

SOCIETA' NAZIONALE DI SCIENZE, LETTERE E ARTI IN NAPOLI

RENDICONTO
DELL'ACCADEMIA DELLE SCIENZE
FISICHE E MATEMATICHE

SERIE IV - VOL. L/2 - ANNO CXXII

(1983)



LIGUORI EDITORE

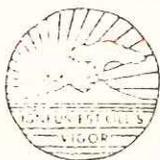
RENDICONTO
DELL'ACCADEMIA DELLE SCIENZE
FISICHE E MATEMATICHE

SOCIETÀ NAZIONALE DI SCIENZE, LETTERE E ARTI IN NAPOLI

RENDICONTO
DELL'ACCADEMIA DELLE SCIENZE
FISICHE E MATEMATICHE

SERIE IV - VOL. L/2 - ANNO CXXII

(1983)



LIGUORI EDITORE

Publicato da Liguori Editore
Via Mezzocannone 19, 80134 Napoli

© Liguori Editore, S.r.l., 1984

I diritti di traduzione, riproduzione e adattamento totale o parziale sono riservati per tutti i Paesi. Nessuna parte di questo volume può essere riprodotta, registrata o trasmessa con qualsiasi mezzo: elettronico, elettrostatico, meccanico, fotografico, magnetico (compresi microfilm, microfiches e copie fotostatiche).

Prima edizione italiana Maggio 1984

9 8 7 6 5 4 3 2 1 0

1990 1989 1988 1987 1986 1985 1984

Le cifre sulla destra indicano il numero e l'anno dell'ultima ristampa

Printed in Italy. Liguori Editore, Napoli

ISBN 88 - 207 1335 7

INDICE

A. Scherillo - Commemorazione di Giuseppe Imbò Commemorazione letta da Antonio Scherillo nell'adunanza del 7 Novembre 1981	Pag.	6
M. Rigutti - Commemorazione di Tito Nicolini (1899-1981) Commemorazione letta da Mario Rigutti nell'adunanza del 6 Febbraio 1982	"	11
N. Avena, T. De Ruvo - Alcuni teoremi di singolarità eliminabili per soluzioni deboli di equazioni non lineari quasi-ellittiche	"	21
S. Dragotti - Una costruzione per particolari \triangleleft -sets	"	41
S. Dragotti - Sulle strutture differenziali parziali di un microfibrato su una varietà PL	"	51
L. Bader - Sull'isomorfismo di H-Anelli dotati di un modulo irriducibile e quasi fedele	"	61
E. Finamore, L. Minale, M. Alì Mohammed - The Sterols of the Somaliian Sponge Pieraphysilla Papyracea	"	81
S. Di Nocera, B. Russo, M. Torre - I depositi marini del ciclo pliocene inferiore-medio nei dintorni di Vietri di Potenza	"	81
M. T. Quagliariello, G. Napoleone - Dalla revisione del grande terremoto "napoletano" del 16 Dicembre 1857 un criterio di zonizzazione sismica	"	101
V. Zamparelli, L. Brancaccio, P. Di Girolamo - Nuove considerazioni sul terrazzo marino de 'La Starza' presso Pozzuoli	"	111
S. Dragotti - Ostruzioni ad estendere strutture differenziabili	"	131
G. De Simone, G. Di Maio - Alcune osservazioni su una classe di assiomi di separazione più deboli di T_1	"	141
M. Renzi - Un'osservazione sulle funzioni assolutamente continue con derivata prima a variazione limitata ...	"	151
G. Caradonna - Sui sistemi di equazioni non lineari alle derivate parziali del secondo ordine di tipo iperbolico, in due variabili indipendenti	"	161
A. Leone, M. Maj, - Gruppi finiti non submodulari a quozienti propri submodulari	"	181
E. Benedetti, E. Broccoli, P. Grimaldi - Restricted rotation in tertiary Amides. The Crystal structure of N-i-Propyl, N-Benzyl-o-Bromobenzamide	"	191

F. Capasso, P. Morrica, E. Ramundo, V. Santagada, C.D. Vinci guerra - Derivati 1,5-Naftodiazepinici a potenziale attività biologica	Pag. 247
L. Di Fiore, S. Freni - Su qualche proprietà delle varietà Segre	" 259
M. Adinolfi, G. Barone, R. Lanzetta, G. Laonigro, M. Parril li, L. Mangoni - Influenza dell' alogeno sulla reazione di formazione di epossidi per azione di alogeno e ossi do di argento su alcheni trisostituiti steroidici	" 281
M. Adinolfi, G. Barone, R. Lanzetta, G. Laonigro, M. Parril li, L. Mangoni - Componenti Diterpenici della <i>Stachys Recta</i> L.	" 285
M. Adinolfi, G. Barone, R. Lanzetta, G. Laonigro, M. Parril li, L. Mangoni - Decorso sterico della addizione di alogenu ri di iodio all'1-Metil-4-t-Butilcicloesene: influen za della specie elettrofila	" 289
M. Adinolfi, G. Barone, R. Lanzetta, G. Laonigro, M. Parril li, L. Mangoni - Struttura di un glicoside estratto dai bul bi di <i>Muscari Comosum</i>	" 293
M. Adinolfi, G. Barone, R. Lanzetta, G. Laonigro, M. Parril li, L. Mangoni - Struttura di due nortriterpeni a scheletro lanostanico estratti da bulbi di <i>Muscari Comosum</i> .	" 295
G. Barone, M. Belardini, R. Lanzetta, G. Laonigro, M. Parril li - La 7-O-Metil-3,9-Diidropunctatina: un nuovo omoisoflava none dal <i>Muscari Comosum</i>	" 297
R. Caputo, P. Monaco, G. Palumbo, L. Previtiera, L. Mangoni - Selective debromination of substituted Vic-Dibromides	" 299
O. Fiodo - Problemi quasi-ellittici nel semispazio dipenden ti da un parametro e perturbazioni singolari	" 301
A. Gobbetti, A. Polzonetti-Magni, M. Zerani, M. Paolucci - Vitellogenin Synthesis Induced by Estradiol 17 β ' in the Green Prog	" 319
M.C. Grimaldi, A. Pica, S. D'Ippolito, F. Della Corte - La pelle delle Torpedini (<i>Torpedo marmorata</i> Risso e <i>Torpedo ocellata</i> Rafinesque) con particolare riguar do all'istochimica del secreto epidermico e dei rag gi cartilaginei delle pinne e pettorali	" 325
A. Incoronato - Paleomagnetic Study of the Red Flysch Forma tion (Southern Apennines, Italy)	" 337
P. Morrica, C. D'Ambrosio, I. Behar - Reazioni di Trichetoni ciclici con nucleofili bifunzionali - I	" 349
P. Morrica, C. Ferreri - Reazioni di Trichetoni ciclici con nucleofili bifunzionali - II	" 353
P. Morrica, C. Ferreri - Reazioni di Trichetoni ciclici con nucleofili bifunzionali - III	" 357

G. Nardi - Paleomagnetic Evidences of Early Diagenetic Formation of the Ammonitico Rosso of Western Sicily	Pag. 361
A. Pica, M. Consiglio Grimaldi, S. D'Ippolito, F. Della Corte - I valori ematologici e le cellule del sangue di <i>Scyliorhynchus Stellaris</i> L.: Varietà di forme e prime osservazioni citoistochimiche	" 371
O. Picariello, M. Paolucci - Comparative Electrophoretic Analysis of Esterase Molecular Forms in the Digestive Gland of Some Venerids (Mollusca:Bivalvia)	" 381
P. Quesada, G. Pontarelli, A. Meduri, M. Merola, B. Farina - Studies on Ribonucleases from HeLa Cells Nuclei	" 389
P. Quesada, H. Suzuki, B. Farina - Mechanism of ADP-Ribosylation of Seminal Ribonuclease	" 397
A. Bolognese, R. Maglione - Formazione degli N-Ossidi della Trifenodiossazina per azione dei peracidi: isolamento e caratterizzazione	" 405
A. Bolognese, C. Piscitelli, G. Scherillo - Isolamento di un ommocromo fotolabile dagli occhi della "Musca domestica". Trattamento con acidi di alcuni composti modello	" 409
A. Bolognese, C. Piscitelli, G. Scherillo - Sulla chimica degli ommocromi. Spettri HNMR di 3H-fenossazin-3-oni e fenossazine	" 415
G. Colaps - Un semigruppo generato da un operatore differenziale quasi-ellittico degenerare	" 419
V. Piscitelli - Polimerizzazione isostatica del propilene: analisi mediante R.M.N. del ¹³ C dei gruppi terminali, derivanti dall'iniziazione su legami Mt-C ₆ H ₅ , e del relativo composto modello	" 441
V. Leone - Relazione sui lavori compiuti dall'Accademia delle Scienze Fisiche e Matematiche durante l'anno 1983 Letta nell'Adunanza del 31 Gennaio 1984 dal Prof. V. Leone	" 453

DERIVATI 1,5-NAFTODIAZEPINICI A POTENZIALE ATTIVITA' BIOLOGICA^(°)

Nota di: Francesco CAPASSO¹, Patrizia MORRICA², Eliseo RAMUNDO²
Vincenzo SANTAGADA², Carmine Donato VINCIGUERRA²

Presentata dal socio Ordinario Lorenzo Mangoni
Adunanza dell'11 Giugno 1983

Riassunto: Al fine di ottenere sostanze di interesse biologico, viene descritta la sintesi di alcuni nuovi derivati 1,5-naftodiazepinici variamente sostituiti, in vista delle loro probabili proprietà farmacologiche e dei loro rapporti strutturali con le più note 1,4-benzodiazepine.

La preparazione di questi composti è stata effettuata condensando la 2,3-diamminonaftalina con vari ed appropriati chetoni solforati.

La struttura di tali derivati è stata confermata mediante l'esame degli spettri IR, UV, PMR, di massa, nonché dallo studio delle loro proprietà chimiche.

Viene riportata l'attività antiinfiammatoria nell'edema da carragenina nel ratto di alcuni di questi prodotti.

Abstract: In order to obtain biologically active compounds, a series of new 1,5-dihydro-4-substituted-naphtho-[2,3-b]-[1,4]-diazepin-2-thiones was prepared, in view of their probable interesting pharmacological properties and their structural connections with the more known 1,4-benzodiazepines.

These products were obtained by condensing the 2,3-diamminonaphthalene with several and appropriate sulphurated ketones.

The structure of these derivatives was confirmed by their spectral data (IR, UV, PMR, MS) and chemical properties examination. Preliminary pharmacological studies on the anti-inflammatory activity against carrageenan edema of some of these compounds are reported.

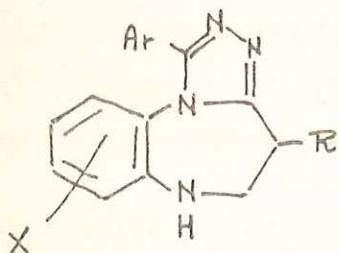
^(°)Comunicazione poster presentata in occasione del III Convegno Nazionale-Div. di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana-Montecatini Terme, 18-21 Ottobre 1982

¹Istituto di Farmacologia Sperimentale-Facoltà di Farmacia-Università di Napoli.

²Istituto di Biorganica-Facoltà di Farmacia-Università di Napoli

Le sostanze contenenti il nucleo della 1,5-benzodiazepina sono state particolarmente studiate in questi ultimi anni¹, pur essendo ben note delle corrispondenti 1,4 le quali costituiscono un importante gruppo di farmaci psicotropi per le loro proprietà sedative-ipnotiche e tranquillanti^{2,6}.

