

## Sintesi di prodotti di riduzione della ferroverdina

SALVATORE BARCELLONA

*Laboratori di Chimica Biologica, Centro Internazionale di Chimica Microbiologica*

**Riassunto.** — È descritta la sintesi dei seguenti prodotti: 3-ammino-4-ossibenzoato di p-etilfenile; 3-acetammino-4-ossibenzoato di p-etilfenile; acido 3-acetammido-4-acetossibenzoico e acetil derivati del 3-ammino-4-ossibenzoato di metile.

Questi prodotti sono serviti a confermare ulteriormente la struttura attribuita ai composti di riduzione della ferroverdina.

La ferroverdina è un pigmento verde, prodotto da uno streptomicete, a cui è stata attribuita la struttura di complesso ferroso del 3-nitroso-4-ossibenzoato di p-vinilfenile.

**Summary.** (*The synthesis of reduction products of ferroverdin*). — The synthesis of the following compounds is described: p-ethylphenyl 3-amino-4-oxybenzoate, p-ethylphenyl 3-acetamino-4-oxybenzoate, 3-acetamino-4-acetoxybenzoic acid and acetyl-derivatives of methyl 3-amino-4-oxybenzoate.

Some of these compounds have further confirmed the structures attributed to the reduction compounds of ferroverdin.

Ferroverdin, a green intracellular pigment produced by a streptomycete, was isolated by Chain, Tonolo and Carilli (CHAIN, TONOLO & CARILLI, 1955). The pigment has been found structurally to be a ferrous complex of p-vinylphenyl 3-nitrous-4-oxybenzoate (BALLIO *et al.*, 1963).

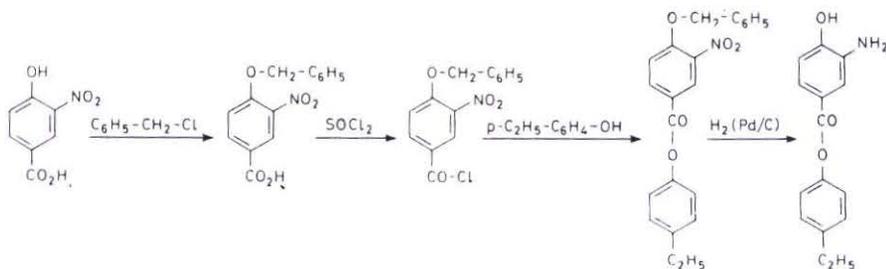
Synthesized p-ethylphenyl 3-amino-4-oxybenzoate has proved identical to the catalytic reduction product of ferroverdin; likewise synthesized p-ethylphenyl 3-acetamino-4-oxybenzoate has been found to be identical to the catalytic reduction product of p-vinylphenyl 3-acetamino-4-oxybenzoate obtained from ferroverdin through acetyl reduction of short duration at room temperature.

La ferroverdina è un pigmento verde intracellulare isolato da uno streptomicete (CHAIN, TONOLO & CARILLI, 1955); ad esso è stata attribuita la struttura di complesso ferroso del 3-nitroso-4-ossibenzoato di p-vinilfenile (BALLIO *et al.*, 1963). La definizione di tale costituzione risultò principalmente dallo studio dei prodotti di idrolisi alcalina e di riduzione. Tutti i derivati ottenuti furono identificati in modo inequivocabile attraverso determinazioni analitiche, misure chimico-fisiche ed in qualche caso mediante il confronto diretto con prodotti di sintesi. Era stata infatti descritta la sintesi del complesso ferroso dell'acido 3-nitroso-4-ossibenzoico, il quale si forma assieme al p-ossistirene nell'idrolisi alcalina della ferroverdina, e la sintesi del 3-diacetammido-4-acetossibenzoato di p-etilfenile, che si ottiene dalla ferroverdina per riduzione acetilante seguita da idrogenazione catalitica.

In questo lavoro vengono ora descritte le sintesi di alcuni prodotti la cui struttura conferma ulteriormente la costituzione precedentemente attribuita ai composti di riduzione della ferroverdina.

