbero quiescenti fino alla primavera seguente. Secondo GOULD e DEAY (2) il periodo di incubazione è in stretta relazione con la temperatura; nelle loro esperienze esso ha infatti richiesto: 81-42 gg, su 53 ooteche, ad una temperatura media tra 21° e 29°; 60,6 gg in media, su 49 ooteche, ad una temperatura ambiente tra 18° e 27°; 37 gg in media, su 7 ooteche, ad una temperatura costante di 28°. WILLIS, RISER e ROTH (4 5) riferiscono infine di aver verificato a 30°, su 32 ooteche, un periodo di incubazione di gg $43,7 \pm 0,2$.

I risultati delle presenti ricerche confermano in pieno le affermazioni di GOULD e DEAY (2) circa la dipendenza della durata dell'incubazione dalla temperatura. I dati relativi alle ooteche incubate a temperature costanti,

TABELLA 5

Durata del periodo di incubazione a varie temperature.

Temperatura	Numero delle osservazioni	Periodo di incubazione in gg	
		Estremi della distribuzione	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
30°	47	38—47	$40,79 \pm 0,32$
26°	27	41—52	$44,33 \pm 0,49$
24°	58	49—64	$57,24 \pm 0,21$
22°	33	57—73	$65,24 \pm 0,90$
30°—22°	11	61—72	$67,73 \pm 1,25$
26°—22°	15	57—72	$65,20 \pm 1,42$
22°—30°	85	41—67	$52,18 \pm 0,55$

riportati in Tabella 5, dimostrano chiaramente come con il diminuire della temperatura la durata dello sviluppo tenda progressivamente ad aumentare.

L'azione della temperatura sul periodo di incubazione è stata anche studiata sottoponendo alcuni gruppi di ooteche successivamente a due diverse temperature. Anche i risultati di tale indagine sono riportati in Tabella 5 ed emerge da essi come nel passaggio da una temperatura più bassa ad una più alta il tempo necessario al compimento dello sviluppo embrionale sia in linea di massima intermedio tra quello proprio di ciascuna delle due temperature. Il passaggio da una temperatura più alta ad una più bassa, e ciò particolarmente per il passaggio da 30° a 22°, sembra invece avere effetti sfavorevoli, inducendo un allungamento del tempo di incubazione.

Numero delle larve.

È noto che una ooteca perfetta di *B. orientalis* contiene 16 uova; LAING afferma che è però difficile che maturino tutte, per cui normalmente schiudono solo 10-11 larve. Dati più precisi sono forniti da GOULD e DEAY, che, a temperatura ambiente tra 18° e 27°, hanno avuto dalle ooteche fertili di una sola femmina medie di larve schiuse oscillanti tra 8,0 e 15,0; e da WILLIS, RISER e ROTH che, a 30°, hanno ottenuto da 32 ooteche una media di larve schiuse pari a $15,4 \pm 0,2$.

In questa serie di ricerche il numero delle larve schiuse da una singola ooteca di aspetto normale è risultato oscillare tra 6 e 17, ed è apparso in linea di massima in buon accordo con le dimensioni dell'ooteca stessa. Nella Tabella 6 sono riportati i dati relativi al numero di larve ottenuto da 270 ooteche — prodotte da femmine isolate, con o senza maschio — ad evoluzione normale, cioè con tutte uova apparentemente a termine, in relazione alla lunghezza delle ooteche. Nonostante la discreta variabilità del numero delle larve prodotte dalle ooteche di una stessa dimensione, è innegabile nei valori medi la stretta correlazione tra lunghezza dell'ooteca e numero delle larve prodotte.

In qualche caso, non compreso tra i precedenti, è stata osservata in ooteche di apparenza normale la degenerazione di parecchie uova; in altri l'apparente arrivo a termine dello sviluppo embrionale, ma incapacità delle larve ad abbandonare l'involucro ovulare. Si è d'altronde potuto anche accertare che ooteche di aspetto anormale, specie perchè più o meno deformate, risultavano capaci di produrre alcune larve.

Il rapporto tra ooteche sviluppate e non sviluppate, sempre riguardo a quelle provenienti da femmine isolate, è stato di 5 : 3; il massimo di ooteche abortite, con un numero di aborti addirittura superiore al numero delle ooteche giunte regolarmente a termine, è stato verificato nelle ooteche incubate a 22°; il massimo di quelle regolarmente sviluppate, con rapporto tra svi-

TABELLA 6

Numero di larve prodotto da ooteche di diversa lunghezza

Lunghezza dell'ooteca in mm	Numero delle osservazioni	Numero di larve schiuse	
		Estremi della distribuzione	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
13,5	1	15	—
13,0	1	17	—
12,5	—	—	—
12,0	10	14—17	15,60±0,34
11,5	14	13—17	15,43±0,30
11,0	68	9—17	14,91±0,19
10,5	30	9—16	14,67±0,32
10,0	76	7—16	13,87±0,21
9,5	21	10—16	12,57±0,31
9,0	23	8—16	11,57±0,35
8,5	10	7—14	10,90±0,71
8,0	9	7—12	9,67±0,47
7,5	2	9	9,00 —
7,0	3	6—9	8,00±1,00
6,5	2	7	7,00 —

luppate ed abortite pari a 5:2, a 26°. Per alcune blatte si è avuto il mancato sviluppo della maggior parte o di tutte le ooteche prodotte, e ciò senza alcuna relazione con la temperatura di incubazione.

RICERCHE SULLO SVILUPPO POSTEMBRIONALE

La durata dello sviluppo postembrionale di *B. orientalis* è uno degli argomenti su cui sono stati riferiti i dati più divergenti. Secondo ZABINSKI (6) il tempo necessario a raggiungere la maturità è di 12 mesi a 23°; temperature più alte portano ad una accelerazione dello sviluppo, così a 30° esso ha luogo in 7 mesi; a 20° le blatte resterebbero inattive. Anche secondo RAU lo sviluppo richiede un anno; gli adulti si avrebbero solo in maggio-giugno, e morirebbero in luglio. GOULD e DEAY (2), a temperatura ambiente tra 18° e 27°, hanno verificato lo sviluppo di 11 maschi in un periodo variabile tra 311 e

799 gg, e quello di 14 femmine tra 336 e 910 gg; a 28° lo sviluppo di 5 maschi ha invece richiesto tra 190 e 398 gg, e quello di 6 femmine tra 191 e 406 gg; a maturità viene di regola raggiunta in marzo, in aprile e in maggio, ma si è verificata anche in gennaio, in luglio ed in settembre. QADRI (9) ha ottenuto la maturazione di 27 adulti, a 27°,5, in un tempo medio di 279 gg; egli osserva che i maschi maturano prima delle femmine, ma muoiono anche prima. WILLIS, RISER e ROTH (4) alla temperatura di 30°, hanno ottenuto il 94 % di maturazioni su 492 larve schiuse; per le larve allevate isolatamente la durata dello sviluppo in maschi ed in femmine è stata rispettivamente di gg 177 ± 15 e 282 ± 30 , mentre per le larve allevate in gruppo la durata stessa si è ridotta a gg $148 \pm 2,8$ e gg $165 \pm 3,4$ (*).