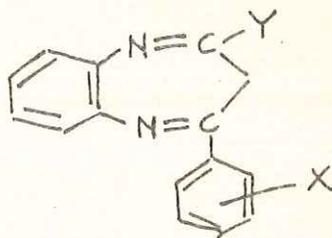
Recenti ricerche nel campo delle 1,5-benzodiazepine fanno però ritenere che anche questi derivati posseggono diverse ed interessanti proprietà farmacologiche. In particolare sono stati descritti numerosi derivati sia ad azione analgesica ed ^{anti}infiammatoria⁷ che antibatterica⁹ corrispondenti, rispettivamente, ad alcune (4H)-diidro-5,6(5)-triazolo-(4,3-a)-1,5-benzodiazepine variamente sostituite (I)⁷ e a una serie di alogenuri di 2-dialchilammonioalchiltio-4-aril-3H-1,5-benzodiazepine (II)^{8,9}:



(I)

X = H, Cl, -OCH₃; R = H, -CH₃

Ar = residuo aromatico
eventualmente sostituito



(II)

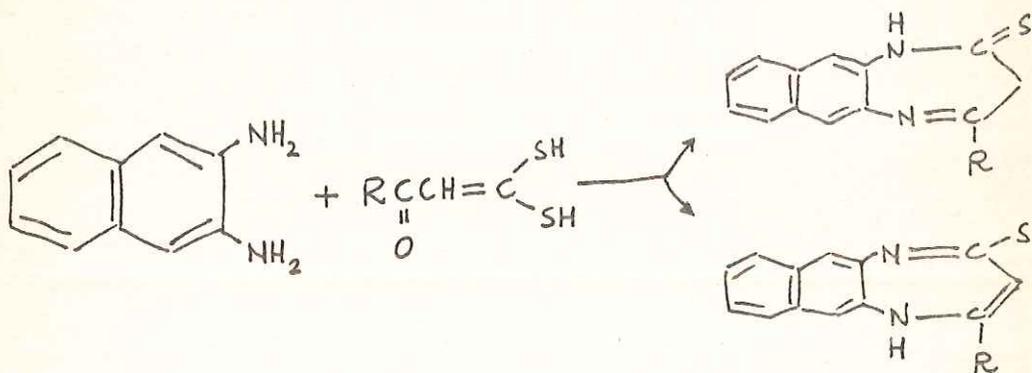
Y = -S(CH₂)_n-N⁺(R₁)(R₂)(R₃); n = 2 o 3

X = H, -Cl, -Br, -OC₆H₅, -SC₆H₅, -SCH₂C₆H₅, -SR

Pertanto, nell'ambito delle nostre ricerche miranti alla sintesi di nuove sostanze ad attività antiinfiammatoria e in considerazione di una presumibile positiva influenza di una parte aromatica più estesa e planare del sistema benzodiazepinico sulle proprietà farmacologiche, abbiamo ritenuto interessante sintetizzare derivati aventi il nucleo naftalenico e racanti nella posizione 4 dell'anello diazepinico arili variamente p-sostituiti, un cicloesile, un naftile-2 o radicali eterociclici.

Le 1,5-naftodiazepine sostituite sono state preparate per riscaldamento a ricadere per 2-3 h ed in atmosfera di azoto di una soluzione toluenica contenente quantità equimolecolari di 2,3-diamminonaftalina e di chetone solforato (Schema I).

SCHEMA I



R = C_6H_5

-p- C_6H_4Cl

-p- C_6H_4Br

-p- $C_6H_4CH_3$

-p- $C_6H_4OCH_3$

-p- C_6H_4CN

-p- $C_6H_4-S-C_6H_5$

- C_6H_{11}

-3-naftile

- α -furile

- α -tienile

I chetoni solforati sono stati ottenuti secondo i metodi descritti in letteratura^{10,11} e si presentano tutti come solidi gialli, facilmente ossidabili all'aria, tranne quello derivante dal cicloesilmetilchetone, un olio viscoso di colore rosso scuro e di difficile purificazione.

L'idrogeno legato all'azoto in posizione 1 delle naftodiazepine preparate è particolarmente acido e quindi facilmente protonizzabile. Tale considerazione ci ha spinto ad impiegare la titolazione in solventi non acquosi come ulteriore metodo per la determinazione del peso molecolare e quindi della purezza dei composti in esame. Come titolante abbiamo impiegato una soluzione di idrossido di tetra-n-butilammonio e come solvente dimetilformammide. I pesi molecolari trovati sono risultati in ottimo accordo con quelli calcolati.

Le caratteristiche basiche esibite contemporaneamente da queste sostanze ne hanno anche consentito la titolazione in acido acetico mediante acido perclorico; si ottengono curve di titolazione con viraggi molto netti, ma affette da una minore precisione nei valori dei pesi molecolari.

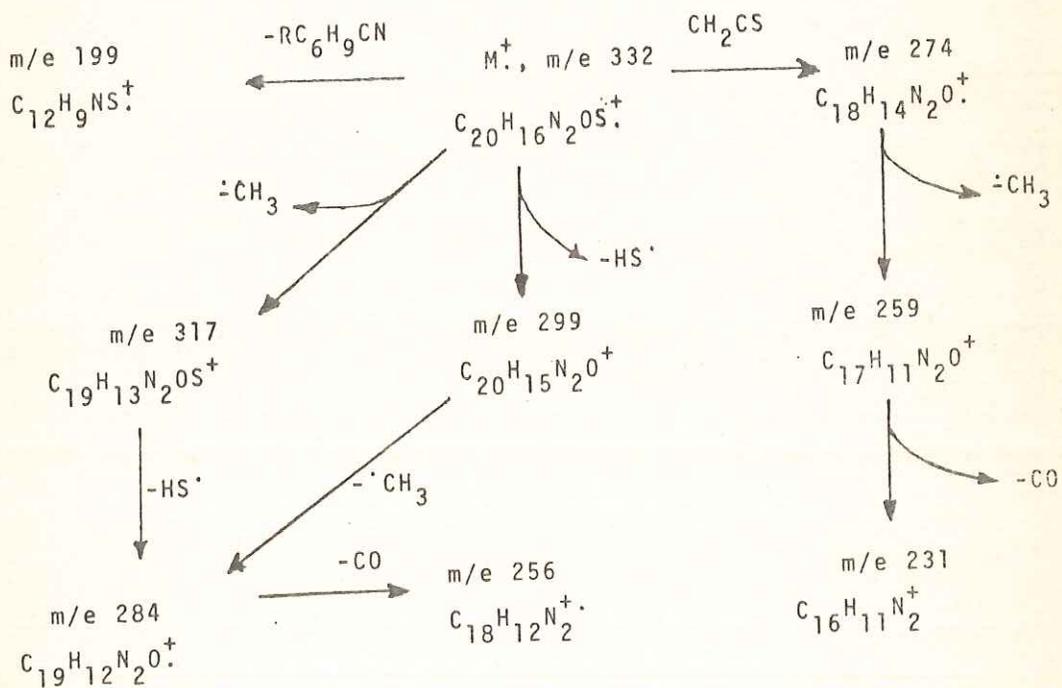
Detti composti sono stati ulteriormente caratterizzati mediante l'esame degli spettri IR, UV, PMR e di massa. I risultati ottenuti, in buon accordo con quanto riportato in precedenza in letteratura^{8,12}, per composti analoghi, hanno confermato le strutture proposte.

Nella Tabella I si riportano i dati spettrofotometrici relativi agli assorbimenti avutisi all'UV delle 1,5-naftodiazepine preparate, mentre nello Schema II vengono riassunte, ad esempio, le frammentazioni più importanti riscontratesi per il derivato |1H|-2,3-diidro-4-(p-metossifenil)-nafto-[2,3-b][1,4]-diazepin-2-tione (16)

TABELLA I

Composto n.	R	λ_{\max} (nm)	$\log \epsilon$
12	-C ₆ H ₅	224;276;307;346	4,42;4,55;4,56;4,14
13	p-C ₆ H ₄ Cl	222;281;305;342	4,25;4,41;4,39;4,02
14	p-C ₆ H ₄ Br	222;282;302;442	4,38;4,55;4,52;4,15
15	p-C ₆ H ₄ CH ₃	226;287;302;343	4,41;4,56;4,56;4,14
16	p-C ₆ H ₄ OCH ₃	206;230;342	4,54;4,29;4,08
17	p-C ₆ H ₄ CN	280;348	4,52;4,14
18	p-C ₆ H ₄ SC ₆ H ₅	224;276;307;346	4,42;4,55;4,56;4,14
19	-cicloesile	236;296;337	4,50;4,55;4,25
20	- β -naftile	244;298;302;333	5,08;4,52;4,55;4,25
21	- α -furile	222;305;349	4,38;4,65;4,23
22	- α -tienile	230;281;306;395;410	4,42;4,26;4,36;4,34;4,21

SCHEMA II



PARTE SPERIMENTALE

I punti di fusione (p.f.), non corretti, sono stati determinati con un apparecchio Kofler. Gli spettri IR sono stati eseguiti con uno spettrofotometro Perkin-Elmer 177 (Nujol); gli spettri UV (Etanolo) con uno spettrofotometro Perkin-Elmer, Coleman 575; gli spettri PMR con un apparecchio Perkin-Elmer R-24 a 60 MHz in soluzione di d_5 -piridina e con Me_4Si come standard; gli spettri di massa con uno spettrometro AEI mod. MS 902 (introduzione diretta in sorgente a temperature variabili tra 80 e 130°C, energia di ionizzazione 70eV).

Le titolazioni in mezzo non acquoso sono state condotte potenziometricamente con un apparecchio Radiometer mod. PHM23a, equipaggiato con un sistema elettrodico vetro-calomelano modificato. L'elettrodo a calomelano è stato modificato sostituendo la soluzione acquosa satura di KCl con una corrispondente metanolica, oppure con una soluzione di litio cloruro in anidride acetica.

3,3-dimercapto-2-propen-1-oni-1-sostituiti.

Metodo generale

Ad una soluzione raffreddata in ghiaccio di 0,1 moli di t-tubilato sodico in 80 ml di benzene anidrificato su sodio metallico vengono introdotte mediante imbuto separatore, goccia a goccia e in ca. 30', 0,05 moli di chetone e 0,05 moli di CS_2 in 10ml di benzene anidro.

Il precipitato che si ottiene viene solubilizzato in 15-20 ml di acqua fredda; lo strato acquoso separatosi viene dibattuto con Et_2O e, successivamente, acidificato con acido solforico 2M. Dopo riposo^a freddo, si filtra il chetone insaturo ottenutosi che viene lavato con acqua e seccato su P_2O_5 .

(1H)-2,3-diidro-nafto-(2,3-b)-1,4-diazepin-2-tioni-4-sostituiti.

Metodo generale

Una miscela di 0,01 moli di 3,3-dimercapto-2-propen-1-one-1-sostituito, di 0,01 moli di 2,3-diamminonaftalina e 40 ml di toluene viene riscaldata a 100-110°C sotto azoto per circa 2 h. Dopo raffreddamento, si raccoglie alla pompa il precipitato formatosi che, lavato con etere di petrolio e poi nuovamente con acqua, viene cristallizzato da etile acetato.

Tutti i prodotti preparati vengono descritti nelle Tabb. II e III.

TABELLA II

3,3-dimercapto-2-propen-1-oni-1-sostituiti

Composto n.	R	Resa (%)	p.f. (°C)	Formula grezza	P.M.
1	-C ₆ H ₅	84	63	C ₉ H ₈ OS ₂	196
2	p-C ₆ H ₄ Cl	92	99-101	C ₉ H ₇ ClOS ₂	230
3	p-C ₆ H ₄ Br	88	105	C ₉ H ₇ BrOS ₂	275
4	p-C ₆ H ₄ CH ₃	86	84-85	C ₁₀ H ₁₀ OS ₂	210
5	p-C ₆ H ₄ OCH ₃	84	98	C ₁₀ H ₁₀ O ₂ S ₂	226
6	p-C ₆ H ₄ CN	71	101-102	C ₁₀ H ₇ OS ₂	221
7	p-C ₆ H ₄ SC ₆ H ₅	95	85-86	C ₁₅ H ₁₂ OS ₃	304
8	-C ₆ H ₁₁		olio	C ₉ H ₁₄ OS ₂	202
9	β-naftile	80	{173-175d 229-231	C ₁₃ H ₁₀ OS ₂	278
10	α-furile	63	57	C ₇ H ₆ O ₂ S ₂	186
11	α-tienile	52	69-70	C ₇ H ₆ OS ₃	202

TABELLA III

|1H|-2,3-diidro-nafto|2,3-b||1,4|-diazepin-2-tioni-4-sostituiti.