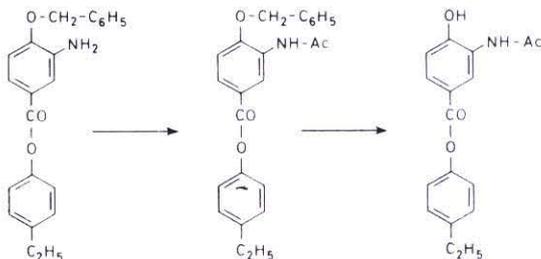
In particolare sono stati sintetizzati il 3-ammino-4-ossibenzoato di p-etilfenile, che in tutte le sue proprietà è risultato identico al prodotto di riduzione catalitica della ferroverdina, ed il 3-acetammido-4-ossibenzoato di p-etilfenile, a sua volta indistinguibile dal prodotto di riduzione catalitica del 3-acetammido-4-ossibenzoato di p-vinilfenile a suo tempo ottenuto dalla ferroverdina mediante riduzione acetilante di breve durata, a temperatura ambiente.

Il primo prodotto è stato preparato a partire dall'acido 3-nitro-4-ossibenzoico secondo lo schema seguente :



La riduzione catalitica del 3-nitro-4-benzilossibenzoato di p-etilfenile è stata completa in presenza di palladio su carbone, operando a 3 atmosfere e a temperatura ambiente, mentre usando nichel-Raney, o palladio su solfato di bario, a pressione ordinaria e a temperatura ambiente è stato ottenuto l'ammino derivato in cui ancora era presente il gruppo benzilossi. Il 3-ammino-4-benzilossibenzoato di p-etilfenile così preparato è servito invece

per la sintesi del 3-acetammino-4-ossibenzoato di p-etilfenile, secondo lo schema seguente :



Come si è detto, questo composto è risultato identico al prodotto di riduzione catalitica del monoacetilderivato del 3-ammino-4-ossibenzoato di p-vinilfenile, a suo tempo ottenuto dalla ferroverdina, e nel quale l'acetile era stato posto sul gruppo amminico in base alla reazione positiva con il cloruro ferrico e al tipo di spettro infrarosso. Lo stesso prodotto può ottenersi in modo più semplice, ma meno dimostrativo della sua struttura, trattando brevemente a temperatura ambiente e a pH 8 il triacetilderivato del 3-ammino-4-ossibenzoato di p-etilfenile precedentemente descritto.

Come modelli dei corrispondenti esteri del p-ossistirene ottenuti per riduzione acetilante della ferroverdina, sono stati preparati il 3-acetil, il 3,4-biacetil ed il 3,3,4-triacetilderivato del 3 ammino-4-ossibenzoato di metile. I loro spettri nell'infrarosso sono dello stesso tipo, per quanto riguarda la zona fra 3300 e 2000  $\text{cm}^{-1}$ , di quelli degli analoghi ottenuti per riduzione della ferroverdina. Le strutture precedentemente attribuite a questi ultimi ricevono così una ulteriore conferma. Durante quest'ultima parte del lavoro è stato osservato che, contrariamente all'estere metilico (e a quello p-etilfenilico), l'acido 3-ammino-4-ossibenzoico, anche se sottoposto ad acetilazione in condizioni molto drastiche, non dà mai luogo ad un triacetilderivato; si ottiene invece, sempre, anche operando in condizioni molto blande, un O,N-biacetilderivato, facilmente trasformabile per azione degli alcali diluiti nell'N-acetilderivato già descritto in letteratura.