Nelle presenti ricerche la durata dello sviluppo postembrionale è stata studiata sia in gruppi abbastanza numerosi di larve, sia allevando insieme tutti i nati di una stessa ooteca. I risultati sono esposti in Tabella 7. Essi confermano il fatto della minor durata dello sviluppo negli allevamenti numerosi ed, in linea di massima ma con evidenza solo per la temperatura di 30°, il più rapido sviluppo dei maschi nei confronti delle femmine. Quanto all'azione della temperatura, solo piccole differenze si riscontrano, e soltanto negli allevamenti numerosi, tra 30° e 22°-24°, mentre palese è la maggiore durata dello sviluppo nelle larve tenute ad una temperatura ambiente con oscillazioni tra 15 e 26°.

Per quanto riguarda il sesso degli individui maturati gli allevamenti dei nati da una stessa ooteca hanno per lo più, e sempre quando il numero degli adulti è stato abbastanza numeroso, dato sia maschi che femmine. Nei tre soli casi in cui gli adulti appartenevano ad un solo sesso il numero di essi era troppo piccolo relativamente a quello delle larve — 4 maschi su 17 larve; 4 femmine su 17 larve; 4 femmine su 12 larve — perchè se ne possa concludere qualcosa; viene tuttavia ricordato, per la precisione, che in tutti e tre i casi l'ooteca era stata prodotta da femmine isolate da allevamenti di massa e mantenuta senza maschio. Dai totali, riportati in Tabella 7, si ricava un rapporto ♀♀:♂♂ pari a 1:1,22 per gli allevamenti a 30° e di 1:0,78 per quelli a 22°-24°.

Negli allevamenti in gruppi numerosi si sono complessivamente avuti 191 maschi e 201 femmine. In quelli tenuti a 30° il rapporto ♀♀:♂♂ è stato 1:1,07 ed in quelli a 22°-24° 1:0,90.

Nel totale generale degli individui maturi ottenuti il rapporto ♀♀:♂♂ è infine stato: 1:1,18 nei soggetti allevati a 30° ed 1:0,88 in quelli allevati a 22°-24°. Nè l'uno nè l'altro rapporto, come quelli precedentemente ricordati, si presenta statisticamente differente da quello teorico 1:1.

(*) Il più rapido sviluppo delle larve allevate in gruppo era già stato osservato da LANDOWSKI (10).

Durata dello sviluppo postembrionale

Temperatura di allevamento	Allevamenti dei nati da una ooteca				Allevamenti in gruppi numerosi						
	Numero delle larve	% adulti	Sesso	Durata dello sviluppo in gg		Numero delle larve	% adulti	Sesso	Durata dello sviluppo in gg		
				Estremi della distribuzione	$\bar{x} \pm s - \bar{x}$				Estremi della distribuzione	$\bar{x} \pm s - \bar{x}$	
30°	359	30,36	♂ 60 ♀ 49	231-344 242-368	281,63 ± 3,87 301,02 ± 4,05	A* B** C***	50 54 16	94,00 96,30 93,75	♂ ♀ ♂ ♀ ♂ ♀	164-265 182-293 162-236 162-270 209-266 232-294	216,61 ± 4,70 246,13 ± 5,13 193,00 ± 3,81 217,80 ± 5,83 243,00 ± 12,14 267,27 ± 6,44
22°-24°	131	31,30	♂ 18 ♀ 23	253-344 225-361	295,94 ± 6,11 275,00 ± 7,38	A1* B1** C1***	110 123 52	97,27 98,37 98,08	♂ ♀ ♂ ♀ ♂ ♀	230-264 230-271 227-282 234-275 223-250 230-250	243,81 ± 1,49 247,19 ± 1,21 244,21 ± 1,72 251,81 ± 1,42 234,19 ± 1,41 241,96 ± 2,83
Temp. amb. (15°-26°)	42	21,90	♂ 4 ♀ 5	345-364 350-373	354,00 ± 4,45 356,80 ± 4,33	Totale	285	97,89	♂ 132 ♀ 147	223-282 230-275	242,09 ± 1,02 248,28 ± 0,85

* ooteche deposte a 30°; ** ooteche deposte a 24°; *** ooteche deposte a 18°.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel presente studio sono stati in conclusione i seguenti.

Il periodo di preovovposizione risulta variare a seconda della temperatura, oscillando tra gli estremi di gg. $10,40 \pm 0,37$ a 30° e gg. $35,50 \pm 0,87$ a 18° .

Il più intenso ritmo di ovovposizione che si rileva a 30° va a scapito della durata dell'ovovposizione stessa. La temperatura ottimale per l'ottenimento del maggior numero di ooteche è risultata quella di $22^\circ-24^\circ$.

Le dimensioni delle ooteche, naturali ed ottenute in condizioni sperimentali, oscillano tra mm 6,5 e mm 13,5; la maggioranza misura però mm 10-11,5. La temperatura di allevamento non influisce sulle dimensioni delle ooteche, mentre influisce l'ordine di deposizione: le ultime ooteche tendono a divenire sempre più piccole.

Il periodo di incubazione varia in funzione della temperatura, oscillando tra gli estremi di gg. $40,79 \pm 0,32$ a 30° e gg. $65,24 \pm 0,90$ a 22° .

Il numero delle larve schiuse da una ooteca ha oscillato tra 6 e 17; esso appare in buon accordo con le dimensioni dell'ooteca stessa, pur essendo presenti notevoli variazioni nella produzione di ooteche di una stessa dimensione.

Lo studio dello sviluppo postembrionale ha permesso di confermare che esso è più rapido negli allevamenti numerosi, e che i maschi maturano, in linea di massima, prima delle femmine. Nei confronti della temperatura di allevamento la durata dello sviluppo ha presentato piccole differenze tra 30° e $22^\circ-24^\circ$ soltanto negli allevamenti numerosi. Decisamente più lungo è risultato invece il periodo di sviluppo ad una temperatura ambiente con oscillazioni tra 15° e 26° .

I valori del rapporto tra i sessi, tra soggetti allevati a 30° e a $22^\circ-24^\circ$, non risultano statisticamente differenti dal rapporto teorico 1:1.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) RICCI M. - Riv. Parassitol., 11, 219 (1950).
- (²) GOULD G. E., DEAY H. O. - Purdue Univ. Agr. Exptl. Stat., Bull. 451 (1940).
- (³) LAING F. - British Mus. (Nat. Hist.), Econ. Ser., n. 12 (1946).
- (⁴) WILLIS E. R., RISER G. R., ROTH L. M. - Ann. Ent. Soc. Am., 51, 53 (1958).
- (⁵) ROTH L. M., WILLIS E. R. - Smithsonian Misc. Coll., 122 (12) (1954).
- (⁶) ZABINSKI J. - J. Exptl. Biol., 6, 360 (1929).
- (⁷) RAU P. - Trans. Acad. Sci. St. Luis, 25, 57 (1924).
- (⁸) CROS A. - Eos, 18, 45 (1942); GOULD G. E. - Proc. Ind. Acad. Sci., 50, 242 (1941).
- (⁹) QADRI A. M. H. - Bull. Ent. Res., 29, 263 (1938).
- (¹⁰) LANDOWSKI J. - Compt. Rend. Soc. Sci. Lettres, Varsovie, Cl. IV, 30, 190 (1937).