Composto n.	R	Resa (%)	p.f. (°C)	Formula grezza	P.M.
12	-C ₆ H ₅	68	221-223	C ₁₉ H ₁₄ N ₂ S	302
13	p-C ₆ H ₄ Cl	55	224-225	C ₁₉ H ₁₃ ClN ₂ S	336
14	p-C ₆ H ₄ Br	58	222-224	C ₁₉ H ₁₃ BrN ₂ S	381
15	p-C ₆ H ₄ CH ₃	61	219-222	C ₂₀ H ₁₆ N ₂ S	316
16	p-C ₆ H ₄ OCH ₃	56	214-216	C ₂₀ H ₁₆ N ₂ OS	332
17	p-C ₆ H ₄ CN	83	236-237	C ₂₀ H ₁₃ N ₃ S	327
18	p-C ₆ H ₄ SC ₆ H ₅	34	204-206	C ₂₅ H ₁₈ N ₂ S ₂	410
19	-C ₆ H ₁₁	51	155-157	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ S	308
20	β-naftile	76	193-195d	C ₂₃ H ₁₆ N ₂ S	352
21	α-furile	64	221-222	C ₁₇ H ₁₂ N ₂ OS	292
22	α-tienile	54	220-223	C ₁₇ H ₁₂ N ₂ S ₂	308

Analisi titrimetrica in mezzo non acquoso

Nelle titolazioni alcalimetriche si è usata una soluzione di idrossido di tetra-n-butilammonio in benzene/metanolo (10:1; v/v), preparata col metodo dell'ossido di argento^{14,15} e standardizzata con acido benzoico disciolto in piridina.

Nelle titolazioni acidimetriche sono state usate soluzioni 0,1100N di acido perclorico in diossano, controllandone il titolo con ftalato acido di potassio sciolto in acido acetico.

Il derivato naftodiazepinico in entrambi i casi viene pesato (40-50 mg) direttamente nella cella di titolazione e solubilizzato in circa 30 ml di solvente.

L'accuratezza raggiunta su cinque determinazioni è stata di circa $\pm 0,3\%$ nelle titolazioni alcalimetriche e di ca. $\pm 2\%$ in quelle acidimetriche.

Attività antinfiammatoria

L'attività antinfiammatoria è stata valutata in base alla inibizione dell'edema sperimentale della zampa del ratto. Sono stati impiegati ratti albinici di ceppo Wistar-Nossan, di sesso maschile e di peso compreso tra i 120 e 130 g.

L'edema è stato provocato iniettando 0,1 ml di una sospensione all'1% di carragenina¹⁶ in soluzione fisiologica nell'aponeurosi plantare di una delle zampe posteriori del ratto.

Il volume della zampa è stato misurato immediatamente prima della iniezione di carragenina, utilizzando un pletismometro a mercurio (Basile, Milano). Le successive misurazioni del volume della zampa trattata, effettuate ogni ora fino alla quinta, forniscono il volume dell'edema per sottrazione del volume iniziale.

I prodotti in esame sono stati somministrati per via orale, alla dose di 20mg/kg un'ora prima dell'iniezione di carragenina; per l'indometacina, usato come farmaco di riferimento, la dose era di 5mg/kg.

Le sostanze sono state sospese in un volume pari a 5ml/kg di soluzione di carbossimetilcellulosa all'1%.

Gli animali di controllo hanno ricevuto solo carbossimetilcellulosa. In ogni caso i ratti erano a digiuno da 12-18 ore.

L'azione delle sostanze in esame è stata valutata sia sull'edema alla 3^a ora dopo l'introduzione della carragenina, sia sull'"area dell'edema" fra il tempo zero e la quinta ora, cioè sull'area sottesa della curva formata dai volumi dell'edema in funzione del tempo.

In entrambi i casi i risultati vengono espressi come variazioni percentuali medie rispetto ai valori degli animali di controllo.

Ogni dato corrisponde alla media di sei ratti.

Dato il carattere preliminare di questa ricerca le sostanze 12, 14, 15, 19 e 20 non sono state sottoposte a sperimentazione farmacologica. I risultati ottenutisi vengono raccolti nella Tab.IV.

TABELLA IV

Effetto del pretrattamento con alcune sostanze riportate in Tab.III sulla formazione dell'edema da carragenina.

Dose somministrata: 20 mg/kg di ciascuna sostanza;

Indometacina: 5 mg/kg.

Composto n.	R	Variazione % dell'edema alla 3 ^a h	Variazione % dell'edema fra il tempo 0 e la 5 ^a h
13	p-C ₆ H ₄ Cl	21,87	33,76
16	p-C ₆ H ₄ OCH ₃	14,06	16,24
17	p-C ₆ H ₄ CN	45,31	47,42
18	p-C ₆ H ₄ SC ₆ H ₅	20,31	14,76
21	α-furile	40,62	43,73
22	β-naftile	17,19	14,95

Indometacina:58%

Tutte le sostanze saggiate presentano una lieve azione inibitrice nei confronti dell'edema da carragenina sebbene quest'attività appare maggiormente concentrata nei composti n.17 e 21. Il confronto delle attività dei fenilderivati p-sostituiti indica come la lipofilia del sostituente sia importante ai fini dell'estrinsecazione dell'azione antinfiammatoria; non dotato di rilevante attività è risultato il derivato 4-(β-naftil)-sostituito.

In conclusione l'evidenziamento di una pur debole attività antinfiammatoria in alcuni dei derivati 1,5-naftodiazepinici saggiati ed il variare di essa in funzione della natura dei sostituenti nella posizione 4 del nucleo azotato lasciano sperare che, con ulteriori modulazioni strutturali, possano ottenersi derivati di più cospicua attività.

BIBLIOGRAFIA

- 1) STERNBACH, L.H., *Angew.Chem.*, 83, 70 (1971).
STERNBACH, L.H., RANDALL, L.O., BANZIGER, R., LEHR, M., In *Drugs effecting the central nervous System* par A.Bruger, Edité par M.Decker, N.Y., 237-264 (1968).
- 2) ARCHER, G.A., STERNBACH, L.H., *Chem.Rev.*, 68, 747 (1968).
- 3) STERNBACH, L.H., *J.Med.Chem.*, 22, 1 (1979).
- 4) BLAIR, T., WEBB, G.A., *J.Med.Chem.*, 20, 1206 (1977).
- 5) GILLI, G., BERTOLASI, V., SACERDOTI, M., BOREA, P.A., *Acta Crystallogr.*, B34, 2826 (1978).
- 6) HARAN, R., TUCHAGUES, J.P., *J.Heterocyclic Chem.*, 17, 1483 (1980).
- 7) SZARVASI, E. *et al.*, *Eur.J.Med.Chem.*, 113 (1978).
- 8) NARDI, D., TAJANA, A., ROSSI, S., *J.Heterocyclic Chem.*, 10, 815 (1973).
- 9) NARDI, D., MASSARANI, E., TAJANA, A., CAPPELLETTI, R., SALVATERRA, M., *Il Farmaco ed.Sci.*, 30, 248 (1975).
NARDI, D., MASSARANI, E., TAJANA, A., CAPPELLETTI, R., VERONESE, M., *Il Farmaco ed.Sci.*, 30, 727 (1975).
- 10) THUILLIER, A., VIALLE, J., *Bull.Soc.Chim.France*, 1398 (1959).
- 11) TAJANA, A., NARDI, D., CAPPELLETTI, R., *Annali di Chimica*, 64, 305 (1974).
- 12) In "The tautomerism of Heterocycles". Supplement I. *Advances in Heterocyclic Chemistry*, Accademic Press. New York-San Francisco London, p.562-563 (1967).
- 13) BELVEDERE, G., FRIGERIO, A., MALORNI, A., NARDI, D., *Boll.Chim.Farm.*, 114, 151 (1975).
- 14) CUNDIFF, R.H., MARKUNAS, P.C., *Anal.Chem.*, 28, 792 (1956); *id.*, 30, 1450 (1958)
- 15) MARPLE, L.W., FRITZ, J.S., *Anal.Chem.*, 34, 796 (1962).
- 16) WINTER, C.A., RISLEY, E.A., NUGGS, G.W., *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 111, 544 (1962)

La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci V. Leone, L. Mangoni, R. Nicolaus

SU QUALCHE PROPRIETA' DELLE VARIETA' DI SEGRE

Nota di Lora Di Fiore e Sveva Freni *

Presentata dal Socio Alfredo Franchetta

Adunanza dell'11/6/83

Riassunto. Si considera la varietà di Segre relativa a due spazi proiettivi U_h, V_k , su un campo algebricamente chiuso di caratteristica zero, stabilendo alcune proprietà dei suoi $S_r(r+1)$ -secanti ($1 \leq r \leq \min\{h,k\}$) e della varietà che tali S_r riempiono. Si caratterizzano poi le varietà di Segre subordinate a una data. Infine si studiano le quadriche passanti per alcune particolari varietà di Segre e si deducono, dai risultati ottenuti, varie proposizioni relative agli iperpiani tangenti a certe varietà di Grassmann.

Summary. In this paper we consider the Segre variety product of two projective spaces U_h, V_k over an algebraically closed field of characteristic zero, dealing with some properties of its $(r+1)$ -secant S_r 's ($1 \leq r \leq \min\{h,k\}$) and of the variety filled up by them. We also characterize the Segre varieties which are contained in a given one. Finally we study quadric hypersurfaces containing some particular Segre varieties: from the results we get, we deduce a few propositions concerning the tangent hyperplanes to some Grassmannians.

§ 1. Siano U_h e V_k due spazi proiettivi, delle dimensioni h e k , su un campo K algebricamente chiuso di caratteristica zero. Se u_i ($i = 0, \dots, h$) sono coordinate di un punto \underline{u} di U_h (se v_j ($j = 0, \dots, k$) sono coordinate di un punto \underline{v} di V_k), indicheremo con u (con v) i vettori di componenti u_i (rispettivamente v_j). Detto T_d un ulteriore spazio proiettivo su K , di dimensione $d = (h+1)(k+1)-1$, indichiamo con x_{ij} le coordinate di un suo punto \underline{x} e con $W_{h,k}^0$ la varietà di

* Istituto di Matematica "R. Caccioppoli", Napoli.

Segre, di indici h e k , rappresentata dalle equazioni

$$(1) \quad x_{ij} = u_i v_j.$$

Le (1) definiscono un'applicazione invertibile, che chiameremo canonica e indicheremo con ϕ , di $U_h \times V_k$ su $W_{h,k}^0$; con ψ_u e ψ_v indicheremo le applicazioni di $W_{h,k}^0$ su U_h e su V_k che associano ad un punto \underline{x} di $W_{h,k}^0$, rispettivamente, il punto di U_h e il punto di V_k che costituiscono la coppia $\phi^{-1}(\underline{x})$. E' noto che, se U_r e V_s sono sottospazi di U_h e V_k , $\phi(U_r \times V_s)$ è una $W_{r,s}^0$, subordinata a $W_{h,k}^0$, riducendosi ad un S_s se $r = 0$, ad un S_r se $s = 0$.

Considerata la matrice $X = (x_{ij})$, indicheremo con x_i le sue righe e x^j le sue colonne, sicché le (1) possono scriversi in una delle forme

$$(2) \quad x_i = u_i v, \quad x^j = u v_j;$$

indicheremo inoltre con $x_{i_0 \dots i_v}^{j_0 \dots j_v}$ il minore di X determinato dalle righe x_{i_0}, \dots, x_{i_v} e dalle colonne x^{j_0}, \dots, x^{j_v} e con $\pi(x)$ il rango che X assume nel punto \underline{x} .

E' noto che l'insieme dei punti di T_d per i quali $\pi(x) \leq r+1$ ($0 \leq r \leq \min(h,k)$), che indicheremo con $W_{h,k}^r$, è una varietà irriducibile. Essa coincide ovviamente con T_d per $r = \min(h,k)$, mentre per $r < \min(h,k)$ è rappresentata dalle equazioni

$$x_{i_0 \dots i_{r+1}}^{j_0 \dots j_{r+1}} = 0,$$

risultando intersezione completa delle ipersuperfici d'ordine $r+2$ che esse rappresentano. Indicheremo tali ipersuperfici ancora con $x_{i_0 \dots i_{r+1}}^{j_0 \dots j_{r+1}}$. Esse sono linearmente indipendenti ed il sistema lineare, Σ^r , che esse individuano comprende tutte le ipersuperfici d'ordine $r+2$ che contengono $W_{h,k}^r$.

