

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

M. BARBETTA, G. CASNATI, A. RICCA

## Ricerche su l'aspergillina

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.3, p. 450–456.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1966\\_8\\_40\\_3\\_450\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_3_450_0)>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)  
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

**Chimica organica.** — *Ricerche su l'aspergillina*<sup>(\*)</sup>. Nota di M. BARBETTA, G. CASNATI e A. RICCA, presentata<sup>(\*\*)</sup> dal Socio A. QUILICO.

SUMMARY. — Aspergillin, the black pigment from *A. niger*, was subjected to hydrolysis in alkaline medium with Raney Nickel.

A preliminary survey of the degradative products has led to the isolation and identification of hydrocarbons related to the perylene skeleton.

These results are discussed on the basis of some hypotheses on the formation of black pigments of Ascomycetis.

Il pigmento nero contenuto nelle spore dell'*Aspergillus Niger*, isolato da G. Linossier<sup>(1)</sup> verso la fine del secolo scorso e da questi chiamato Aspergillina, fu in passato sottoposto ad uno studio sistematico<sup>(2)</sup> che permise di definirne le caratteristiche fondamentali fisiche e chimiche e di evidenziarne le analogie con le sostanze umiche.

Era già stato suggerito da Quilico<sup>(3)</sup> che lo studio su l'Aspergillina avrebbe indubbiamente recato un contributo indiretto al problema della struttura e della genesi delle sostanze umiche.

Sulla base di questa ipotesi e delle teorie sulla formazione degli acidi umici<sup>(4)</sup>, alcuni Autori<sup>(5)</sup> studiando l'idrolisi acida dell'Aspergillina in parallelo con alcuni acidi umici, hanno isolato una frazione a carattere proteico e polisaccarico (circa il 10-20 % in peso) avente composizione molto simile in tutti i casi presi in esame<sup>(6)</sup>.

Le degradazioni ossidative chimiche condotte in passato su l'Aspergillina<sup>(7)</sup> avevano permesso di isolare notevoli quantità di acido mellitico, sì da indurre a formulare una struttura ad anelli ciclici policondensati<sup>(2)</sup>. Dopo tali studi degradativi non si hanno ulteriori ricerche, al di fuori di un lavoro di Robertson<sup>(8)</sup> che confermò i risultati precedenti, senza portare nessun contributo sostanziale alla soluzione del problema strutturale.

(\*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Chimica del Politecnico di Milano, Centro Nazionale del C.N.R. per la Chimica delle Sostanze Naturali, 1<sup>a</sup> Sezione.

(\*\*) Nella seduta del 12 marzo 1966.

(1) G. LINOSSIER, «Comptes Rend. Acad. des Sc.», 112, 489 (1891).

(2) A. QUILICO, *I pigmenti neri animali e vegetali*, Tip. Fusi, Pavia (1937).

(3) A. QUILICO, «Gazz. Chim. It.», 63, 409 (1933).

(4) M. M. KONONOVA, *Soil Organic Matter*, Pergamon Press, New York (1961), pp. 101-163.

(5) K. S. KANG e G. T. FELBECK Jr. «Soil Science», 99, 175 (1965).

(6) Sono stati anche confrontati per via gascromatografica i prodotti ottenuti dalla pirolisi dell'Aspergillina e degli acidi umici, senza giungere però a risultati significativi, B.R. NAGAR, «Nature», 199, 1213 (1963).

(7) A. QUILICO, «Ist. Lomb. Sci. Lett.», 66, 1 (1933).

(8) N. A. LUND, A. ROBERTSON e W. B. WHALLEY, «J. Chem. Soc.», 1953, 2434.

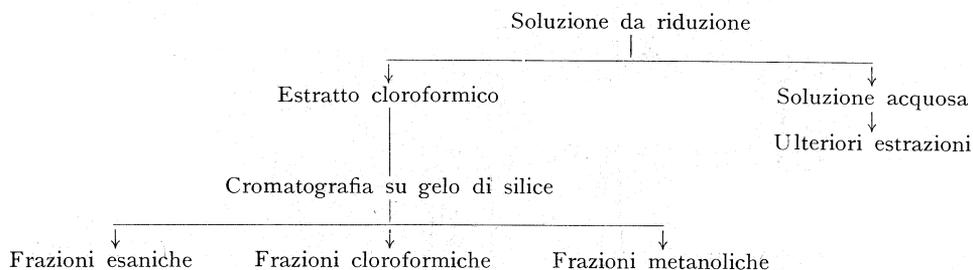
Più recentemente le estese ricerche condotte da Nicolaus <sup>(9)</sup> sui neri vegetali hanno ulteriormente avvalorato l'ipotesi che tali sostanze siano di origine fenolica ed abbiano struttura ad anelli policondensati.