Sintesi nella serie dell'1,5-difenil-bispidin-9-one

Nota VII. — 1,5-difenil-3,7-dialchil-bispidoni. Derivati sostituiti simmetrici. (*)

STEFANO CHIAVARELLI, FEDERICO TÖFFLER (**), RODOLFO LANDI VITTORY
e PIETRO MAZZEO (***)

Laboratori di Chimica terapeutica

Riassunto. — Viene descritta la sintesi di una serie di 1,5-difenil-3,7-dialchil-bispidin-9-oni (formula I) sostituiti simmetricamente in posizione 3 e 7, ottenuti con la reazione di Mannich a partire da alchilaminoacetati primari alifatici ed aliciclici.

Questi prodotti ci hanno consentito di studiare come varia l'attività farmacologica in funzione della lunghezza delle catene alchiliche in posizione 3 e 7.

Summary. — This paper describes the synthesis of a series of 1,5-diphenyl-3,7-dialkyl-bispidin-9-ones (I) symmetrically substituted in positions 3 and 7. These compounds were obtained through the Mannich reaction from the corresponding aliphatic and alicyclic primary aminoacetates. The synthesis of these compounds permits to study their pharmacological activity as a function of the chain length of the substituents in positions 3 and 7.

In precedenti lavori (¹⁻⁵) sono state riportate le sintesi di alcuni derivati dell'1,5-difenil-bispidin-9-one, eseguite secondo il metodo generale di ZU-YOONG-KYI e W. WILSON (⁶). Con questo procedimento si ottengono gli 1,5-difenil-bispidin-9-oni-3,7-bisostituiti (formula I), scaldando a ricadere, per alcune ore, in soluzione alcolica, un 1,3-diaril-2-propanone con paraformaldeide in presenza di alchilaminoacetati primari nei rapporti stechiometrici 1:4:2.

Con le sintesi degli 1,5-difenil-3,7-dialchil-bispidin-9-oni (formula I), simmetricamente bisostituiti, in precedenza realizzate, era stata messa a

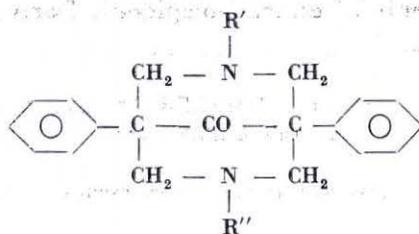
(*) Questo lavoro è apparso in *Gazz. Chim. Ital.*, 94, 1021 (1964).

(**) Borsista dei Laboratori di Chimica biologica.

(***) Istituto di Chimica Farmaceutica dell'Università di Roma.

punto la reazione di Mannich effettuata con alchilamminoacetati alifatici a catena alchilica con un numero di atomi di carbonio inferiore a 5.

Per estendere la nostra conoscenza nel campo di queste condensazioni abbiamo fatto reagire delle alchilammine primarie a catena alchilica più lunga, in modo da ottenere nuovi 1,5-difenil-3,7-dialchil-bispidin-9-oni:



(I)

dove $\text{R}' = \text{R}'' =$ alchili, cicloalchili, fenili.

Nella sintesi abbiamo seguito il metodo generale di ZU-YOONG-KYI e W. WILSON (6), già noto, e abbiamo studiato la reazione di Mannich con amminoacetati aliciclici, primari o alifatici a catene lineari o ramificate con un numero di atomi di carbonio compreso tra 5 e 18. A questo scopo abbiamo usato alchilamminoacetati primari con radicali alchilici di 5, 7, 8, 10, 17 e 18 atomi di carbonio. In tutti i casi abbiamo ottenuto i prodotti desiderati bisostituiti simmetrici degli 1,5-difenil-3,7-dialchil-bispidin-9-oni (formula I) con tempi di reazione legati proporzionalmente agli alchili.

Tentativi di sintetizzare l'1, 3, 5, 7-tetrafenil-bispidin-9-one (formula I dove $\text{R}' = \text{R}'' =$ fenile), condensando l'anilina, nelle medesime condizioni, hanno portato sempre alla formazione di polimeri a causa dei due idrogeni attivi in posizione orto, presenti nella molecola dell'anilina, che offrono diverse possibilità di condensazione.

I prodotti sintetizzati e le caratteristiche chimico-fisiche sono riportate nella Tabella 1.

Gli spettri di assorbimento I. R. e quelli R. M. N. dei nuovi composti convalidano la struttura attribuita alla formula I, in quanto presentano le bande caratteristiche dei bispidoni.

Gli spettri I. R. sono stati eseguiti con un apparecchio a doppio raggio Perkin-Elmer mod. 21 dal Sig. FERNANDO PONTI che qui ringraziamo.

Gli spettri R. M. N. sono stati registrati presso l'Istituto Chimico della Facoltà di Medicina dell'Università Cattolica del S. Cuore con un apparecchio « Varian A 60 » in deuterocloroformio o in tetracloruro di carbonio, dalla D.ssa M. L. SALVI a cui siamo grati.

Nella sintesi di questa nuova serie di composti il nostro interesse era principalmente rivolto allo studio delle proprietà farmacologiche, al fine di mettere in evidenza quale fosse l'influenza sull'attività variando la lunghezza delle catene alchiliche in posizione 3 e 7.

CHIAVARELLI e coll. (1,3) hanno già dimostrato che alcuni bispidoni simmetrici ed in particolare l'1,5-difenil-3,7-dimetil-bispidin-9-one, mostrano una spiccata attività analettica sull'animale da esperimento.

P. B. MARSHALL, NAZEER-UD DIN AHMED e R. E. WESTON (7) sperimentando altri bispidoni, simmetricamente sostituiti in posizione 3 e 7, hanno messo in evidenza un'attività anestetica e spasmolitica.

Poichè la solubilità dei prodotti sintetizzati diminuisce con l'aumentare della lunghezza delle catene alchiliche, rendendo i composti praticamente insolubili, per eseguire le prove farmacologiche, è stato necessario ricorrere all'ausilio di sostanze solubilizzanti (Tween e Span).

Nessuno dei prodotti esaminati ha dimostrato in generale di possedere un'attività farmacologica ben definita, che, se presente nei primi termini, scompare completamente con l'allungarsi delle catene alchiliche in posizione 3 e 7.

PARTE SPERIMENTALE

1,5-Difenil-3,7-dieptil-bispidin-9-one (3125 I. S.).

Grammi 12,6 (0,06 moli) di 1,3-difenil-acetone, g 7,2 (0,24 moli) di paraformaldeide e g 21 (0,12 moli) di epitilamminoacetato, in 100 ml di metanolo, si bollono a ricadere su b. m. per 17 ore. Dopo raffreddamento, la soluzione si diluisce con 100 ml di acqua (pH 6) e si alcalinizza con 100 ml di una soluzione di carbonato sodico al 20 % sino a pH 8. L'olio separato si estrae con cloroformio e la soluzione organica si lava con acqua, si essicca su solfato sodico anidro e si evapora il solvente.