#### PARTE SPERIMENTALE

##### *Sintesi del 3-ammino-4-ossibenzoato di p-etilfenile.*

1) *Acido 3-nitro-4-benzilossibenzoico.* — Ad una soluzione di acido 3-nitro 4-ossibenzoico (915 mg) in alcool etilico al 95 % (5 ml) e NaOH 2N (2,5 ml), si aggiunge cloruro di benzile (1,725 ml) e si lascia bollire a ricadere per due ore. Durante questo tempo si aggiungono a piccole porzioni altri 5

ml di NaOH 5N. La soluzione è poi distillata a metà volume, diluita con un pari volume di acqua e acidificata a pH 2 circa con HCl. I cristalli che si formano sono filtrati, lavati sul filtro con poco alcool etilico e ricristallizzati da alcool etilico in presenza di carbone. Si ottengono 850 mg di cristalli giallognoli che fondono a 190-194°C (\*). Il punto di fusione non cambia dopo due ricristallizzazioni da etanolo. Reazione negativa con cloruro ferrico.

Analisi elementare :	trovato	%	C : 61,40	H : 3,98	N : 5,38
per C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>5</sub>	calcolato	%	C : 61,53	H : 4,06	N : 5,13

Nell'infrarosso (\*\*) (KBr) si nota una larga banda tra 3050 e 2500 cm<sup>-1</sup> dovuta all'ossidrile del carbossile il cui idrogeno è impegnato in legami idrogeno intermolecolari e una banda a 1670 cm<sup>-1</sup> del gruppo carbonilico.

2) 3-Nitro 4-benzilossi-benzoil-cloruro. — In una provetta a collo smerigliato munita di refrigerante si fa bollire a ricadere per 1 ora l'acido 3-nitro 4-benzil-ossi-benzoico (300 mg) sospeso in cloruro di tionile (0,5 ml) contenente una goccia di piridina. L'eccesso di cloruro di tionile è eliminato per distillazione a pressione ridotta ed il residuo è sciolto in benzene e filtrato. Alla soluzione benzenica concentrata a pressione ridotta fino a piccolo volume si aggiunge goccia a goccia etere di petrolio fino ad incipiente intorbidimento. Il prodotto cristallizza lentamente e fonde a 110°C. Ricristallizzato da benzene-etere di petrolio il punto di fusione resta inalterato.

Analisi elementare :	trovato	%	Cl : 12,05
per C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>4</sub> Cl	calcolato	%	Cl : 12,15

Nell'infrarosso (KBr) si nota : assenza della banda dell'ossidrile ; spostamento da 1670 cm<sup>-1</sup> a 1750 cm<sup>-1</sup> della banda del carbonile in conseguenza della scomparsa dei legami idrogeno.

3) 3-Nitro-4-benzilossi-benzoato di *p*-etilfenile. — Ad una soluzione di 3-nitro-4-benzilossibenzoil-cloruro (145 mg) in benzene (5 ml) si aggiunge *p*-etilfenolo ridistillato (50 mg) e 4 gocce di piridina ; la soluzione si riscalda a 75° per 6 ore in una provetta a collo smerigliato munita di un tubo riempito di KOH in gocce. Si distilla poi il contenuto della provetta a pressione ridotta (0,2 mm) per eliminare l'eccesso di *p*-etilfenolo. Il residuo è cristallizzato da etanolo al 95 %. Si ottengono bei cristalli in lamelle madreperlacee che dopo una seconda cristallizzazione da etanolo al 95 % fondono a 83,5°C (100 mg).

(\*) Tutti i punti di fusione sono stati eseguiti su un apparecchio Kofler e non sono stati corretti.

(\*\*) Per gli spettri nell'infrarosso si è usato un apparecchio Infracord Perkin-Elmer mod. 137 E.

Analisi elementare :	trovato %	C : 69,73	H : 4,83	N : 3,94
per $C_{22}H_{19}NO_5$	calcolato %	C : 70,00	H : 5,07	N : 3,71

Nell'infrarosso (KBr) si ha la banda del carbonile a  $1750\text{ cm}^{-1}$ .