La $W_{h,k}^r$, con $r > 0$, risulta essere il luogo degli $S_r(r+1)$ -secanti $W_{h,k}^0$, intesi come S_r che hanno in comune con $W_{h,k}^0$ $r+1$ punti linearmente indipendenti (che chiameremo r -corde di $W_{h,k}^0$ e indicheremo con C_r) o comunque appartenenti alla chiusura di Zariski dell'insieme degli S_r anzidetti [1].

Poiché una $W_{h,k}^0$ è proiettiva ad una $W_{k,h}^0$ è lecito supporre, come faremo costantemente nel seguito, $h \leq k$.

Nel numero 2 di questo lavoro ci occuperemo delle r -corde di una $W_{h,k}^0$ che passano per un punto \underline{x} di $W_{h,k}^r$ pervenendo a dimostrare, fra l'altro, che se \underline{x} non appartiene a $W_{h,k}^{r-1}$ esse sono r -corde di una $W_{r,r}^0$ subordinata a $W_{h,k}^0$ e con ciò ad estendere ad h, k e r qualunque una proposizione dimostrata in [2] per $h = 1$ e $r = 1$.

Nel numero 3 si dimostrano alcune proposizioni relative agli spazi tangenti a una $W_{h,k}^r$ e si osserva che le $W_{r+1,r+1}^r$, che sono ipersuperfici di un $S_{(r+1)(r+3)}$, hanno la particolarità di coincidere colla propria hessiana.

Nel numero 4 si caratterizzano le varietà di Segre subordinate a una $W_{h,k}^0$ dimostrando che una $W_{r,s}^0 \subset W_{h,k}^0$ o è del tipo $\phi(U_r \times V_s)$ o è l'immagine in ϕ del prodotto di un punto di uno dei due spazi U_h, V_k per una $W_{r,s}^0$ contenuta nell'altro.

Nel numero 5 si studia il sistema delle quadriche per una $W_{1,k}^0$ caratterizzando gli spazi doppi delle quadriche specializzate in esso contenute e di qui, nel numero 6, avvalendosi della rappresentazione spaziale di Semples delle varietà di Grassmann [3], si deducono delle proprietà degli iperpiani tangenti a una $G(1,n)$ che riflettono proprietà note di complessi lineari di rette di un S_n [4],[5]. Nel numero 7 si stabiliscono proposizioni riguardanti le quadriche per una $W_{2,2}^0$ ed esse vengono poi applicate allo studio degli iperpiani pluri-tangenti la varietà di Grassmann $G(2,5)$ dei piani di un S_5 , ritrovando e completando i risultati ottenuti in proposito da C. Segre in [6].

§ 2. Sia \underline{x} un punto di T_d e sia $(x_{i_1}, \dots, x_{i_{\pi(x)}})$ un sistema massimo di righe linearmente indipendenti della matrice X . Consideriamo i punti $\underline{x}_{i_1}, \dots, \underline{x}_{i_{\pi(x)}}$ di V_k . Lo spazio che li congiunge ha dimensione $\delta(x) = \pi(x) - 1$ ed è individuato dal punto \underline{x} . Lo indicheremo con $S^V(x)$. Al punto \underline{x} resta anche associato il sottospazio $S^U(x)$ di U_h , anch'esso di dimensione $\delta(x)$, che congiunge i punti che hanno come vettori coordinati le colonne di X costituenti un sistema massimo di colonne linearmente indipendenti.

Siano ora $\underline{x}_0, \dots, \underline{x}_r$ $r+1$ punti di $W_{h,k}^0$ e supponiamo che lo spazio che li congiunge contenga il punto \underline{x} . Ponendo $\underline{u} = \underline{\psi}_U(\underline{x})$ e $\underline{v} = \underline{\psi}_V(\underline{x})$ ($\ell = 0, \dots, r$), per le (2), si ha

$$(3) \quad \times \quad \left(\begin{array}{c} \underline{u} \\ \underline{v} \end{array} \right), \quad \left(\begin{array}{c} \underline{x} \\ \underline{u} \\ \underline{v} \end{array} \right)$$

e quindi, per valori opportuni di $\lambda_0, \dots, \lambda_r$ e μ_0, \dots, μ_r

$$x_i = \sum_{\ell=0}^r \lambda_{\ell} \underline{u}_{\ell}^{\underline{u}}, \quad x^j = \sum_{\ell=0}^r \mu_{\ell} \underline{u}_{\ell}^{\underline{v}}.$$

Questo comporta che lo spazio $[\underline{u}]$ congiungente i punti \underline{u} contiene $S^u(x)$ e, analogamente, lo spazio $[\underline{v}]$ contiene $S^v(x)$. Vale dunque la

PROPOSIZIONE 2.1. *Se \underline{x} appartiene allo spazio congiungente i punti $\underline{x}_0, \dots, \underline{x}_r$ di $W_{h,k}^0$, gli spazi congiungenti i punti $\underline{\psi}_{\underline{u}}(\underline{x})$ e $\underline{\psi}_{\underline{v}}(\underline{x})$ contengono rispettivamente $S^u(x)$ e $S^v(x)$.*

Se \underline{x} è un punto di $W_{h,k}^r$ lo spazio $S^v(x)$ ha dimensione $\delta(x) \leq r$. Fissati in V_k $r+1$ punti indipendenti \underline{v} in modo che $S^v(x)$ sia contenuto nello S_r che li congiunge, ma non in un S_{r-1} che congiunge r soltanto di essi, si ha, per valori opportuni delle \underline{u}_i ,

$$(4) \quad x_i = \sum_{\ell=0}^r \lambda_{\ell} \underline{u}_i^{\underline{v}}.$$

I vettori \underline{u} di componenti \underline{u}_i sono non nulli e determinati a meno di un fattore dai punti \underline{x} e \underline{v} . Sono pertanto univocamente determinati i punti \underline{u} , di vettori coordinati \underline{u} . Consideriamo i punti $\underline{x} = \phi(\underline{u}, \underline{v})$ di $W_{h,k}^0$. In conseguenza dell'indipendenza dei punti \underline{v} essi risultano indipendenti e, per le (4), la r -corda C_r che li congiunge contiene \underline{x} . Si ha dunque la

PROPOSIZIONE 2.2. *Per ogni \underline{x} appartenente a $W_{h,k}^r$ passano delle r -corde di $W_{h,k}^0$.*

Passiamo ora a considerare le r -corde di $W_{h,k}^0$ che passano per un punto \underline{x} di $W_{h,k}^r$ che non appartenga a $W_{h,k}^{r-1}$, tale cioè che $\delta(x) = r$. Sia C_r una r -corda di $W_{h,k}^0$ per \underline{x} . Se i punti \underline{x}_{ℓ} ($\ell = 0, \dots, r$) di $W_{h,k}^0$ costituiscono una base di C_r appartenente a $W_{h,k}^0$ si ha, per la prop. 2.1, che gli spazi $[\underline{\psi}_{\underline{u}}(\underline{x})], [\underline{\psi}_{\underline{v}}(\underline{x})]$ contengono rispettivamente $S^u(x)$ e $S^v(x)$ e quindi, essendo $\delta(x) = r$, coincidono con essi. Ne segue che i punti $\underline{\psi}_{\underline{u}}(\underline{x})$ e $\underline{\psi}_{\underline{v}}(\underline{x})$ sono indipendenti. Pertanto si ha la

PROPOSIZIONE 2.3. *Se \underline{x} appartiene a $W_{h,k}^r - W_{h,k}^{r-1}$ e i punti \underline{x}_{ℓ} ($\ell = 0, \dots, r$) di $W_{h,k}^0$ costituiscono una base di una r -corda di $W_{h,k}^0$ per \underline{x} , i punti $\underline{\psi}_{\underline{u}}(\underline{x})$, $\underline{\psi}_{\underline{v}}(\underline{x})$ sono indipendenti e gli spazi $[\underline{\psi}_{\underline{u}}(\underline{x})]$ e $[\underline{\psi}_{\underline{v}}(\underline{x})]$ coincidono rispettivamente con $S^u(x)$ e $S^v(x)$.*

Con l'argomentazione usata per stabilire la prop. 2.2 si prova poi subito
la

PROPOSIZIONE 2.4. Se \underline{x} appartiene a $W_{h,k}^r - W_{h,k}^{r-1}$, fissata comunque una base (\underline{u}) di $S^u(x)$ (una base (\underline{v}) di $S^v(x)$) resta determinata una base (\underline{u}) di $S^u(x)$ (una base (\underline{v}) di $S^v(x)$), tale che i punti $\underline{x} = \phi(\underline{u}, \underline{v})$ di $W_{h,k}^0$ costituiscono una base per una r-corda di $W_{h,k}^0$ passante per \underline{x} .

Si ha, di più,

PROPOSIZIONE 2.5. Se \underline{x} appartiene a $W_{h,k}^r - W_{h,k}^{r-1}$ una r-corda C_r per \underline{x} ha in comune con $W_{h,k}^0$ r+1 punti soltanto e, per $0 < s < r$, ha in comune con $W_{h,k}^s$ soltanto le s-corde che congiungono s+1 dei punti anzidetti.

Detta infatti (\underline{x}) una base di C_r appartenente a $W_{h,k}^0$, poniamo $\underline{u} = \psi_u(\underline{x})$, $\underline{v} = \psi_v(\underline{x})$. Se \underline{x} è un punto di $W_{h,k}^s$ ($0 \leq s < r$) appartenente a C_r , detta C_s una s-corda di $W_{h,k}^0$ per \underline{x} indichiamo con (\underline{x}) una sua base appartenente a $W_{h,k}^0$ e poniamo $\underline{u} = \psi_u(\underline{x})$, $\underline{v} = \psi_v(\underline{x})$. Si ha allora, per valori opportuni delle λ_ℓ e delle μ_m ,

$$(5) \quad \underline{x}_i = \sum_{\ell=0}^r \lambda_\ell \underline{u}_i^\ell \underline{v}^\ell = \sum_{m=0}^s \mu_m \underline{u}_i^m \underline{v}^m.$$

Per la prop. 2.3 i punti \underline{u} sono indipendenti. Esistono quindi dei valori i_0, \dots, i_r di i tali che

$$\begin{vmatrix} \underline{u}_{i_0}^0 & \dots & \underline{u}_{i_0}^r \\ \dots & \dots & \dots \\ \underline{u}_{i_r}^0 & \dots & \underline{u}_{i_r}^r \end{vmatrix} \neq 0.$$

Supponiamo che le λ_ℓ diverse da 0 siano $\lambda_{\ell_0}, \dots, \lambda_{\ell_t}$, con $t > s$. Allora, dalle (5) relative a i_0, \dots, i_r , si deduce che i punti $\underline{v}^{\ell_0}, \dots, \underline{v}^{\ell_t}$ sono dipendenti e questo è assurdo per la prop. 2.3. Il punto \underline{x} appartiene quindi allo spazio determinato da s+1, al più, dei punti \underline{x} .

Dalla prop. 2.3 segue che, assegnato un punto \underline{x} di $W_{h,k}^r - W_{h,k}^{r-1}$, i punti d'appoggio di una qualunque r-corda di $W_{h,k}^0$ per \underline{x} appartengono a $\phi(S^u(x) \times S^v(x))$ che è una $W_{r,r}^0$. Esiste dunque una $W_{r,r}^0$, determinata da \underline{x} , tale che ogni r-corda di $W_{h,k}^0$ per \underline{x} è r-corda di $W_{r,r}^0$. Siccome, ovviamente, ogni r-corda di tale $W_{r,r}^0$ è anche r-corda di $W_{h,k}^0$ si ha che

TEOREMA 2.1. Se \underline{x} appartiene a $W_{h,k}^r - W_{h,k}^{r-1}$ l'insieme delle r -corde di $W_{h,k}^0$ per \underline{x} coincide con l'insieme delle r -corde per \underline{x} di una $W_{r,r}^0$ subordinata a $W_{h,k}^0$.

OSSERVAZIONE 2.1. Indichiamo con $W_{r,r}^0(\underline{x})$ la $W_{r,r}^0$ che, a norma del teorema precedente, contiene i punti d'appoggio delle r -corde per \underline{x} della $W_{h,k}^0$. E' ovvio che se si considera una qualunque $\bar{W}_{r,r}^0$ di $W_{h,k}^0$ si ha $\bar{W}_{r,r}^0 = W_{r,r}^0(\underline{x})$, per tutti e soli i punti \underline{x} dello spazio di appartenenza di $\bar{W}_{r,r}^0$, che non appartengono alla $\bar{W}_{r,r}^{r-1}$.