Si ottengono g 22,7 di un olio bruno, che trasformato in perclorato dà g 25,7 (73 % del teorico) di prodotto grezzo a p. f. 113-116°. Dopo cristallizzazione da metanolo abbiamo ottenuto g 16 di cristalli bianchi con un p. f. di 122-124°. Resa: 45 % del teorico.

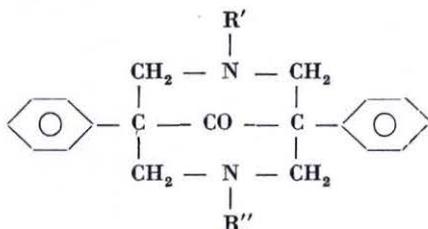
1,5-Difenil-3,7-diottil-bispidin-9-one (3126 I. S.).

Grammi 12,6 (0,06 moli) di 1,3-difenil-acetone, g 7,2 (0,24 moli) di paraformaldeide e g 22,7 (0,12 moli) di n-ottilamminoacetato si bollono a ricadere su b. m. per 17 ore in 100 ml di metanolo. La miscela di reazione si tratta come descritto per il 3125 I. S., ottenendo g 28,9 di un olio bruno che viene trasformato in perclorato. Resa: g 28,3 (77 % del teorico), p. f. 105-107°. Dopo cristallizzazione da metanolo si hanno g 18,8 (51 % del teorico), di cristalli bianchi a ciuffo con un p. f. 116-118°.

Numero	Formula bruta	Peso molecolare	R'	R''
3125 I. S.	$C_{33}H_{48}N_2O.HClO_4$	589,2	$-C_7H_{15}$	$-C_7H_{15}$
3126 I. S.	$C_{35}H_{52}N_2O.HClO_4$	617,3	$-C_8H_{17}$	$-C_8H_{17}$
3127 I. S.	$C_{35}H_{52}N_2O$	516,8	$ \begin{array}{c} H_3C-CH-(CH_2)_5-CH_3 \\ \\ \text{---} \end{array} $	$ \begin{array}{c} H_3C-CH-(CH_2)_5-CH_3 \\ \\ \text{---} \end{array} $
3128 I. S.	$C_{39}H_{60}N_2O.HClO_4$	673,4	$-C_{10}H_{21}$	$-C_{10}H_{21}$
3129 I. S.	$C_{53}H_{88}N_2O$	769,3	$-C_{17}H_{35}$	$-C_{17}H_{35}$
3130 I. S.	$C_{55}H_{92}N_2O$	797,3	$-C_{18}H_{37}$	$-C_{18}H_{37}$
3131 I. S.	$C_{29}H_{36}N_2O$	428,6	$ \begin{array}{c} \text{---}CH \\ \diagup \quad \diagdown \\ CH_2-CH_2 \quad \quad CH_2-CH_2 \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{---}CH \\ \diagup \quad \diagdown \\ CH_2-CH_2 \quad \quad CH_2-CH_2 \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} $

TABELLA I

(Formula I)



Cristallizzato da	Resa % d. T.	Pf. (+)	I. R. νCO cm. ⁻¹	Analisi							
				Calcolato %				Trovato %			
				C	H	N	Cl	C	H	N	Cl
MeOH	45	122-4°	1743	67,26	8,38	4,76	6,02	67,14	8,10	4,82	6,27
MeOH	51	116-8°	1738	68,10	8,65	4,54	5,74	68,08	8,55	4,56	5,81
MeOH	58	89-91°	1724	81,34	10,14	5,42	—	81,58	10,20	5,46	—
MeOH	38	126-8°	1739	69,56	9,13	4,16	5,27	69,76	9,25	4,18	5,38
EtOH ass.	69	67-8°	1720	82,75	11,53	3,64	—	82,73	11,42	3,60	—
EtOH ass.	56	56-8°	1725	82,85	11,63	3,51	—	83,08	11,42	3,54	—
n-PrOH	62	156-8°	1728	81,26	8,47	6,54	—	81,26	8,50	6,51	—

(+) Punti di fusione non corretti.

1,5-Difenil-3,7-di-(1'-metil-eptil)-bispidin-9-one (3127 I. S.).

Su b. m. si bollono a ricadere per 44 ore g 6,3 (0,03 moli) di 1,3-difenil-acetone, g 3,6 (0,12 moli) di paraformaldeide e g 11,35 (0,06 moli) di 1-metil-eptil-amminoacetato in 50 ml di metanolo. Dopo raffreddamento, la miscela di reazione viene diluita con 100 ml di acqua e alcalinizzata con una soluzione di carbonato sodico al 20 % sino a pH 8. L'olio separatosi cristallizza dopo numerosi lavaggi con acqua dando g 14,8 di prodotto grezzo (96 % del teorico) a p. f. 75-80°.

Dopo due cristallizzazioni da metanolo si ottengono g 9 di prismi bianchi a p. f. 89-91° (58 % del teorico).

1,5-Difenil-3,7-didecil-bispidin-9-one (3128 I. S.).

Grammi 12,6 (0,06 moli) di 1,3-difenil-acetone, g 7,2 (0,24 moli), di paraformaldeide e g 26 (0,12 moli) di decilamminoacetato in 100 ml di metanolo si bollono a ricadere su b. m. per 16 ore.

La miscela di reazione, trattata come descritto per il 3125 I. S. dà g 33,4 di prodotto grezzo, come un olio bruno, che è stato trasformato in perclorato. Resa: g 21,5 (53 % del teorico), p. f. 118-122°. Dopo due cristallizzazioni da metanolo si hanno g 15,5 di cristalli bianchi a ciuffo; p. f. 126-128°; resa: 38 % del teorico.

1,5-Difenil-3,7-dieptadecil-bispidin-9-one (3129 I. S.).

Grammi 6,3 (0,03 moli) di 1,3-difenil-acetone, g 3,6 (0,12 moli) di paraformaldeide e g 18,9 (0,06 moli) di eptadecilamminoacetato, si bollono a ricadere su b. m. in 50 ml di metanolo per 57 ore.

Per trattamento analogo al 3127 I. S. si ottengono g 21,3 di prodotto grezzo (93 % del teorico) a p. f. 59-62°. Dopo tre cristallizzazioni da etanolo assoluto restano g 16 (69 % del teorico) di cristalli bianchi a p. f. 67-68°.

1,5-Difenil-3,7-diottadecil-bispidin-9-one (3130 I. S.).

Una soluzione di g 6,3 (0,03 moli) di 1,3-difenil-acetone, g 3,6 (0,12 moli) di paraformaldeide e g 19,7 (0,06 moli) di ottadecilamminoacetato in 50 ml di metanolo si riscaldano a ricadere per 59 ore. Per trattamento analogo al 3127 I. S. si ottengono g 23,2 (97 % del teorico) di prodotto grezzo a p. f. 45-49°. Dopo tre cristallizzazioni da etanolo assoluto con carbone animale risultano g 13,5 (56 % del teorico) di cristalli bianchi a p. f. 56-58°.