4) *3-Ammino-4-ossibenzoato di p-etilfenile*. — Una soluzione in etanolo (50 ml) di 3-nitro 4-benzilossi benzoato di p-etilfenile (377 mg) viene addizionata di 120 mg di palladio su carbone al 5 % e idrogenata sotto agitazione per 5 ore ad una pressione di 3 atmosfere. Si elimina quindi il catalizzatore per filtrazione e la soluzione giallina viene decolorata con poco carbone e concentrata a piccolo volume a pressione ridotta. L'aggiunta di un egual volume di acqua calda provoca la cristallizzazione di 135 mg di prodotto fondente a  $167^{\circ}\text{-}168^{\circ}\text{C}$ . Questo prodotto reagisce con cloruro ferrico dando una colorazione violacea. Il punto di fusione misto con un campione di 3-ammino-4-ossibenzoato di p-etilfenile ottenuto per riduzione catalitica della ferroverdina non dà alcuna depressione. Anche l'acetilderivato, ottenuto facendo bollire a ricadere per 3 ore il prodotto con anidride acetica e sodio acetato, risulta identico al 3-diacetammino-4-acetossibenzoato di p-etilfenile preparato dalla ferroverdina. Punto di fusione  $125^{\circ}\text{-}126^{\circ}\text{C}$ .

Nello spettro infrarosso (nujol) si nota la banda del carbonile a  $1750\text{ cm}^{-1}$  e una larga banda tra  $3350$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$  dovuta probabilmente alla sovrapposizione delle due bande del gruppo amminico e dell'ossidrilico.

#### *Sintesi del 3-acetammido-4-ossibenzoato di p-etilfenile.*

1) *3-Ammino-4-benzilossi-benzoato di p-etilfenile*. — Una soluzione di 3-nitro-4-benzilossi-benzoato di p-etilfenile (1 g) in etanolo (80 ml) è idrogenata sotto agitazione in presenza di nichel-Raney o di palladio su solfato di bario al 5 % a temperatura ambiente e a pressione ordinaria per due ore. Si filtra per eliminare il catalizzatore ed il filtrato si porta a secco a pressione ridotta; il residuo si cristallizza da etanolo-acqua. Si ottengono 600 mg di cristalli bianco sporco fondenti a  $126^{\circ}\text{-}127^{\circ},5\text{ C}$ . Ricristallizzando ancora da etanolo-acqua si ottengono cristalli incolori che fondono a  $127^{\circ}\text{-}128^{\circ},5\text{ C}$ . La reazione con cloruro ferrico è negativa.

Analisi elementare :	trovato %	C : 75,85	H : 6,02	N : 4,03
per $C_{22}H_{21}NO_3$	calcolato %	C : 76,04	H : 6,09	N : 4,03

Nell'infrarosso (KBr) si hanno le due bande del gruppo- $\text{NH}_2$  a  $3450$  e  $3350\text{ cm}^{-1}$  e la banda del carbonile a  $1740\text{ cm}^{-1}$ .

2) *3-Acetammido-4-benzilossi-benzoato di p-etilfenile*. — Una soluzione di 3-ammino-4-benzilossi-benzoato di p-etilfenile (100 mg) in anidride acetica (10 ml), a cui si aggiunge sodio acetato fuso (200 mg), è lasciata a temperatura ambiente per 24 ore. Si distilla a pressione ridotta fino a secco l'ani-

dride acetica dopo aggiunta graduale di 100 ml di metanolo. Il residuo è disciolto con etanolo e cristallizzato mediante l'aggiunta di acqua. Si ottengono 100 mg di aghi lunghi fondenti a 113°-114° C. Dopo ricristallizzazione da etanolo-acqua il punto di fusione non cambia. In alcuni casi, e precisamente allorchè la soluzione idroalcolica si lascia raffreddare lentamente, questo prodotto si ottiene in forma di piastre fondenti a 131° C; rifiuto dopo raffreddamento mostra punto di fusione a 113°-114° C.

Analisi elementare :	trovato %	C : 74,03	H : 5,96	N : 3,78
per C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>	calcolato %	C : 74,03	H : 5,95	N : 3,60

Nell'infrarosso (KBr) si nota la banda del gruppo -NH- a 3350 cm<sup>-1</sup> e due bande carboniliche a 1725 cm<sup>-1</sup> e a 1690 cm<sup>-1</sup>.