OSSERVAZIONE 2.2. Per $h = r = 1$, dal teorema 2.1 segue la proposizione di Bonera al n. 19 della nota [2] secondo la quale le corde di una $W_{1,k}^0$ che passano per un punto dello spazio di appartenenza della varietà senza appartenere alla varietà stessa sono tutte e sole le rette di un S_3 per il punto avente in comune con la $W_{1,k}^0$ una quadrica, luogo dei punti d'appoggio delle corde anzidette.

OSSERVAZIONE 2.3. Consideriamo il caso $h = k = r$, cioè una $W_{r,r}^0$. La varietà $W_{r,r}^r$ è allora lo spazio d'appartenenza σ di $W_{r,r}^0$. Si vede facilmente che le r -corde di $W_{r,r}^0$ che passano per il punto generico \underline{x} di σ riempiono σ . Per dimostrarlo basta provare che fissato un ulteriore punto generico \underline{y} di σ esistono delle r -corde di $W_{r,r}^0$ che contengono \underline{x} e \underline{y} e cioè che esistono due sistemi linearmente indipendenti di $r+1$ vettori (\underline{u}) e (\underline{v}) tali che

$$x_i = \sum_{\ell=0}^r \lambda_{\ell} u_i^{\ell} v^{\ell},$$

$$y_i = \sum_{\ell=0}^r \lambda_{\ell} u_i^{\ell} v^{\ell},$$

ove le λ_{ℓ} sono opportuni scalari.

Osserviamo ora che assegnare i vettori \underline{v} significa fissare un riferimento in V_r nel quale il punto \underline{x}_i ha coordinate $(\underline{u}_i^0, \dots, \underline{u}_i^r)$ e il punto \underline{y}_i ha coordinate $(\lambda_0 \underline{u}_i^0, \dots, \lambda_r \underline{u}_i^r)$. Consideriamo un'omografia ω che muta i punti \underline{x}_i nei punti \underline{y}_i che, per la genericità dei punti \underline{x}_i e \underline{y}_i , può ritenersi di tipo generale. Si può allora determinare un riferimento (\underline{v}) in modo che la matrice dell'omografia sia di tipo diagonale. In tale riferimento le coordinate dei punti \underline{x}_i e \underline{y}_i saranno nella relazione richiesta.

Riprendiamo ora a considerare una qualunque $W_{h,k}^0$, un punto \underline{x} di $W_{h,k}^r - W_{h,k}^{r-1}$ e la relativa $W_{r,r}^0(\underline{x})$. Dimostriamo che lo spazio di appartenenza σ di $W_{r,r}^0(\underline{x})$

interseca $W_{h,k}^0$ soltanto in $W_{r,r}^0(x)$. Per l'osservazione 2.1 il punto \underline{x} può ritenersi generico in σ . Allora, per quanto si è visto, le r -corde di $W_{r,r}^0(x)$ per \underline{x} riempiono σ . Supponiamo che σ abbia in comune con $W_{h,k}^0$ un punto \underline{y} non appartenente a $W_{r,r}^0(x)$. Esistono dunque delle r -corde di $W_{r,r}^0(x)$ per \underline{x} e \underline{y} ed esse avrebbero in comune con $W_{h,k}^0$ $r+2$ punti e ciò contraddice la prop. 2.5.

Supponiamo ancora $\underline{x} \in W_{h,k}^r - W_{h,k}^{r-1}$ e consideriamo un punto \underline{y} della $W_{r,r}^0(x)$. La retta \underline{xy} non può intersecare $W_{h,k}^{r-2}$ fuori di $W_{h,k}^0$. Infatti se \underline{z} fosse un punto di \underline{xy} esterno a $W_{h,k}^0$, esisterebbero $r-1$ punti di $W_{h,k}^0$ congiunti da un S_{r-2} passante per \underline{z} . Tali punti, con \underline{y} , determinerebbero una $(r-1)$ -corda di $W_{h,k}^0$ contenente la retta \underline{yz} e quindi \underline{x} , sicché \underline{x} appartenerrebbe a $W_{h,k}^{r-1}$, contro l'ipotesi.

La retta \underline{xy} interseca $W_{r,r}^{r-1}$, fuori di $W_{r,r}^0$, in un punto (e uno soltanto). Infatti, nello spazio di appartenenza di $W_{r,r}^0$, $W_{r,r}^{r-1}$ è un'ipersuperficie di ordine $r+1$ che passa con molteplicità r per $W_{r,r}^0$ [1]. La retta \underline{xy} interseca pertanto $W_{r,r}^{r-1}$ in \underline{y} , contato r -volte, e in un ulteriore punto \underline{x}' (a meno che non sia tangente in \underline{y} a $W_{r,r}^{r-1}$).

Per \underline{x}' passano delle $(r-1)$ -corde di $W_{r,r}^0$ (e quindi di $W_{h,k}^0$) e, per il teorema 2.1, i loro punti d'appoggio appartengono ad una $W_{r-1,r-1}^0$. Gli spazi congiungenti tali $(r-1)$ -corde con \underline{y} (o, se si vuole, con \underline{x}) danno r -corde di $W_{h,k}^0$. Ogni r -corda per \underline{x} e \underline{y} si ottiene nel modo anzidetto. Infatti se C_r è una r -corda per \underline{x} e \underline{y} , detti $\underline{y}_0 = \underline{y}, \underline{y}_1, \dots, \underline{y}_r$ i suoi punti d'appoggio, si ha che $\underline{y}_1, \dots, \underline{y}_r$ determinano una $(r-1)$ -corda che interseca \underline{xy} in un punto che coincide col punto \underline{x}' anzidetto. Si ha dunque il

TEOREMA 2.2. *Le r -corde di $W_{h,k}^0$ per un punto \underline{x} di $W_{h,k}^r - W_{h,k}^{r-1}$ e per un punto generico \underline{y} di $W_{r,r}^0(x)$ hanno gli ulteriori punti d'appoggio sulla $W_{r-1,r-1}^0$ relativa al punto \underline{x}' in cui \underline{xy} interseca, fuori di $W_{r,r}^0$, la $W_{r,r}^{r-1}$.*

OSSERVAZIONE 2.4. Supponiamo ora che \underline{x} sia un punto di $W_{h,k}^{r-1} - W_{h,k}^{r-2}$ e, detta C_r una r -corda di $W_{h,k}^0$ per \underline{x} , indichiamo con (\underline{x}^k) una base di C_r appartenente a $W_{h,k}^0$. Ponendo, come di consueto, $\underline{u}^k = \psi_u(\underline{x}^k)$, $\underline{v}^k = \psi_v(\underline{x}^k)$, si vede subito che se \underline{x} non appartiene allo spazio determinato da r dei punti \underline{x}^k , uno almeno dei due sistemi (\underline{u}^k) e (\underline{v}^k) è dipendente. Supponiamo infatti che uno dei due sistemi, ad esempio (\underline{v}^k) , sia indipendente. Allora si ha

$$(6) \quad x_i = \sum_{\ell=0}^r u_{i\ell}^{\ell} v_{\ell}^{\ell}, \quad ,$$

e le $\overset{k}{u}_i$ sono le coordinate del punto $\overset{k}{x}_i$ in un riferimento di $[\overset{k}{V}]$ che ha come vertici della piramide fondamentale i punti $\overset{k}{v}$. Se nelle (6) manca una $\overset{k}{u}_i$ i punti $\overset{k}{x}_i$ appartengono allo spazio determinato da r degli $r+1$ punti $\overset{k}{v}$ e il punto $\overset{k}{x}$ appartiene ad una $(r-1)$ -corda di $W_{h,k}^O$ congiungente r dei punti $\overset{k}{x}$. Se invece ognuna delle $\overset{k}{u}_i$ compare in almeno una delle (6) i punti $\overset{k}{u}$ sono dipendenti perché i punti $\overset{k}{x}_i$ determinano uno spazio di dimensione $r-1$.

Se $\overset{k}{x}$ appartiene allo S_{r-1} che congiunge r dei punti $\overset{k}{x}$, C_r si ottiene congiungendo il detto S_{r-1} , che è una $(r-1)$ -corda di $W_{h,k}^O$ per $\overset{k}{x}$, con un punto della varietà ad esso esterno. Se $(\overset{k}{u})$ è dipendente lo spazio $[\overset{k}{u}]$ coincide con $S^U(x)$, di dimensione $r-1$, mentre $[\overset{k}{v}]$ o coincide con $S^V(x)$ o ha dimensione r e contiene propriamente $S^V(x)$. Ne segue che i punti $\overset{k}{v}$ possono appartenere ad un qualsiasi spazio di dimensione r di V_k passante per $S^V(x)$. Ciò che si può affermare in questo caso riguardo i punti $\overset{k}{x}$ è che essi appartengono alla $W_{r-1,k}^O$ immagine tramite ϕ di $S^U(x) \times V_k$. Se invece sono i punti $\overset{k}{v}$ ad essere dipendenti, i punti $\overset{k}{x}$ appartengono alla $W_{h,r-1}^O$, immagine mediante ϕ di $U_h \times S^V(x)$.

§ 3. Consideriamo ora l'ipersuperficie $X_{i_0 \dots i_{r+1}}^{j_0 \dots j_{r+1}}$ e indichiamo con \bar{C}_r una delle r -corde di $W_{h,k}^O$ in essa contenute e con $\overset{v}{x}$ ($\ell = 0, \dots, r$) i relativi punti d'appoggio. Un punto $\overset{v}{x}$ di \bar{C}_r ha vettore coordinato

$$\overset{v}{x} = \sum_{\ell=0}^r \lambda_{\ell} \bar{x}^{\ell}$$

Tenuto conto che

$$\frac{\partial X_{i_0 \dots i_{r+1}}^{j_0 \dots j_{r+1}}}{\partial x_{i_{\mu} j_{\nu}}} \approx X_{i_0 \dots \hat{i}_{\mu} \dots i_{r+1}}^{j_0 \dots \hat{j}_{\nu} \dots j_{r+1}},$$

l'equazione dell'iperpiano tangente a $X_{i_0 \dots i_{r+1}}^{j_0 \dots j_{r+1}}$ in $\overset{v}{x}$ è, con ovvio significato del simbolo,

$$\sum x_{i_{\mu} j_{\nu}} X_{i_0 \dots \hat{i}_{\mu} \dots i_{r+1}}^{j_0 \dots \hat{j}_{\nu} \dots j_{r+1}} = 0,$$

ma, essendo

$$\overset{v}{x}_{ij} = \sum_{\ell=0}^r \lambda_{\ell} \overset{k}{u}_i \overset{k}{v}_j$$

risulta

$$\hat{x}_{i_0 \dots i_\mu}^{j_0 \dots j_\nu \dots j_{r+1}} = \lambda_0 \dots \lambda_r U_{i_\mu} V_{j_\nu}$$

ove U_{i_μ} e V_{j_ν} sono i determinanti delle matrici che si ottengono da

$$\begin{pmatrix} u_{i_0}^0 & \dots & u_{i_0}^r \\ \dots & \dots & \dots \\ u_{i_{r+1}}^0 & \dots & u_{i_{r+1}}^r \end{pmatrix} \text{ e } \begin{pmatrix} v_{j_0}^0 & \dots & v_{j_{r+1}}^0 \\ \dots & \dots & \dots \\ v_{j_0}^r & \dots & v_{j_{r+1}}^r \end{pmatrix}$$

sopprimendo rispettivamente la riga di posto i_μ e la colonna di posto j_ν .

Ne segue che l'iperpiano tangente a $x_{i_0 \dots i_{r+1}}^{j_0 \dots j_{r+1}}$ è fisso lungo \bar{C}_r .

La proprietà si estende, ovviamente, ad ogni ipersuperficie del siste-

ma Σ^r , determinato dalle $x_{i_0 \dots i_{r+1}}^{j_0 \dots j_{r+1}}$, sicché vale la

PROPOSIZIONE 3.1. *Un'ipersuperficie di Σ^r ammette un iperpiano tangente fisso lungo ogni r-corda di $W_{h,k}^0$.*

Poiché la $W_{h,k}^r$ è intersezione completa delle ipersuperfici $x_{i_0 \dots i_{r+1}}^{j_0 \dots j_{r+1}}$ lo spazio ad essa tangente è fisso lungo ogni r-corda di $W_{h,k}^0$.