1,5-Difenil-3,7-diciclopentil-bispidin-9-one (3131 I. S.).

Grammi 12,6 (0,06 moli) di 1,3-difenil-acetone, g 7,2 (0,24 moli) di paraformaldeide e g 17,4 (0,12 moli) di ciclopentilamminoacetato si bollono a ricadere in 100 ml di metanolo su b. m. per 36 ore. Si tratta poi come per il

3127 I. S. Resa: g 25 di prodotto grezzo a p. f. 130-143° (97 % del teorico). Dopo tre cristallizzazioni da n-propanolo con carbone animale si hanno g 16 di cristalli bianchi (62 % del teorico) a p. f. 156-8°.

Ringraziamo la Prof.ssa M. MARZADRO per le microanalisi.

BIBLIOGRAFIA

- (1) CHIAVARELLI S., SETTIMJ G. e MACALHÃES ALVES H. - *Gazz. Chim. Ital.*, 87, 109 (1957).
- (2) CHIAVARELLI S. e SETTIMJ G. - *Gazz. Chim. Ital.*, 88, 1234 (1958).
- (3) CHIAVARELLI S. e SETTIMJ G. - *Gazz. Chim. Ital.* 88, 1246 (1958).
- (4) CHIAVARELLI S. e SETTIMJ G. - *Gazz. Chim. Ital.*, 88, 1253 (1958).
- (5) CHIAVARELLI S. e SETTIMJ G. - *Farmaco Ed. Sci.*, 16, 313 (1961).
- (6) ZU-YOONG-KYI e WILSON W. - *J. Chem. Soc.*, 1706 (1951).
- (7) MARSHALL P. B., NAZEER-UD DIN AHMED e WESTON E. - *Brit. J. Pharmacol.*, 7, 85 (1952).

Contributo alla conoscenza della dissociazione acida della vitamina B₁₂ (*)

GUIDO BELLOMONTE e ENRICO CINGOLANI

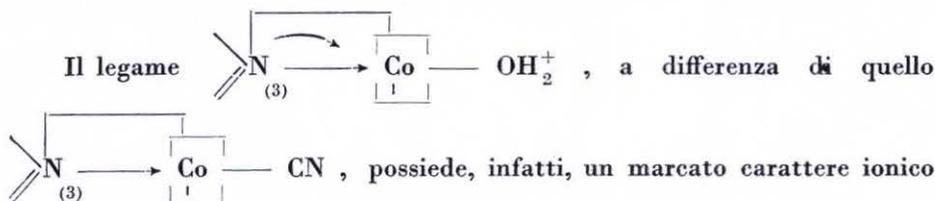
Laboratori di Biologia

Riassunto. — Gli AA. svolgono alcune considerazioni sulla dissociazione acida della cianocobalamina (5,6-dimetilbenzimidazolilcobamide cianuro o vitamina B₁₂) che dovrebbe avvenire secondo lo schema: cianocobalamina \rightleftharpoons monocianomonoaquocobalamina, anzichè: cianocobalamina \rightleftharpoons aquocobalamina \rightleftharpoons diaquocobalamina.

Summary. — The acidic dissociation of cyanocobalamin (5,6-dimethylbenzimidazolylcobamide cyanide or vitamin B₁₂) is discussed. The reaction: cyanocobalamin \rightleftharpoons monocyanomonoaquocobalamin, should be more reasonable than: cyanocobalamin \rightleftharpoons aquocobalamin \rightleftharpoons diaquocobalamin.

Come già è noto e come anche noi abbiamo messo in evidenza recentemente (1, 2), fra le diverse cobalamine, e fra queste e i coenzimi corrispondenti, esistono delle differenze sostanziali per quanto riguarda la forza del legame coordinato fra l'N₍₃₎ del nucleotide 5,6-dimetilbenzimidazolico e l'atomo di cobalto della struttura corrinoidale e tali differenze possono essere facilmente evidenziate con metodo spettrofotometrico.

Il cromoforo benzimidazolico, che ha un massimo di assorbimento a circa 284 mμ, si evidenzia di più nella vitamina B₁₂ (5,6-dimetilbenzimidazolilcobamide cianuro o cianocobalamina), III, che non nell'aquocobalamina (5,6-dimetilbenzimidazolilcobamide), I, e ciò perchè nella prima la forza del suddetto legame coordinato è più debole che non nella seconda.

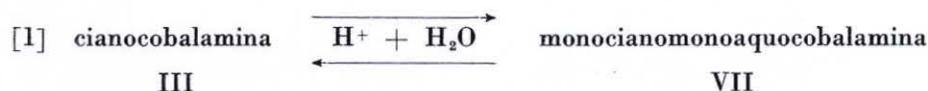


(*) Questo lavoro è apparso in *Farmaco, Ed. sci.* 19, 1066 (1964).

che viene compensato dallo spostamento elettronico dall' $N_{(3)}$ benzimidazolico verso il cobalto; ne consegue una maggiore stabilità e un contributo anomalo all'assorbimento delle cobalamine in questa zona dell'U.V. (1, 2, 3). Qualsiasi aumento della elettronegatività del cobalto, indotto da sostituenti anionici come nel caso delle cobalamine « acide » (dicianocobalamina o 5,6-dimetilbenzimidazolilcobamide dicianuro, VI, e solfitocobalamina o 5,6-dimetilbenzimidazolilcobamide solfito, IV), si riflette in senso inverso sul contributo elettronico dell' $N_{(3)}$ benzimidazolico causando un indebolimento del legame coordinato (3, 4). In queste cobalamine, infatti, può evidenziarsi, già in semplice soluzione acquosa, l'assorbimento caratteristico del nucleotide 5,6-dimetilbenzimidazolico.

A concentrazioni idrogenioniche elevate lo spettro di assorbimento della Vitamina B_{12} si modifica in senso ipsocromo, specialmente nelle lunghezze d'onda più elevate (3, 6) e per idrolisi in acidi concentrati la cianocobalamina si decompone liberando la frazione nucleotidica e formando il fattore B (monocianomonoaquocobinamide) (5).

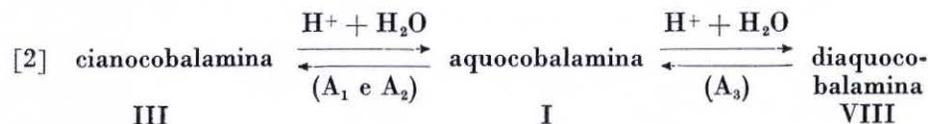
Nel caso della cianocobalamine, cioè, il legame coordinato non è poi così forte da non essere aperto per competizione con H^+ dando luogo a una struttura protonizzata, VII:



così come avviene, in soluzione acida relativamente debole ($pH \approx 3,5$),

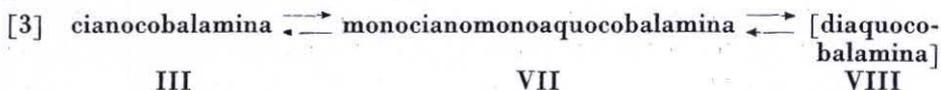
per i coenzimi cobamidici (7), per le cobalamine $\begin{array}{c} \boxed{\text{Co}} \\ | \\ \boxed{\text{I}} \end{array} - \text{CH}_2 - \text{R}$ sostituite (8) e per la solfitocobalamina ($IV \rightarrow V$) (2).