Ora noi abbiamo pensato di riprendere lo studio strutturale di tale metabolita nell'intento di portare ulteriori chiarimenti che in ogni caso risulterebbero di notevole interesse, dato il carattere più generale che riveste il problema dell'Aspergillina.

È apparso fin dall'inizio come presupposto fondamentale per raggiungere tale scopo utilizzare metodi degradativi non distruttivi, tali cioè da poter rivelare frammenti significativi delle strutture in esame. A tale scopo i procedimenti riduttivi si presentavano a priori come i più validi; fra tali svariatissimi metodi abbiamo pensato di ricorrere al Ni-Raney in ambiente alcalino. Questo procedimento offre il vantaggio di operare in ambiente omogeneo data la solubilità di questi pigmenti in alcali, anche a pH modesti. Esiste inoltre una documentazione relativamente estesa sull'azione del Ni-Raney come mezzo riducente ed idrogenolizzante <sup>(10)</sup> di svariate funzioni innestate su sistemi aromatici, anche policiclici.

L'Aspergillina isolata con le tecniche già descritte in precedenza, disciolta in KOH diluita è stata trattata con Ni-Raney a temperature variabili fra i 100° e i 200° ottenendo degradazione totale del pigmento: la soluzione si decolora verso il giallo rossastro.

La soluzione proveniente dalla riduzione è stata sottoposta ad estrazioni e successivi frazionamenti cromatografici come riportato nello schema seguente:



L'estratto cloroformico della soluzione ridotta dà un residuo oleoso semi-solido pari a circa il 15% in peso del pigmento originale.

Questa frazione, sulla quale si è accentrata per il momento la nostra attenzione, appare su piastra di gelo di silice come una miscela complessa ed allo spettro infrarosso rivela il suo carattere prevalentemente idrocarburico.

(9) R. A. NICOLAUS, M. PIATTELLI, « Rend. Acc. Sci. fis. e mat. Napoli », 32, 1 (1965).

(10) Vedi ad esempio: E. SCHWENK e D. PAPA, « J. Org. Chem. », 10, 232 (1945); N.B. DESAI, V. RAMANATHAN e K. VENKATARAMAN, « J. Sci. Ind. Res. », B 14, 330 (1955); « C. A. », 50, 12008 (1956).

*Frazioni eluite con esano.*

Non si è riusciti ad ottenere composti puri per eluizione con esano, ma solo miscele arricchite in qualche componente anche quando si sono effettuati accurati frazionamenti: ad esempio g 1,3 di prodotti ripartiti in 1400 frazioni di 3 cm<sup>3</sup>.

Questo risultato ci ha spinto a ricorrere alla gascromatografia preparativa per la purificazione delle frazioni eluite con esano. Infatti operando a