Consideriamo ora una $W_{r,r}^0$ subordinata a $W_{h,k}^0$. Il suo spazio di appartenenza σ è luogo di r-corde di $W_{r,r}^0$ e quindi di $W_{h,k}^0$, sicché è contenuto in $W_{h,k}^r$. Di più si dimostra la proprietà seguente, già contenuta in [1].

PROPOSIZIONE 3.2. *La varietà $W_{h,k}^r$ ha spazio tangente fisso lungo lo spazio di appartenenza di una $W_{r,r}^0$ subordinata a $W_{h,k}^0$.*

Siano infatti \underline{x} e \underline{y} due punti generici dello spazio di appartenenza σ di $W_{r,r}^0$. Si ha allora $W_{r,r}^0 = W_{r,r}^0(\underline{x})$ ed esiste qualche r-corda per \underline{x} e \underline{y} (Osserv. 2.3). Ne segue che gli spazi tangenti in \underline{x} e in \underline{y} coincidono per la prop. 3.1

Consideriamo ora una $W_{r+1,r+1}^r$, che è un'ipersuperficie di ordine $r+2$ di $S_{(r+1)(r+3)}$. La prop. 3.2 comporta che tale ipersuperficie è a punti $r(r+2)$ -parabolici. Essa pertanto fa parte della propria hessiana con molteplicità almeno uguale a $r(r+2)$ (cfr. ad es. [7]). D'altra parte l'ordine

dell'hessiana di $W_{r+1,r+1}^r$ e $r(r+2)^2$. Ne segue la

PROPOSIZIONE 3.3. *La $W_{r+1,r+1}^r$, contata $r(r+2)$ volte, coincide con la propria hessiana.*

Per $r = 1$, questa proposizione risponde ad un quesito formulato in [8].

§ 4. Abbiamo già ricordato che, data la varietà di Segre $W_{h,k}^0$, rappresentata dalle (1), e detti U_r, V_s due sottospazi di U_h e V_k , l'immagine in ϕ di $U_r \times V_s$ è una $W_{r,s}^0$. In questo numero dimostreremo un teorema che inverte parzialmente la proprietà anzidetta.

A questo scopo cominciamo col ricordare che alla $W_{h,k}^0$ appartengono il sistema, di dimensione h , di spazi lineari S_k ; immagini mediante ϕ del prodotto di un punto \underline{u} di U_h per V_k e un sistema, di dimensione k , di S_h , immagini mediante ϕ del prodotto di un punto \underline{v} di V_k per U_h . Indicheremo questi sistemi di spazi rispettivamente con Σ^u e Σ^v . Due spazi di uno stesso sistema sono sghembi, due spazi di sistemi diversi hanno un punto, e uno soltanto, in comune; per ogni punto di $W_{h,k}^0$ passa uno spazio, ed uno soltanto, di ciascuno dei due sistemi. Si ha inoltre che gli spazi di ognuno dei due sistemi punteggiano proiettivamente gli spazi dell'altro [9].

Gli spazi lineari dei sistemi Σ^u e Σ^v sono massimali per $W_{h,k}^0$, nel senso che ogni spazio lineare appartenente a $W_{h,k}^0$ è contenuto in uno spazio di uno dei sistemi Σ^u, Σ^v . Una semplice dimostrazione di questa proprietà è la seguente. Sia r una retta appartenente a $W_{h,k}^0$. Detti $\underline{x} = \phi(\underline{u}, \underline{v}), \underline{y} = \phi(\underline{u}, \underline{v})$ due punti distinti di r , si ha, per l'Osservazione 2.4, che uno dei due sistemi $(\underline{u}, \underline{u}), (\underline{v}, \underline{v})$ è dipendente e quindi $\underline{u} = \underline{u}$ o $\underline{v} = \underline{v}$. Nel primo caso la retta appartiene a uno spazio di Σ^u , nel secondo ad uno spazio di Σ^v .

Dimostrata così la proprietà per le rette, consideriamo un S_λ , con $\lambda > 1$, appartenente a $W_{h,k}^0$ e un suo punto \underline{x} e indichiamo con \bar{S}^u, \bar{S}^v gli spazi di Σ^u e Σ^v che passano per \underline{x} . Ogni retta di S_λ per \underline{x} deve appartenere ad uno degli spazi \bar{S}^u, \bar{S}^v . Ma le rette di S_λ per \underline{x} costituiscono un sistema algebrico irriducibile, quindi esse appartengono tutte ad uno degli spazi \bar{S}^u, \bar{S}^v .

Ciò posto, dimostriamo il

TEOREMA 4.1. *Una $W_{r,s}^0$ appartenente a $W_{h,k}^0$ è l'immagine mediante ϕ del prodotto di un sottospazio di dimensione r di uno dei due spazi U_h, V_k per un sottospazio di dimensione s dell'altro oppure del prodotto di un punto di uno dei due spazi per una $W_{r,s}^0$ appartenente all'altro.*

Sia $W_{r,s}^0$ una varietà di Segre subordinata a $W_{h,k}^0$. Per essa adotteremo gli stessi simboli sopralineati usati nei numeri precedenti per la $W_{h,k}^0$. In particolare, indicheremo con \bar{U}_r , \bar{V}_s due spazi lineari su K , delle dimensioni r e s , e con $\bar{\varphi}$ l'applicazione invertibile canonica di $\bar{U}_r \times \bar{V}_s$ su $\bar{W}_{r,s}^0$. Supporremo anche, com'è lecito, $r \leq s$ (così come, fin dall'inizio, si è supposto $h \leq k$). L'inclusione $\bar{W}_{r,s}^0 \subseteq W_{h,k}^0$ comporta $r+s \leq h+k$ e $s \leq k$.

Se $\bar{W}_{r,s}^0$ è contenuta in uno spazio lineare di $W_{h,k}^0$, essa è contenuta in uno spazio di $\bar{\Sigma}^u$ o di $\bar{\Sigma}^v$. Supponiamo, per fissare le idee, che essa sia contenuta nello spazio $\bar{S}_k = \phi(\bar{u} \times V_k)$ di $\bar{\Sigma}^u$. Siccome la restrizione di ψ_v a \bar{S}_k è un'omografia tra \bar{S}_k e V_k si ha che $\bar{W}_{r,s}^0$ è l'immagine in ϕ del prodotto di \bar{u} per una $W_{r,s}^0$ contenuta in V_k . L'eventualità considerata è la sola che si presenta per $r = 0$, in quanto, in tal caso, la $\bar{W}_{r,s}^0$ è uno spazio lineare, di dimensione s . Ai fini della dimostrazione del teorema possiamo dunque supporre, nella discussione seguente, $r > 0$ e $\bar{W}_{r,s}^0$ non contenuta in uno spazio lineare di $W_{h,k}^0$.

Consideriamo una $\bar{W}_{1,s}^0$ ($1 \leq s \leq k$) appartenente a $W_{h,k}^0$. $\bar{\Sigma}^u$ è allora un sistema, di dimensione uno, di S_s e $\bar{\Sigma}^v$ un sistema, di dimensione s , di rette. Se S_s appartiene a $\bar{\Sigma}^u$, si avrà $S_s = \phi(\bar{u} \times V_s)$, per assegnati $\bar{u} \in U_h$, $V_s \subseteq V_k$, oppure $S_s = \phi(U_s \times \bar{v})$, con $U_s \subseteq U_h$, $\bar{v} \in V_k$. Per l'irriducibilità del sistema $\bar{\Sigma}^u$ si presenta uno stesso dei casi prospettati per ogni $S_s \in \bar{\Sigma}^u$. Supponiamo, per fissare le idee, che si abbia $S_s = \phi(\bar{u} \times V_s)$ e notiamo che il punto \bar{u} non può essere fisso al variare di S_s in $\bar{\Sigma}^u$, perché in tal caso $\bar{W}_{1,s}^0$ apparterrebbe allo spazio lineare $\phi(\bar{u} \times V_k)$. Analogamente si ha, per ogni S_1 di $\bar{\Sigma}^v$, $S_1 = \phi(\bar{u} \times V_1)$ o $S_1 = \phi(U_1 \times \bar{v})$. Siccome ogni S_s di $\bar{\Sigma}^u$ interseca ogni retta di $\bar{\Sigma}^v$, il primo caso non può presentarsi, perché due insiemi del tipo $\bar{u}' \times V_k$, $\bar{u}'' \times V_1$ con $\bar{u}' \neq \bar{u}''$ non hanno coppie comuni. Si ha dunque $S_1 = \phi(U_1 \times \bar{v})$ e, per lo stesso motivo, la retta U_1 deve contenere tutti i punti \bar{u} relativi agli S_s di $\bar{\Sigma}^u$ e quindi è fissa al variare di S_1 in $\bar{\Sigma}^v$. Di più lo spazio V_s relativo a uno qualunque degli S_s deve contenere tutti i punti \bar{v} relativi alle rette S_1 e quindi V_s è fisso al variare di S_s . Si conclude che $\bar{W}_{1,s}^0 = \phi(U_1 \times V_s)$.

Dimostrato così il teorema per $r = 1$, possiamo procedere per induzione su r , dimostrando che se il teorema è vero per $r \leq l$ esso è vero per $r = l+1$.

Consideriamo una $\bar{W}_{l+1,s}^0$ ($1 < l+1 \leq s \leq k$) appartenente a $W_{h,k}^0$ e le varietà, ad essa subordinate, $\bar{W}_{l,s}^0 = \bar{\Gamma}(\bar{U}_l \times \bar{V}_s)$, ove \bar{U}_l è un sottospazio di

$\bar{U}_{\ell+1}$. Esse formano un sistema algebrico irriducibile, Σ , di dimensione $\ell+1$, e due di esse si intersecano in una $\bar{W}_{\ell-1,s}^0$, immagine in ϕ del prodotto di \bar{V}_s per lo $\bar{U}_{\ell-1}$ intersezione degli \bar{U}_ℓ relativi alle due varietà. Per l'irriducibilità di Σ , se la generica $\bar{W}_{\ell,s}^0$ appartenesse ad uno spazio di Σ^u (o di Σ^v) lo stesso dovrebbe accadere per tutte le $\bar{W}_{\ell,s}^0$ di Σ ed esse dovrebbero essere contenute in uno stesso degli spazi di Σ^u (di Σ^v) in quanto due spazi di Σ^u (di Σ^v) non s'intersecano mentre, come s'è visto, due $\bar{W}_{\ell,s}^0$ di Σ s'intersecano in una $\bar{W}_{\ell-1,s}^0$. Ne seguirebbe, contro l'ipotesi, che $\bar{W}_{\ell+1,s}^0$ sarebbe contenuta in uno spazio lineare di $W_{h,k}^0$.

Per l'ipotesi d'induzione, si ha, con le notazioni consuete, $\bar{W}_{\ell,s}^0 = \phi(U_\ell \times V_s)$ oppure $\bar{W}_{\ell,s}^0 = \phi(U_s \times V_\ell)$, potendosi verificare una soltanto delle due eventualità, per l'irriducibilità di Σ . Supponiamo, per fissare le idee, che si presenti la prima. Siccome due delle $\bar{W}_{\ell,s}^0$ di Σ s'intersecano in una $\bar{W}_{\ell-1,s}^0$, che ha dimensione $\ell+s-1$, o gli spazi V_s relativi alle due varietà coincidono e gli U_ℓ s'intersecano in un $U_{\ell-1}$ o coincidono gli spazi U_ℓ e i V_s s'intersecano in uno spazio V_{s-1} . Quest'ultimo caso non può verificarsi altrimenti la $\bar{W}_{\ell-1,s}^0$, intersezione delle due $\bar{W}_{\ell,s}^0$ considerate, sarebbe l'immagine in ϕ di $U_\ell \times V_{s-1}$ e gli spazi di dimensione massima in essa contenuti avrebbero dimensione $s-1$ mentre una $W_{\ell-1,s}^0$ contiene un sistema di spazi di dimensione s . Ne segue che gli spazi V_s coincidono e gli spazi U_ℓ appartengono ad uno stesso $U_{\ell+1}$, giacché essi, ovviamente, non passano per uno stesso $U_{\ell-1}$, e quindi che $\bar{W}_{\ell+1,s}^0$ è l'immagine in ϕ del prodotto di tale $U_{\ell+1}$ per V_s .