Secondo GEORGE P. e coll. (6) la dissociazione della cianocobalamina avverrebbe secondo lo schema (A):



La forma protonizzata stabile sarebbe quindi quella « diaquo » formandosi dapprima l'aquocobalamina, I, per una reazione di sostituzione del $-CN$ con $-H_2O^+$, e quindi la diaquocobalamina, VIII, di struttura analoga al diaquofattore o diaquocobinamide, ottenibile dal Fattore B (8) e dalla dicianocobinamide (9).

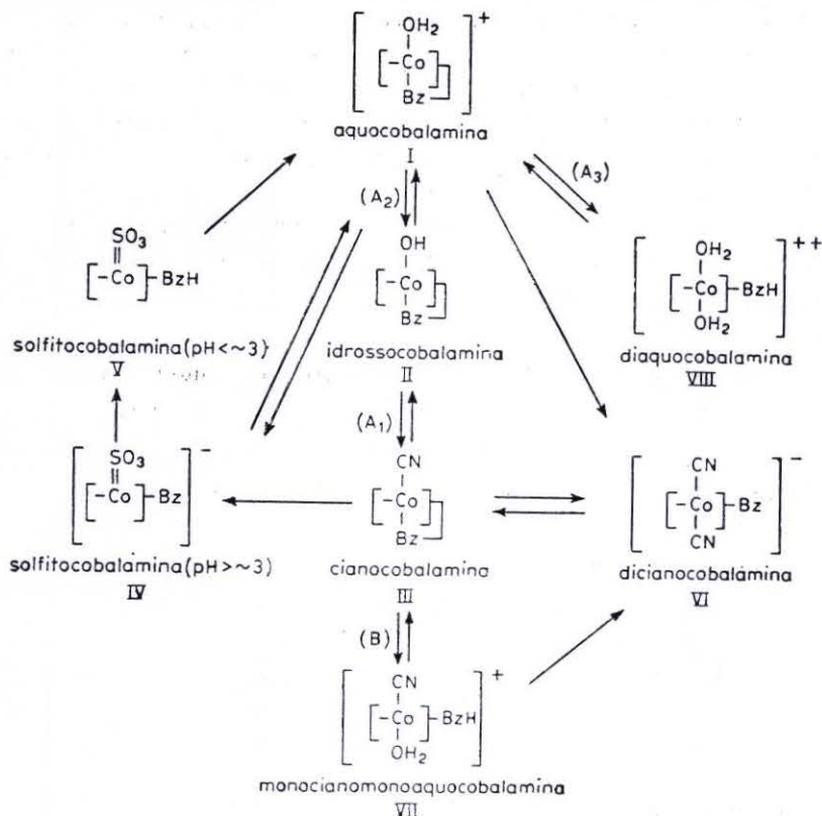
A nostro avviso, invece, la dissociazione della vitamina B₁₂ dovrebbe procedere secondo lo schema (B):



con formazione cioè della monocianomonoaquocobalamina, VII.

Questa affermazione è confermata dalle considerazioni seguenti:

a) La sostituzione di -CN con -H₂O⁺ avviene in ambiente acido, solo però per fotolisi aerobica (10). La soluzione acida di cianocobalamina non



modifica il proprio spettro di assorbimento neanche dopo parecchi giorni, se viene conservata al buio (10). L'aquocobalamina, cioè, si forma dalla cianocobalamina in ambiente acido solo con l'intervento della luce (*).

(*) Per analogia con i coenzimi cobamidici (11) e con le cobalamine Co-CH₂-R sostituite (8) per fotolisi anaerobica della cianocobalamina dovrebbe formarsi la B_{12r} con il Co²⁺.

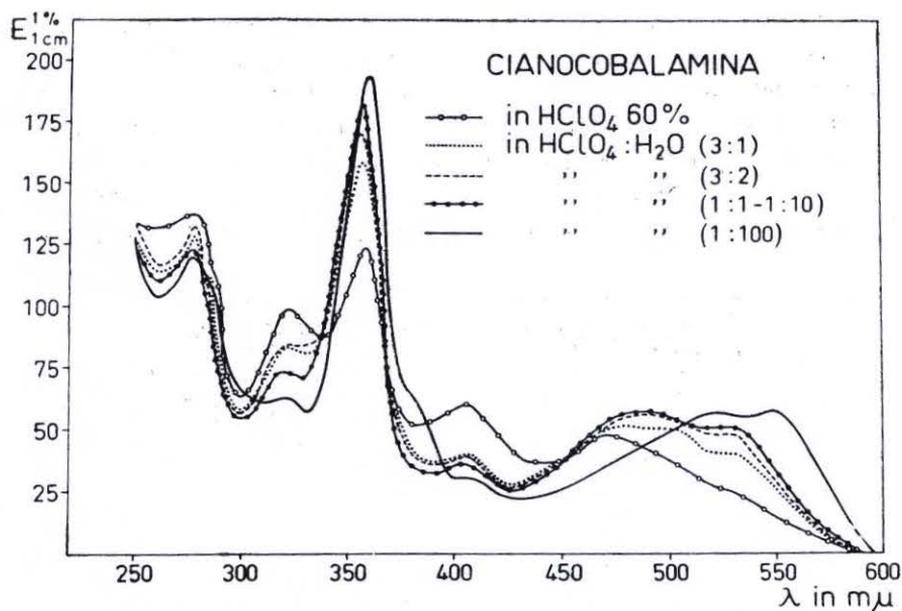


Fig. 1. — Spettri di assorbimento della cianocobalamina in HClO_4 (60%) e in HClO_4 (60%) - H_2O .

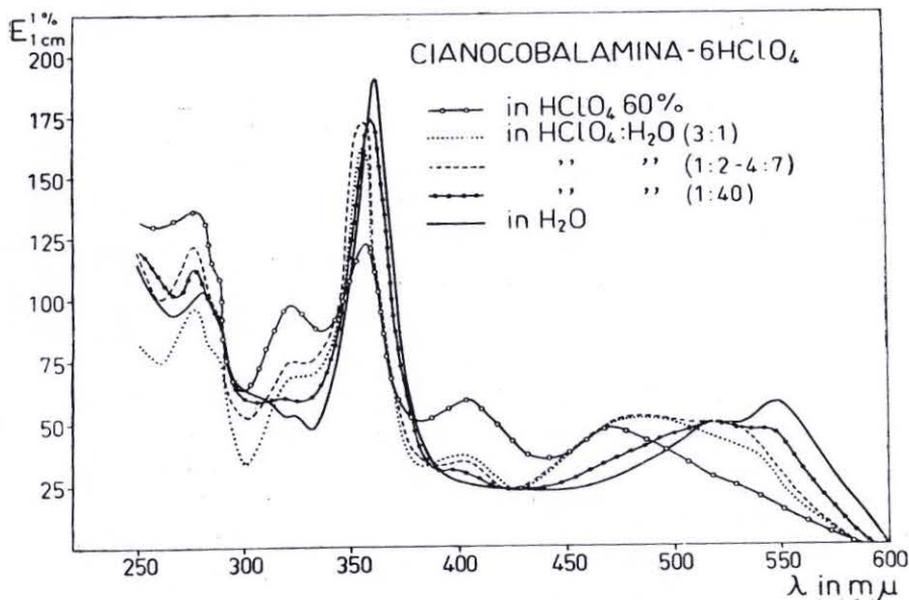


Fig. 2. — Spettri di assorbimento dell'esaperclorato della cianocobalamina in HClO_4 (60%), in HClO_4 (60%) - H_2O e in H_2O .