3) 3-Acetammido-4-ossibenzoato di p-etilfenile. — Questo prodotto si ottiene per tre vie diverse :

a) per parziale deacetilazione del 3-diacetammido-4-acetossi-benzoato di p-etilfenile.

Ad una sospensione di 3-diacetammido-4-acetossibenzoato di p-etilfenile (50 mg) in etanolo (3 ml) sono aggiunte lentamente piccole quantità di NaOH in modo che il pH si mantenga intorno a 8. Dopo 20 minuti si acidifica con HCl la soluzione etanolica e si aggiunge acqua fino ad incipiente intorbidimento. Lentamente cristallizzano, in aghi lunghi ed incolori, 26 mg di prodotto fondente a 209°-211° C. Ricristallizzato da etanolo-acqua si ha P.F. 211°C.

Analisi elementare :	trovato %	C : 68,33	H : 5,73	N : 4,49
per C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>	calcolato %	C : 68,21	H : 5,73	N : 4,68

b) per debenzilazione catalitica del 3-acetammido-4-benzil-ossibenzoato di p-etilfenile.

Una soluzione di 3-acetammido-4-benzilossibenzoato di p-etilfenile (60 mg) in etanolo (10 ml) contenente palladio su carbone al 5 % (50 mg) è sottoposta ad idrogenazione per 6 ore a temperatura ordinaria e a pressione di tre atmosfere, mentre viene meccanicamente agitata. Si filtra per eliminare il catalizzatore ed il filtrato è concentrato a piccolo volume e lasciato a cristallizzare a 5° per una notte.

Si ottengono 28 mg di piastre incolori che fondono a 207°-209° C. Il punto di fusione misto di questo prodotto con quello ottenuto dalla sintesi descritta in a) è 211° C.

c) per riduzione catalitica del 3-acetammido-4-ossibenzoato di p-vinilfenile ottenuto dalla ferroverdina.

Ad una soluzione di 3-acetammido-4-ossibenzoato di p-vinilfenile (16,7 mg), in etile acetato (10 ml) si aggiunge palladio su carbone al 5 % (15 mg)

e si sottopone ad idrogenazione a temperatura ambiente e a pressione ordinaria per due ore. Si filtra su carta per allontanare il catalizzatore e si evapora il solvente a pressione ridotta fino a secco. Il residuo è cristallizzato da etanolo assoluto. Si ottengono cristalli incolori fondenti a 211°-212° C. Il P.F. di questo prodotto con quello ottenuto alla lettera a) non è depresso.

Nell'infrarosso (KBr) si nota: banda a 3350  $\text{cm}^{-1}$  del gruppo -NH-; banda larga tra 3200 e 2500  $\text{cm}^{-1}$  dell'ossidrilico il cui idrogeno è impegnato in legami idrogeno; due bande carboniliche a 1720  $\text{cm}^{-1}$  e 1660  $\text{cm}^{-1}$ .

4) *3-diacetammido-4-benzilossi-benzoato di p-etilfenile*. — Si fa bollire a ricadere per 2 ore una soluzione di 3-ammino-4-benzilossibenzoato di p-etilfenile (100 mg) in anidride acetica (10 ml) a cui si è aggiunto sodio acetato fuso (200 mg). Dopo raffreddamento si filtra per eliminare il sodio acetato che in parte è rimasto indisciolti e si evapora a pressione ridotta la soluzione. Il residuo è ripreso con poco etanolo caldo e dopo aggiunta di qualche goccia di acqua si lascia cristallizzare a 5° C. Si ottengono 110 mg di cristalli fondenti a 111° C. Dopo ricristallizzazione da etanolo-acqua il punto di fusione è 111°-112° C.

Analisi elementare:	trovato %	C: 72,63	H: 5,65	N: 3,25
per $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_5$	calcolato %	C: 72,37	H: 5,85	N: 3,25

Nell'infrarosso (KBr) si ha una banda larga carbonilica a 1720  $\text{cm}^{-1}$ .