§ 5. In questo numero esporremo alcune considerazioni sul sistema Σ^0 delle quadriche passanti per una $W_{1,k}^0$ ($k > 1$). Lo spazio d'appartenenza T della varietà, di dimensione $t = 2k+1$, s'identifica con $W_{1,k}^1$ e i sistemi Σ^u , Σ^v degli spazi massimali sono, rispettivamente, un sistema di dimensione 1 di S_k e un sistema, di dimensione k , di rette.

Indichiamo con Q una quadrica di T per $W_{1,k}^0$ e dimostriamo che, con le notazioni consuete, vale la

PROPOSIZIONE 5.1. *Se Q è specializzata, il suo spazio doppio interseca $W_{1,k}^0$ in una $W_{1,\ell}^0$ ($0 \leq \ell < k$) del tipo $\phi(U_1 \times V_\ell)$ e coincide con lo spazio d'appartenenza di tale varietà.*

Indichiamo con D lo spazio doppio di Q e osserviamo, in primo luogo, che

se \underline{x} è un punto di D non appartenente a $W_{1,k}^O$, ogni 1-corda C_1 di $W_{1,k}^O$ per \underline{x} , ovviamente appartenente a Q , appartiene a D . Infatti, se C_1 fosse semplice per Q , si avrebbe un S_{2k} tangente a Q lungo C_1 e ad esso dovrebbero appartenere gli S_k di Σ^u passanti per i punti comuni a C_1 e $W_{1,k}^O$ e questo è assurdo perché tali spazi sono sghembi. Osserviamo poi che, come si prova con un'argomentazione analoga, se \underline{x} è un punto di D appartenente a $W_{1,k}^O$, la retta di Σ^v passante per \underline{x} appartiene a D .

Dalla prima delle osservazioni premesse segue che l'intersezione di D con $W_{1,k}^O$ non è vuota; dalla seconda, che tale intersezione è una $W_{1,\ell}^O$ del tipo $\phi(U_1 \times V_\ell)$, con $0 \leq \ell < k$. Ancora dalla prima osservazione si deduce poi che D è lo spazio d'appartenenza di tale $W_{1,\ell}^O$, in quanto da essa risulta che ogni 1-corda di $W_{1,k}^O$ passante per un punto \underline{x} di D non appartenente a $W_{1,k}^O$ è anche 1-corda di $W_{1,\ell}^O$.

Dimostriamo ora la

PROPOSIZIONE 5.2. *L'intero ℓ che compare nella prop. 5.1 ha la stessa parità di k .*

Per la prop. 5.1, D ha dimensione $2\ell+1$. Consideriamo un generico sottospazio \bar{D} di T di dimensione $2k-2\ell-1$ e indichiamo con \bar{Q} la quadrica, non specializzata, di dimensione $2(k-\ell-1)$, sezione di Q con \bar{D} . Uno spazio S_k di Σ^u sega D in un S_ℓ e quindi si proietta da D secondo un $S_{k+\ell+1}$, appartenente a Q , che sega \bar{D} in un $S_{k-\ell-1}$, appartenente a \bar{Q} , risultando uno spazio di dimensione massima di \bar{Q} . Gli $S_{k-\ell-1}$ così ottenuti costituiscono un sistema irriducibile e quindi appartengono a uno stesso dei due sistemi di spazi di dimensione massima di \bar{Q} . Se faremo vedere che essi sono sghembi fra loro, seguirà, per una proprietà ben nota, che $k-\ell-1$ è dispari e quindi l'asserto. Consideriamo, a questo scopo, due S_k di Σ^u , che indicheremo con S^1 e S^2 . Se le proiezioni \bar{S}^1, \bar{S}^2 di S^1, S^2 da D su \bar{D} avessero un S_r ($r \geq 0$) in comune, gli spazi proiettanti \bar{S}^1, \bar{S}^2 avrebbero in comune un $S_{2\ell+r+2}$ che segherebbe S^1 e S^2 in spazi di dimensione $\ell+r+1$. Questi spazi, e quindi S^1 e S^2 , avrebbero allora un S_r in comune e questo è assurdo, perché essi sono sghembi.

Se k è pari, ogni quadrica Q per $W_{1,k}^O$ è specializzata. Infatti, se non lo fosse, gli S_k di Σ^u sarebbero spazi di dimensione massima di Q , appartenenti a uno stesso sistema e questo è assurdo perché tali S_k sono sghembi a due a due. La proprietà si può enunciare dicendo che la dimensione dello spazio doppio di Q non può valere -1 , se k è pari. Si ha dunque

PROPOSIZIONE 5.3. Se Q è una quadrica per $W_{1,k}^0$, il suo spazio doppio ha dimensione del tipo $2\ell+1$, con $-1 \leq \ell < k$ e ℓ della stessa parità di k .

OSSERVAZIONE. La prop. 5.3 si può dimostrare più direttamente osservando che la matrice della quadrica generica di Γ^0 si può scrivere nella forma

$$\begin{pmatrix} 0 & A \\ A_{-1} & 0 \end{pmatrix}$$

ove A è una matrice emisimmetrica d'ordine $k+1$ e A_{-1} è la sua trasposta. L'arbitrarietà di A dimostra che ℓ può assumere tutti i valori indicati nella prop. 5.3.

§ 6. Le proprietà viste nel numero 5 trovano un'applicazione che ci sembra interessante nello studio della varietà $G(1,n)$ di Grassmann, rappresentativa delle rette di un S_n . Ricordiamo che una $G(k,n)$, in cui si può supporre $k < \frac{n}{2}$, si rappresenta biunivocamente, per proiezione, su uno spazio proiettivo S , di dimensione $(k+1)(n-k)$, in modo che il sistema delle sezioni iperpiane si trasforma nel sistema delle forme d'ordine $k+1$ passanti con molteplicità k per una $W_{k,n-k-1}^0$ appartenente ad un iperpiano τ di S , e, in conseguenza, con molteplicità $k-r$ per $W_{k,n-k-1}^r$ ($r = 1, \dots, k-1$) [3]. Ricordiamo ancora che in tale rappresentazione una $G(k,m)$, immagine degli S_k di un sottospazio S_m di S_n , va in uno spazio lineare di dimensione $(k+1)(m-k)$ che interseca τ in un iperpiano, spazio di appartenenza di una $W_{k,m-k-1}^0$, subordinata a $W_{k,n-k-1}^0$, del tipo $(U_k \times V_{m-k-1})$ e che, viceversa, ogni spazio siffatto rappresenta una grassmanniana $G(k,m)$, subordinata a $G(k,n)$, rappresentativa degli S_k di un S_m di S_n . Nel caso che qui andiamo a considerare, di una $G(1,n)$, con $n \geq 3$, S ha dimensione $2n-2$ e il sistema delle sezioni iperpiane di G si rappresenta col sistema delle quadriche di S per una $W_{1,n-2}^0$ di un iperpiano τ di S ; uno spazio di dimensione $2(\ell+1)$ intersecante τ in un $S_{2\ell+1}$, spazio di appartenenza di una $W_{1,\ell}^0$ subordinata a $W_{1,n-2}^0$, è immagine di una $G(1,\ell+2)$ subordinata a $G(1,n)$ e rappresentativa delle rette di un $S_{\ell+2}$ di S_n .

Ciò posto, consideriamo un punto \underline{a} di $G(1,n)$ e indichiamo con \underline{a}' la sua immagine in S , che possiamo supporre esterna a τ . Ovviamente, un iperpiano α è tangente in \underline{a} a $G(1,n)$ se, e soltanto se, la sua intersezione con $G(1,n)$ è

rappresentata in S da una quadrica $Q(\alpha)$ avente un punto doppio in \underline{a}' , cioè dal cono proiettante da \underline{a}' una quadrica \bar{Q} di τ passante per $W_{1,n-2}^0$. Se \bar{Q} ha uno spazio doppio \bar{D} , di dimensione d (≥ 0), Q ha come spazio doppio lo spazio D , di dimensione $d+1$, proiettante \bar{D} da \underline{a}' . Ora, per quanto si è visto nel numero 5, se n è pari \bar{Q} ha uno spazio doppio di dimensione del tipo $4\lambda+1$ ($\lambda \geq 0$) e quindi Q ha uno spazio doppio di dimensione del tipo $2(2\lambda+1)$. Se n è dispari, \bar{Q} può essere priva di punti doppi o avere uno spazio \bar{D} di punti doppi di dimensione $4\lambda+3$ ($\lambda \geq 0$) onde Q è dotata o del solo punto doppio \underline{a}' o di uno spazio doppio di dimensione $4\lambda+4$. Ciò comporta che l'iperpiano α considerato, tangente in \underline{a} , è tangente in tutta la varietà di $G(1,n)$ immagine di D . Tenendo conto delle circostanze richiamate relative alla rappresentazione di $G(1,n)$, si conclude che, per $n \geq 3$, vale la

PROPOSIZIONE 6.1. *Sia $G(1,n)$ la grassmanniana delle rette di un S_n . Se n è dispari, un iperpiano tangente a $G(1,n)$ o è tangente in un solo punto o in una $G(1,2\lambda+3)$ ($0 \leq \lambda \leq \frac{n-5}{2}$) immagine delle rette di un $S_{2\lambda+3}$ di S_n ; se n è pari, esso è tangente lungo una $G(1,2\lambda+2)$ ($0 \leq \lambda \leq \frac{n-4}{2}$), immagine delle rette di un $S_{2\lambda+2}$.*

Tenuto conto che le sezioni iperpiane della $G(1,n)$ rappresentano i complessi lineari di rette di S_n la proposizione precedente dà luogo a proprietà di tali complessi già note dai lavori [4],[5].

OSSERVAZIONE. Per $n = 4$, la proposizione precedente afferma in sostanza che un iperpiano tangente a $G(1,4)$ è necessariamente tangente ad essa lungo un piano. Questa proprietà si trova anche in [10].

Risultati relativi ad iperpiani pluritangenti una $G(k,n)$ sono anche contenuti in [11].

§ 7. Passiamo a considerare la $W_{2,2}^0$. Essa è una varietà di dimensione 4 e ordine 6, appartenente a uno spazio T di dimensione 8 e i suoi spazi massimali sono piani, distribuiti in due sistemi di dimensione 2.

La varietà $W_{2,2}^1$ delle corde di $W_{2,2}^0$ è una forma del terzo ordine di T , passante doppiamente per $W_{2,2}^0$. Ovviamente, il sistema Γ^0 delle quadriche passanti per $W_{2,2}^0$ coincide col sistema delle quadriche polari dei punti di T rispetto a $W_{2,2}^1$. Ma (prop. 3.3) questa forma coincide con la propria hessiana. Pertanto

PROPOSIZIONE 7.1. $W_{2,2}^1$ è il luogo dei punti doppi delle quadriche degeneri di Σ^0 .

Indichiamo con $Q(x)$ la quadrica polare del punto x rispetto a $W_{2,2}^1$. Se x appartiene a $W_{2,2}^0$, $Q(x)$ coincide col cono osculatore a $W_{2,2}^1$ in x e quindi ha come spazio doppio lo S_4 tangente a $W_{2,2}^0$ in x , che indicheremo con $\tau(x)$.

Supponiamo che x appartenga a $W_{2,2}^1 - W_{2,2}^0$. Per il teorema 2.1, le corde di $W_{2,2}^0$ passanti per x sono le rette di un S_3 per x , che indicheremo con $S_3(x)$ e il luogo dei loro punti d'appoggio è una $W_{1,1}^0$, cioè una quadrica, che denoteremo con $q(x)$, la quale esaurisce l'intersezione di $S_3(x)$ con $W_{2,2}^0$ (Oss.2.3).

L'intersezione di $Q(x)$ con l'iperpiano $P(x)$ tangente a $W_{2,2}^1$ in x coincide col cono osculatore in x alla sezione di $W_{2,2}^1$ con $P(x)$. Ma (prop. 3.2) $P(x)$ è tangente a $W_{2,2}^1$ lungo $S_3(x)$ e quindi il cono anzidetto ammette $S_3(x)$ come spazio doppio. Si ha dunque che anche $Q(x)$ è tangente a $P(x)$ lungo $S_3(x)$. Ne segue che $Q(x)$ possiede un piano doppio, $p(x)$, contenuto in $S_3(x)$ e non passante per x .