b) La dissociazione della cianocobalamina, o meglio la protonizzazione del nucleotide benzimidazolico, non è completa a $\text{pH} = 2$ (massima acidità raggiunta dagli AA. citati) e lo spettro di assorbimento della soluzione di vitamina B_{12} si modifica ancora sostanzialmente con l'aumentare della attività idrogenionica. La soluzione della cianocobalamina in HClO_4 al 60% e quella del suo esaperclorato nello stesso acido, sono gialle ed hanno lo spettro caratteristico delle cobalamine « gialle » (fig. 1 e 2 e tabella 1) con evi-

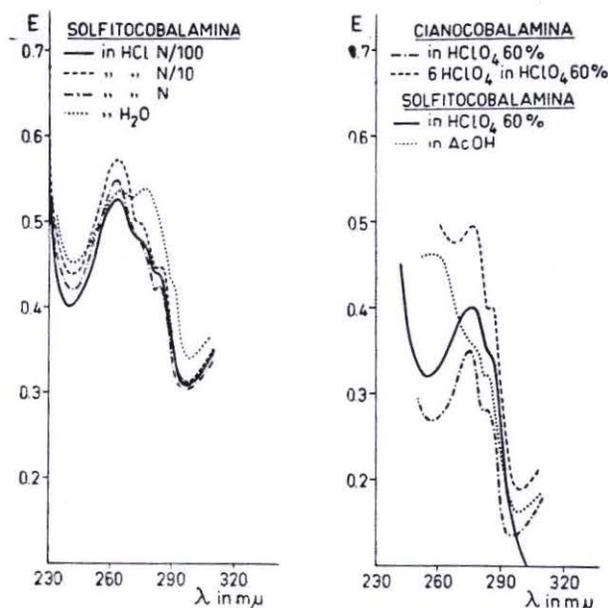


Fig. 3. — Spettri di assorbimento nell'U.V. (230-320 $\text{m}\mu$) della solfitocobalamina in H_2O , HCl , HClO_4 (60%) e in acido acetico glaciale e della cianocobalamina in HClO_4 (60%).

dente risoluzione della banda caratteristica del nucleotide 5,6-dimetilbenzimidazolico (fig. 3). Solo in queste condizioni, quindi, la dissociazione è completa con la protonizzazione del nucleotide benzimidazolico successiva al suo distacco dalla coordinazione con il Co [similitudine con gli spettri acidi dei coenzimi B_{12} (?) e della solfitocobalamina (?)]. Aumentando l'acqua, diminuendo quindi la concentrazione di HClO_4 , lo spettro di assorbimento gradatamente riassume le caratteristiche di quello della soluzione acquosa di cianocobalamina e a nessuna diluizione questo è riferibile a quello dell'aquobalamina in eguali condizioni (fig. 4). È pur vero che in HClO_4 avviene la

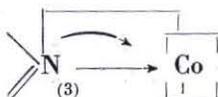
TABELLA I

Caratteristiche spettrofotometriche delle cobalamine.

COMPOSTI	SOLVENTI	MASSIMI DI ASSORBIMENTO (λ in m μ)								
		E_{410}	$E_{520} = 540$							
Cianocobalamina	H ₂ O	0,41	275	(290)	(305)	(323)	361	(405)	(520)	548
	HCl N/10	0,49	275	(290)	(310)	(323)	361	(405)	(520)	548
	AcOH gl.	0,42	277		(310)	324	361	(405)	(520)	548
	HClO ₄ 60 %	3,00	277	284		322	357	405	470	(525)
	HClO ₄ 60 % Ip									
	H ₂ O 100p	0,3	277	(285)	(310)	324	360	(405)	(520)	548
Cianocobalamina esaperclorato	HClO ₄ 60 %	2,5	277	284		322	357	405	470	(525)
	H ₂ O	0,45	275	(290)	(305)	(324)	361	(405)	(520)	550
Aquocobalamina	H ₂ O	0,44	275		(307)		351	(410)	(495)	525
	NaOH N/10	0,45	(275)				363	410		537
	HClO ₄ 60 %	0,66	275	(287)			353	410	(495)	525
	HClO ₄ 60 % Ip									
	H ₂ O Ip	0,41	275				351	(410)	(495)	525
Solfitocobalamina	H ₂ O	0,54	(263)	(275)	311		364	415	515	(540)
	HCl N/1000	0,66								
	» N/100	1,82	263	(280-290)	315		350	410	(500)	
	» N/10	3,78	263	285	320		350	410	(460)	
	» N	2,25 *	260	(280)			350	414	465	
	AcOH gl.	3,10	258	284	317		353	415	(450)	

* = In HCl N la solfitocobalamina è già in parte decomposta ad aquocobalamina.

salificazione dei sei gruppi ammidici ($-\text{CONH}_2$) ⁽¹²⁾, ma questa dissociazione ha come conseguenza lo spostamento ipocromico dei valori di E, non quello ipsocromo così pronunciato della λ .

c) Nell'aquocobalamina il legame  è talmente

forte che non viene indebolito neanche con HClO_4 : lo spettro di assorbimento dell'aquocobalamina e del suo esaperclorato in HClO_4 al 60% ha le stesse caratteristiche spettrofotometriche di quello della soluzione acquosa e a nessuna diluizione o concentrazione idrogenionica si evidenzia in esso lo spostamento ipsocromo e la risoluzione della banda caratteristica del nucleotide 5,6-dimetilbenzimidazolico (fig. 4). Le uniche variazioni in senso

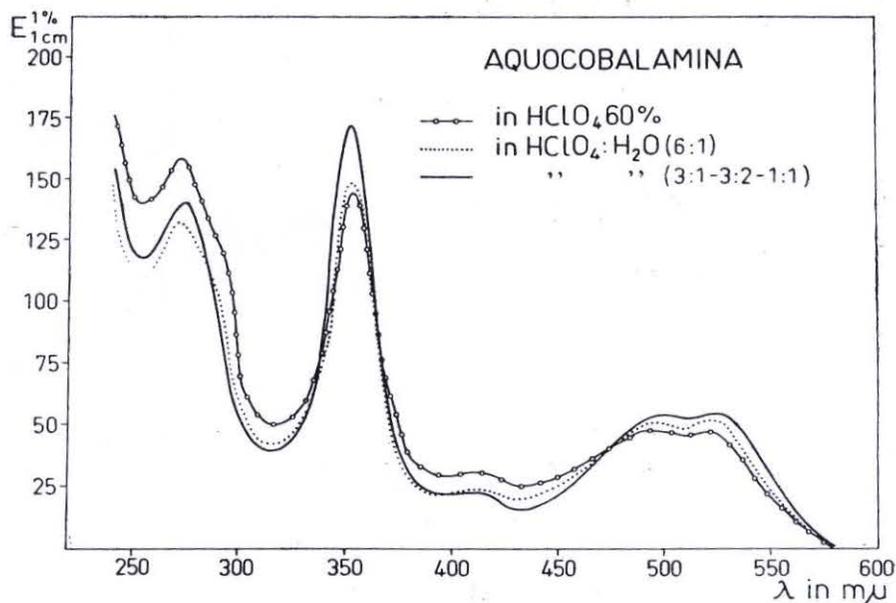


Fig. 4. — Spettri di assorbimento dell'aquocobalamina in HClO_4 (60%) e in HClO_4 (60%) - H_2O .