#### *Sintesi degli acetilderivati del 3-ammino-4-ossibenzoato di metile.*

1) *3-Acetammido-4-acetossibenzoato di metile*. — Una soluzione di 3-ammino-4-ossibenzoato di metile (50 mg) in anidride acetica (25 ml) a cui si è aggiunto sodio acetato fuso (100 mg) è lasciata a temperatura ambiente per 24 ore. È poi diluita gradualmente con 50 ml di metanolo e distillata a pressione ridotta fino quasi a secco. Il residuo è ripreso con acqua calda, decolorato con un poco di carbone e lasciato cristallizzare a 5° C. Si ottengono 40 mg di cristalli aghiformi incolori che fondono a 135° C. Ricristallizzando da acqua il punto di fusione resta invariato.

Analisi elementare:	trovato %	C: 57,46	H: 5,22	N: 5,53
per $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_5$	calcolato %	C: 57,38	H: 5,22	N: 5,58

Nell'infrarosso (KBr) si ha la banda del gruppo -NH- a 3350  $\text{cm}^{-1}$  e una larga banda intorno a 1720 data dai vari carbonili.

2) *3-diacetammido-4-acetossibenzoato di metile*. — Una soluzione di 3-ammino-4-ossibenzoato di metile (200 mg) in anidride acetica (25 ml), contenente sodio acetato fuso (400 mg) viene fatta bollire a ricadere per 2 ore. La soluzione è distillata a pressione ridotta fino a secco. Il residuo è cristal-

lizzato da acqua e poi da acetone-acqua in presenza di carbone. Si ottengono 315 mg di cristalli che fondono a 92° C.

Analisi elementare :	trovato %	C : 57,49	H : 4,97	N : 4,68
per C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>6</sub>	calcolato %	C : 57,33	H : 5,16	N : 4,78

Nell'infrarosso (KBr) si notano due bande carboniliche a 1770 cm<sup>-1</sup> e a 1720 cm<sup>-1</sup>.

*Acido 3-acetammido-4-acetossibenzoico.*

Una soluzione di acido 3-ammino-4-ossibenzoico (160 mg) in anidride acetica (50 ml) contenente sodio acetato fuso (300 mg) è fatta bollire a ricadere per 5 ore. Si distilla l'anidride acetica a pressione ridotta fino a secco e si riprende con acqua il residuo scaldando fino a soluzione completa. Raffreddando si ottengono 130 mg di cristalli aghiformi incolori che fondono a 198-205° C. Anche dopo quattro ricristallizzazioni da acqua il punto di fusione non cambia.

Analisi elementare :	trovato %	C : 55,90	H : 4,59	N : 5,86
per C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>5</sub>	calcolato %	C : 55,69	H : 4,67	N : 5,91

È da notare che sottoponendo ad acetilazione l'acido 3-ammino-4-ossibenzoico si ottiene sempre questo stesso diacetile anche se la reazione si fa avvenire a temperatura ambiente e per breve tempo (4 ore).

Nell'infrarosso (KBr) si nota : banda del gruppo -NH- a 3350 cm<sup>-1</sup> ; larga banda tra 3200 cm<sup>-1</sup> e 2500 cm<sup>-1</sup> dell'ossidrilico carbossilico con legami idrogeno ; banda a 1740 cm<sup>-1</sup> dei carbonili.

Ringrazio il Prof. A. Ballio per i preziosi consigli e suggerimenti ricevuti nel corso del presente lavoro.

24 luglio 1967.

BIBLIOGRAFIA

- BALLIO, A., H. BERTHOLDT, A. CARILLI, E. B. CHAIN, V. DI VITTORIO, A. TONOLO & L. VERO-BARCELLONA, 1963. Studies on ferroverdin, a green iron-containing pigment produced by a *Streptomyces* Wak. species - *Proc. Roy. Soc.*, B, **148**, 43-70.
- CHAIN, E. B., A. TONOLO & A. CARILLI, 1955. Ferroverdin, a green pigment containing iron produced by a *Streptomyces*. *Nature*, **176**, 645.