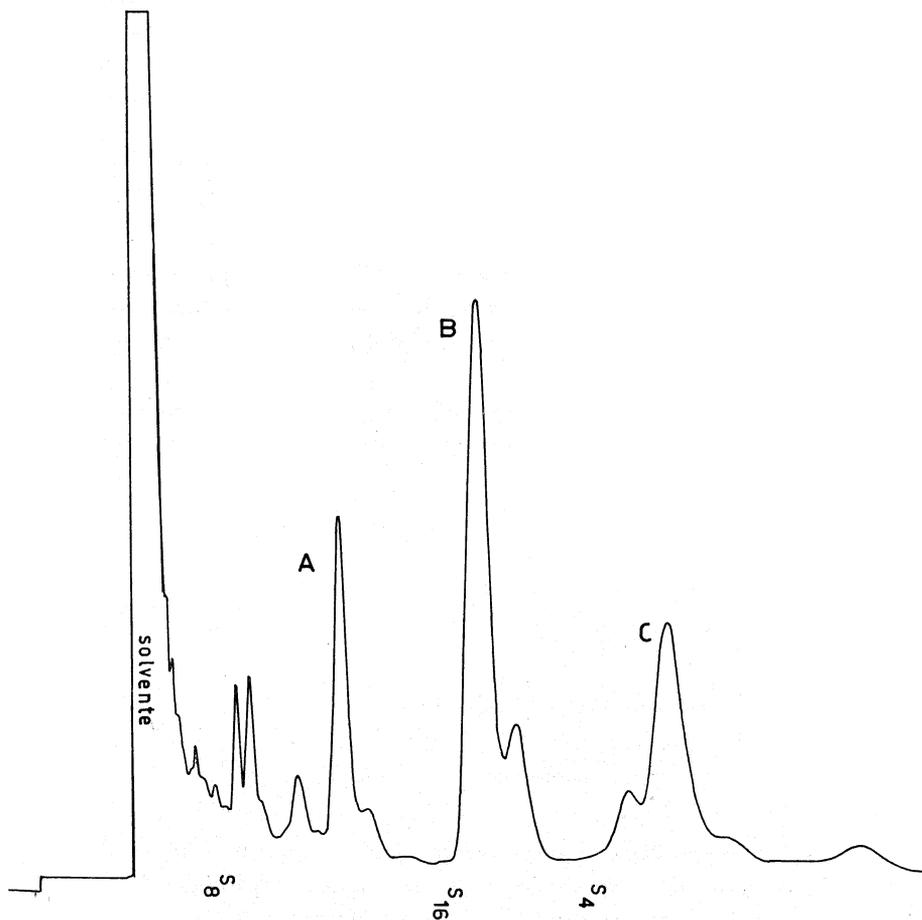


Fig. 1. - Cromatogramma dell'eluato con esano.

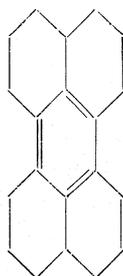
Apparecchio con rivelatore a ionizzazione di fiamma; riempimento SE 30 al 3% su Chromosorb P; T 225°.

220°-250°C (rivelatore a termoconduttività; riempimento SE 52 al 20% su Chromosorb W silanizzato) si è riusciti ad isolare 3 componenti (o gruppi di componenti), che costituiscono l'80-90% dei prodotti rivelabili in gascromatografia.

Lo studio delle singole frazioni è stato poi realizzato con la spettrografia ultravioletta e di massa.

Il componente fondamentale, corrispondente al picco B, presente in misura di circa il 70 %, ha uno spettro U.V. del tipo dell'esametilbenzene ( $\lambda$  214,  $\log \epsilon$  4,51;  $\lambda$  273,  $\log \epsilon$  2,65) ed una massa di 266 in accordo con la formula bruta  $C_{20}H_{26}$ ; la spettrografia di massa indicava inoltre come poco probabile la presenza di catene alifatiche.

Su queste basi è stato possibile avanzare per il composto in esame una struttura di tetradecaidroperilene (I), che è stata poi definitivamente accertata mediante confronti dello spettro di massa, dello spettro U.V. e dei tempi di ritenzione in gascromatografia (anche in condizioni diverse) con il corrispondente sintetico (11).



(I)

Inoltre lo stesso componente fondamentale per ulteriore riduzione (in decalina con  $H_2$  su carbone palladiato a  $200^\circ C$ ) si trasforma in un composto avente medesimo tempo di ritenzione in gascromatografia e medesimo spettro di massa del peridroperilene  $C_{20}H_{32}$  (11).

Non ancora chiarita risulta invece la natura del componente A e del picco C; quest'ultimo alla spettrografia di massa risulta costituito da tre componenti.

Comunque anche per questi composti, come per la maggior parte dei componenti secondari, la spettrografia di massa suggerisce come probabile strutture policicliche condensate, spesso a vario grado di idrogenazione.

#### *Frazioni eluite con cloroformio.*

È apparso di particolare importanza un esame, almeno preventivo, delle frazioni più polari ottenute dalla cromatografia di ripartizione su gelo di silice per eluizione con soluzioni cloroformiche. In questo caso le difficoltà sono ancora più rilevanti di quelle precedentemente riscontrate: la scarsissima volatilità dei prodotti ha finora impedito il ricorso alla spettrografia di massa

(11) La idrogenazione del perilene in decalina su carbone palladiato dà come componenti fondamentali a  $100^\circ$  il tetradecaidroperilene, a  $200^\circ$  il peridroperilene.

ed alla gascromatografia, come mezzi di indagine strutturale e di controllo analitico.