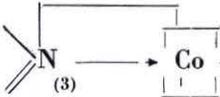
ipocromo sono da attribuirsi alla protonizzazione dei sei $-\text{CONH}_2$ con formazione dell'esaperclorato. Questi risultati escludono che nella dissociazione della cianocobalamina possa formarsi come intermediario l'aquocobalamina, I, e mettono in dubbio anche la trasformazione dell'aquocobalamina in diaquocobalamina, VIII, cioè la seconda fase della reazione di dissociazione (A_3 : ved. [3]).

d) Le caratteristiche spettrofotometriche dell'aquocobalamina sono oramai ben definite e confermate anche da noi su prodotti cromatograficamente puri. In tutte le cobalamine la posizione dei massimi di assorbimento è critica: spostamenti anche di 1,5 - 2 $m\mu$ di quello situato a 350 - 360 $m\mu$ (351 per l'aquocobalamina e 361 per la cianocobalamina), indicano la presenza di altre cobalamine e di altre impurezze (^{1, 13}). Gli spettri di assorbimento della ciano- e dell'aquo-cobalamina sono così sostanzialmente diversi che se, in qualunque stadio della dissociazione acida della vitamina B₁₂, dovesse formarsi l'aquocobalamina, le caratteristiche spettrofotometriche della soluzione dovrebbero rivelarlo senza possibilità di dubbi. Non abbiamo mai potuto confermare, neanche con prodotti cromatograficamente puri di aquocobalamina, l'affermazione secondo la quale questa dovrebbe avere, specialmente in soluzioni di acidità superiore a quella dell'HCl 0,15 M, uno spettro di assorbimento con le bande principali a λ all'incirca eguali a quelle della cianocobalamina nelle medesime condizioni, differenziandosi solo per piccoli spostamenti dei valori di estinzione. Nel caso delle due cobalamine suddette la sostituzione $-\text{CN} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}^+$ modifica sostanzialmente lo spettro di assorbimento (¹). Una soluzione che ha i massimi di assorbimento situati a 360, 520 e 550 $m\mu$ è costituita da cianocobalamina e non da aquocobalamina (massimi di assorbimento a 351 e 525 $m\mu$) (tabella 1). È inesatto affermare che le caratteristiche spettrofotometriche dell'aquocobalamina riportate in letteratura si riferiscono a prodotti impuri per composti con il nucleotide staccato dal cobalto (in questo caso dovrebbe essere rivelabile nell'U.V. almeno una parziale risoluzione della banda caratteristica del 5,6-dimetilbenzimidazolo-1-sostituito) o per altri nei quali la quinta e la sesta (*trans*) posizione di coordinazione del complesso ottaedrico sono occupate

da sostituenti diversi da $-\text{OH}_2^+$ o da $\text{N}_{(3)} \longrightarrow$.

Abbiamo inoltre confermato che l'aggiunta di cianuro alla soluzione neutra di aquocobalamina forma *istantaneamente* e quantitativamente, specialmente al buio, la cianocobalamina [v. (¹⁰)].

È da escludere, pertanto, che la dissociazione della cianocobalamina, III, avvenga secondo lo schema $\text{A} \rightleftharpoons \text{A}_2 \rightleftharpoons \text{A}_3$ (v. [2]) in cui come intermediario si forma l'aquocobalamina, I: non vi sono dati sperimentali sufficienti per poter affermare questo e le ragioni apportate dagli AA. americani per provarlo sono facilmente criticabili. Le esperienze da noi finora eseguite indicano, invece, che la dissociazione avviene secondo lo schema (B) (v. [3]) con formazione cioè della monocianomonoaquocobalamina, VII, e che non si può dimostrare la successiva formazione della diaquocobalamina, VIII, mentre al contrario sembra dimostrato che nell'aquocobalamina la protonizzazione del nucleotide benzimidazolico, successiva alla apertura del le-

game coordinato  , indispensabile per spiegare la formazione della diaquocobalamina, VIII, dall'aquocobalamina, I, (A₃) (v. [2]) non avvenga.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) CARDINI C., CAVINA G., CINGOLANI E., MARIANI A. e VICARI C. - *Farmaco (Ed. Pr.)* 17, 583 (1962).
- (²) BELLOMONTE G. e CINGOLANI E. - *Rend. Ist. Super. Sanità*, 26, 1050 (1963).
- (³) BEAVEN G. H., HOLIDAY E. R., JOHNSON E. A., ELLIS B. e PETROW V., - *J. Pharm. Pharmacol.*, 2, 944 (1950).
- (⁴) COOLEY G., ELLIS B., PETROW V., BEAVEN G. H., HOLIDAY E. R. e JOHNSON E. A. - *J. Pharm. Pharmacol.*, 3, 217 (1951).
- (⁵) ARMITAGE J. B., CANNON J. R., JOHNSON A. W., PARKER L. F. J., SMITH E. LESTER, STAFFORD W. H. e TODD A. R. - *J. Chem. Soc.*, 3849 (1953).
- (⁶) GEORGE P., IRVINE D. H. e GLAUSER S. C., - *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 88, 393 (1960).
- (⁷) LADD J. N., HOGENKAMP H. P. C. e BARKER H. A., - *J. Biol. Chem.*, 236, 2114 (1961).
- (⁸) BERNHAUER K. e MÜLLER O. - *Biochem. Z.*, 333, 481 (1961).
- (⁹) BERNHAUER K., RENZ P. e WAGNER F. - *Ibidem*, 335, 443 (1962).
- (¹⁰) VEER W. L. C., EDELHAUSEN J. H., WIJMENGA H. G., LENS J. - *Biochem. Biophys. Acta*, 6, 225 (1950); WIJMENGA H. G., VEER W. L. C. e LENS J. - *Ibidem*, 6, 229 (1950).
- (¹¹) BRADY R. O., BARKER H. A. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 4, 373 (1961); BERNHAUER K., MÜLLER O. - *Biochem. Z.*, 334, 199 (1961); 335, 441 (1962); MÜLLER O., MÜLLER G., *ibidem*, 335, 340 (1962).
- (¹²) ALICINO J. F. - *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 4051 (1951).
- (¹³) ROLOVICH J., FABRIZIO G. e CASILLI L. - *Farmaco (Ed. Pr.)*, 17, 553 (1962).