Si è dovuto, almeno in questa prima fase, affrontare il problema delle loro strutture indirettamente. A tal fine il grezzo proveniente dall'eluizione con cloroformio è stato pirolizzato ottenendo un prodotto che sulla base dei dati cromatografici e dello spettro U.V. è stato identificato nel perilene.

Inoltre è stata condotta una riduzione spinta (decalina,  $H_2$ , C—Pd, 200°) sul medesimo grezzo, pervenendo così ad una miscela di composti gascromatografabili. Anche in questo caso appaiono come componenti fondamentali prodotti derivabili dal perilene, che costituiscono l'80% della miscela, essi sono: il peridroperilene, il tetradecaidroperilene ed un composto a struttura non ancora chiarita che molto probabilmente proviene da una idrogenolisi parziale del perilene stesso <sup>(12)</sup>.

### *Conclusioni.*

Il ritrovamento dello scheletro perilenico come componente fondamentale fra i prodotti di riduzione dell'Aspergillina è senz'altro imputabile ad una struttura primaria preesistente nel pigmento: risulta in accordo con le notevoli quantità di acido mellitico ottenuto nelle ossidazioni dell'Aspergillina (resa 30% in peso <sup>(8)</sup>) e sarebbe difficilmente imputabile ad alterazioni strutturali provocate dal Ni-Raney in alcali <sup>(10)</sup>.

D'altra parte l'alto contenuto di ossigeno presente nell'Aspergillina, anche accuratamente purificata <sup>(13)</sup>, fa comunque ritenere che l'eventuale scheletro perilenico contenga funzioni ossigenate (quali ossidriliche, chinoniche, carbossiliche o eteree). Tali sostituzioni sono inoltre in accordo con la facile degradabilità di tale struttura ad acido mellitico, con la sua solubilità in alcali anche diluiti ed in solventi fortemente polari sia basici che ossidrilici <sup>(14)</sup>, come pure con i risultati della metilazione e della copulazione con i sali di diazonio <sup>(2)</sup>.

Evidentemente i dati da noi ottenuti non escludono la presenza di strutture più complesse del sistema perilenico. Vale comunque la pena di ricordare come Bu'Lock <sup>(15)</sup> sulla base di considerazioni del tutto generali aveva avanzato l'ipotesi che i neri prodotti dagli Ascomiceti fossero polimeri dell'1, 8-diossinaftalene del tipo (IV): era stato provato che l'ossidazione sia chimica che

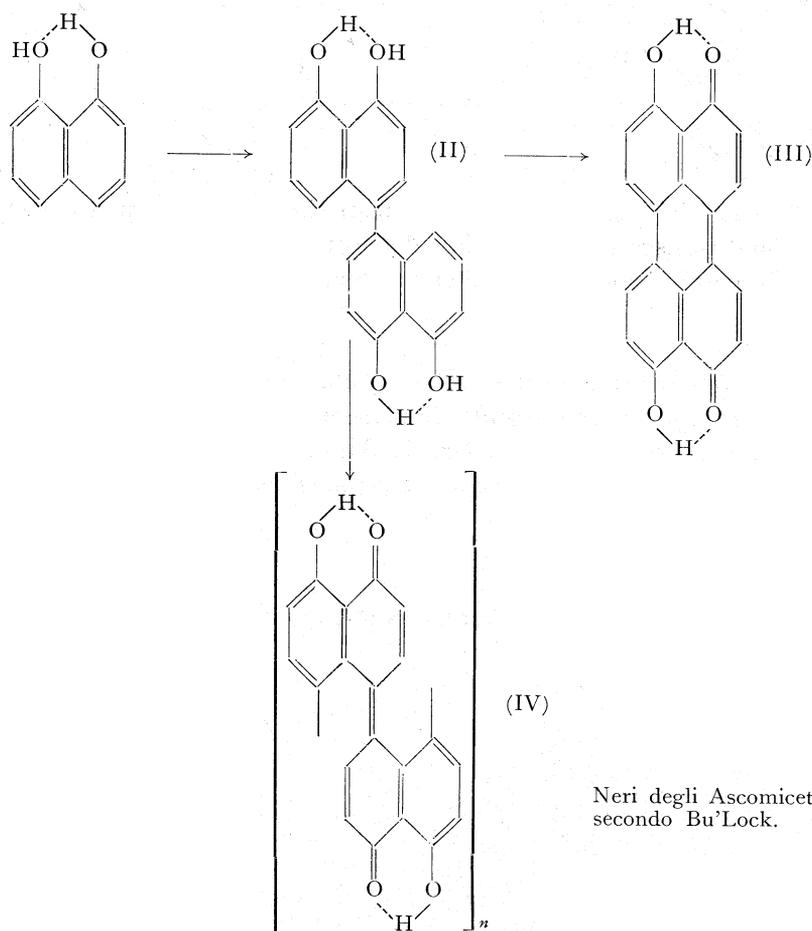
(12) La riduzione diretta del perilene in decalina e carbone palladiato a 200° dà accanto al peridroperilene un componente a tempo di ritenzione in gascromatografia uguale al prodotto incognito.

(13) Sono in corso studi sistematici sulla purificazione del pigmento mediante gel-filtrazione su Sephadex di varia porosità. Sul tipo G 75 sono nettamente separabili tre bande, di cui la principale, che costituisce il 60% in peso del gel-filtrato, presenta la seguente analisi: C 52,93; H 4,48; N 3,62; O 36,19; residuo inorganico 0,5% circa.

(14) È stata accertata nel corso di questa ricerca una certa solubilità dell'Aspergillina in dimetilsolfossido, in dimetilformammide ed in glicoli vari.

(15) D. C. ALLPORT e J. D. BU'LOCK, « J. Chem. Soc. », 1958, 4090.

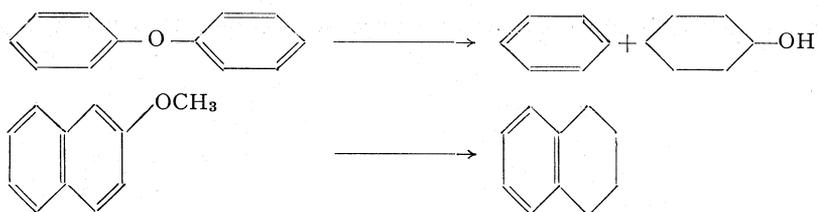
enzimatica dell'1,8-diidrossinaftalene procede secondo lo schema seguente:



Non si può però escludere che la polimerizzazione possa intervenire non sull'unità (II) ma a livello del monomero (III), anche variamente sostituito (ad esempio con gruppi ossidrilici o carbossilici). Un tale polimero ben si accorda nel nostro caso sia con l'ottenimento di acido mellitico che di derivati perilenici.

I legami fra le varie unità monomeriche potrebbero essere rappresentati anche da ponti eterei come viene suggerito e dai risultati ottenuti nelle ossidazioni radicaliche dei fenoli e dall'andamento della riduzione che è sempre accompagnata anche da degradazione del polimero naturale. Quest'ultimo risultato diventa particolarmente significativo quando lo si consideri alla luce dei numerosi esempi noti in letteratura di idrogenolisi condotte su eteri aromatici con Ni-Raney in ambiente alcalino che procedono secondo schemi del tipo (16):

(16) G. S. CHANDLER e W.H.F. SASSE, « Australian J. Chem. », 16, 20 (1963); « C.A. », 59, 3883 (1963); G. STORK, « J. Am. Chem. Soc. », 69, 576 (1947).



Sulla base dei risultati da noi acquisiti riteniamo che questo metodo di degradazione riducente sia di utilità del tutto generale nello studio dei neri di origine vegetale e possa recare ulteriori chiarimenti sulla struttura dell'Aspergillina.

Si ringrazia vivamente il prof. A. Quilico per i numerosi consigli ed il vivo interesse con cui ha seguito il presente lavoro.

Un vivo ringraziamento al Dr. T. Salvatori<sup>(17)</sup> per l'apporto determinante nella soluzione dei problemi strutturali mediante la spettrografia di massa.

(17) Laboratori Riuniti Studi Ricerche SNAM, San Donato Milanese.