Ricordiamo ora che, per una nota proprietà della polarità rispetto ad una forma del terz'ordine (cfr. ad es. [12]), se x e y sono due punti di T , $Q(x)$ ha un punto doppio in y se, e soltanto se, $Q(y)$ ha un punto doppio in x . Da essa segue che le quadriche di Σ^0 aventi punto doppio in un punto x di $W_{2,2}^1$ sono le quadriche polari rispetto a $W_{2,2}^1$ dei punti del piano $p(x)$, se x non appartiene a $W_{2,2}^0$; le quadriche polari dei punti di $\tau(x)$, se x appartiene a $W_{2,2}^0$. Esse formano pertanto una rete nel primo caso, un sistema lineare di dimensione 4 nel secondo.

Sia $Q(y)$ una delle quadriche aventi punto doppio in x . Lo spazio doppio di $Q(y)$ passa per x e, per quanto si è detto, è un piano doppio, $p(y)$, se y non appartiene a $W_{2,2}^0$, un S_4 doppio, $\tau(y)$, se appartiene a $W_{2,2}^0$. I punti y per cui si verifica la seconda circostanza sono quelli che appartengono all'intersezione di $W_{2,2}^0$ con $\tau(x)$, se x appartiene a $W_{2,2}^0$; con $p(x)$, se x non appartiene a $W_{2,2}^0$. Essi possono essere anche caratterizzati come i punti di contatto degli S_4 tangenti a $W_{2,2}^0$ passanti per x .

Ora l'intersezione di $W_{2,2}^0$ con $\tau(x)$ è costituita dai due piani della varietà passanti per x . Ne segue che, se x appartiene a $W_{2,2}^0$, le quadriche di Σ^0 aventi un S_4 doppio passante per x si distribuiscono in due reti aventi in comune soltanto la quadrica che costituisce il cono osculatore a $W_{2,2}^1$ in x .

Supponiamo \underline{x} appartenente a $W_{2,2}^1 - W_{2,2}^0$. L'intersezione di $p(x)$ con $W_{2,2}^0$ è la conica $\gamma(x)$ comune a $p(x)$ e $q(x)$. Detto \underline{y} un punto di $\gamma(x)$, si ha che $\tau(\underline{y})$ passa per \underline{x} . Ne segue, ovviamente, che il piano tangente in \underline{y} a $q(x)$ passa per \underline{x} . Si ha dunque che $p(x)$ è il piano polare di \underline{x} rispetto a $q(x)$ e che $\gamma(x)$ è non degenere. Nel caso che stiamo considerando, si ha dunque che le quadriche di Σ^0 aventi un S_4 doppio passante per \underline{x} costituiscono un sistema quadratico irriducibile, di dimensione 1.

Le osservazioni fatte si riassumono nelle proposizioni seguenti.

PROPOSIZIONE 7.2. *Le quadriche degeneri di Σ^0 hanno spazio doppio di dimensione 2 o 4.*

PROPOSIZIONE 7.3. *Se \underline{x} appartiene a $W_{2,2}^1 - W_{2,2}^0$, le quadriche di Σ^0 che hanno punto doppio in \underline{x} formano una rete e sono dotate di un piano doppio, ad eccezione di quelle appartenenti ad un sistema quadratico irriducibile di dimensione 1, che sono invece dotate di un S_4 doppio, tangente a $W_{2,2}^0$.*

PROPOSIZIONE 7.4. *Se \underline{x} appartiene a $W_{2,2}^0$, le quadriche di Σ^0 che hanno punto doppio in \underline{x} formano un sistema lineare di dimensione 4 e sono dotate di un piano doppio, ad eccezione di quelle appartenenti a due reti, che sono invece dotate di un S_4 doppio, tangente a $W_{2,2}^0$, aventi in comune soltanto il cono quadratico osculatore a $W_{2,2}^1$ in \underline{x} .*

Le proprietà esposte della $W_{2,2}^0$ trovano applicazione, per il tramite della rappresentazione spaziale di Semple, ricordata nel numero 6, nello studio della grassmanniana $G(2,5)$ dei piani di S_5 , consentendo di ritrovare in modo assai semplice, e completare, taluni risultati di C. Segre relativi agli iperpiani pluritangenti tale varietà, contenuti in [6]. Ricordiamo che la $G(2,5)$ è una varietà di dimensione 9 e ordine 42, appartenente a un S_{19} . La rappresentazione di Semple della $G(2,5)$ si ottiene proiettando la varietà dallo S_9 tangente in un suo punto 0 , che indicheremo con S^* , su un S_9 sghembo con esso, che indicheremo con \bar{S} . In tale rappresentazione il sistema delle sezioni iperpiane di $G(2,5)$ si trasforma nel sistema, che indicheremo con 0 , delle forme cubiche di \bar{S} passanti oppiamente per una $W_{2,2}^0$ e semplicemente per la relativa $W_{2,2}^1$. Lo spazio d'appartenenza T di queste varietà è un iperpiano di \bar{S} e risulta fondamentale per 0 . Al generico punto di T corrisponde il punto 0 e pertanto alle sezioni di $G(2,5)$ con gli iperpiani per 0 corrispondono le forme spezzate in T e in una quadrica di \bar{S} per $W_{2,2}^0$. Si noterà che T , contato tre volte, è una forma di \bar{S} , risultando precisamente immagine della sezio-

ne di $G(2,5)$ con l'iperpiano osculatore alla varietà in 0 .

Per snellire l'esposizione che segue, conviene introdurre talune denominazioni e richiamare dei risultati noti sulla $G(2,5)$. Consideriamo due punti distinti $\underline{a}, \underline{b}$ di $G(2,5)$ e indichiamo con α, β i piani di S_5 di cui essi sono immagini. Diremo che la coppia $\underline{a}, \underline{b}$ è *singolare* se i piani α, β sono incidenti e, quando occorra, diremo che essa è *singolare di prima specie*, se α, β hanno soltanto un punto in comune, *di seconda specie*, se hanno una retta in comune. Il tipo della coppia $\underline{a}, \underline{b}$ si determina anche senza far ricorso ai piani di S_5 che i due punti rappresentano. Infatti, tenendo conto che i fasci di piani di S_5 si rappresentano con le rette di $G(2,5)$, si ha, in primo luogo, che la coppia $\underline{a}, \underline{b}$ è *singolare di seconda specie* se, e soltanto se, la retta \underline{ab} appartiene a $G(2,5)$. Da proprietà note della $G(2,5)$, si ha poi che i punti \underline{b} che con \underline{a} formano una coppia *singolare* sono tutti, e soli, i punti, distinti da \underline{a} , della sezione di $G(2,5)$ con l'iperpiano osculatore a $G(2,5)$ in \underline{a} , sicché la coppia $\underline{a}, \underline{b}$ è *singolare* se, e soltanto se, l'iperpiano osculatore a $G(2,5)$ in uno dei due punti passa per l'altro. Ricordiamo ancora che i punti \underline{b} che insieme con \underline{a} formano coppia *singolare di seconda specie* sono tutti, e soli, i punti della sezione di $G(2,5)$ con lo S_9 ad essa tangente in \underline{a} , sezione che risulta essere il cono del sest'ordine che proietta da \underline{a} una $W_{2,2}^0$ [6].

Ciò posto supponiamo che i punti $\underline{a}, \underline{b}$ non appartengano all'iperpiano osculatore a $G(2,5)$ in 0 , cioè che le coppie $0, \underline{a}; 0, \underline{b}$ non siano singolari. Allora le loro immagini $\underline{a}', \underline{b}'$ in \bar{S} sono esterne a T e vale la

PROPOSIZIONE 7.5. *La coppia $\underline{a}, \underline{b}$ è singolare se, e soltanto se, la retta $\underline{a}'\underline{b}'$ è incidente la $W_{2,2}^1$ base di θ ed è singolare di seconda specie se, e soltanto se, $\underline{a}'\underline{b}'$ è incidente la $W_{2,2}^0$.*

Infatti la sezione di $G(2,5)$ con l'iperpiano osculatore in \underline{a} si rappresenta con la forma di θ che ha un punto triplo in \underline{a}' , cioè col cono che proietta da \underline{a}' la $W_{2,2}^1$ base. Pertanto $\underline{a}, \underline{b}$ è *singolare* se, e soltanto se, \underline{b}' appartiene a tale cono e ciò prova la prima parte dell'asserto. La seconda è ovvia, in quanto le rette di \bar{S} che rappresentano rette di $G(2,5)$ sono tutte e sole quelle incidenti la $W_{2,2}^0$. Consideriamo ora due punti distinti qualunque $\underline{a}, \underline{b}$ di $G(2,5)$ e proviamo la

PROPOSIZIONE 7.6. *Esistono iperpiani tangenti a $G(2,5)$ in \underline{a} e \underline{b} se, e soltanto se, la coppia $\underline{a}, \underline{b}$ è singolare.*

Per l'arbitrarietà di θ , si può supporre che le immagini \underline{a}' , \underline{b}' , di \underline{a} , \underline{b} in \bar{S} siano esterne a T . Se esiste un iperpiano tangente a $G(2,5)$ in \underline{a} e \underline{b} , la sua sezione con la varietà ha punti doppi in \underline{a} e \underline{b} e quindi la forma di θ che la rappresenta ha punti doppi in \underline{a}' , \underline{b}' . La retta $\underline{a}' \underline{b}'$ appartiene dunque alla forma. Ne segue che essa interseca T in un punto della $W_{2,2}^1$ base di θ e, per la prop. 7.5, che la coppia \underline{a} , \underline{b} è singolare. Inversamente, supposta la coppia \underline{a} , \underline{b} singolare, si ha, per la prop. 7.5, che la retta $\underline{a}' \underline{b}'$ interseca $W_{2,2}^1$ in un punto \underline{x} . L'imposizione ad una forma di θ di un punto doppio in \underline{a}' comporta dieci condizioni. Pertanto le forme di θ che hanno un punto doppio in \underline{a}' e passano per \underline{b}' dipendono almeno da 8 parametri. Ma esse, contenendo anche \underline{x} , contengono la retta $\underline{a}' \underline{b}'$ e ne segue che le condizioni da imporre affinché anche il punto \underline{b}' sia doppio sono 8, al più. Esistono dunque forme di θ aventi punti doppi in \underline{a}' e \underline{b}' ed esse sono immagini di sezioni di $G(2,5)$ con iperpiani tangenti in \underline{a} e \underline{b} .

Fissiamo ora una qualunque coppia singolare \underline{a} , \underline{b} e assumiamo θ generico su $G(2,5)$. Se esistono iperpiani tangenti in \underline{a} e \underline{b} a $G(2,5)$ e passanti per θ , le loro sezioni con $G(2,5)$ si rappresenteranno in \bar{S} con forme spezzate in T e in quadriche passanti per $W_{2,2}^0$ e dotate di punti doppi nelle immagini \underline{a}' , \underline{b}' di \underline{a} e \underline{b} e quindi passanti doppiamente per la retta $\underline{a}' \underline{b}'$. Indichiamo con $\theta(\underline{a}', \underline{b}')$ il sistema formato da tali quadriche. È chiaro che inversamente ogni quadrica di $\theta(\underline{a}', \underline{b}')$, completata con T , è immagine della sezione di $G(2,5)$ con un iperpiano tangente in \underline{a} e \underline{b} e passante per θ e che lo spazio doppio di una tale quadrica è l'immagine della varietà secondo cui l'iperpiano è tangente a $G(2,5)$. Ora, detto \underline{x} il punto in cui la retta $\underline{a}' \underline{b}'$ interseca T , si ha, ovviamente, che le quadriche di $\theta(\underline{a}', \underline{b}')$ sono tutte, e sole, quelle che proiettano da un punto di $\underline{a}' \underline{b}'$ distinto da \underline{x} le quadriche di T che passano per $W_{2,2}^0$ e hanno un punto doppio in \underline{x} , cioè quelle cui si riferiscono le proposizioni 2, 3, 4 di questo numero. Se ne deduce, tenendo conto della genericità di θ , la

PROPOSIZIONE 7.7. Gli iperpiani tangenti a $G(2,5)$ nei punti \underline{a} , \underline{b} costituiscono una stella di dimensione 3, se la coppia \underline{a} , \underline{b} è singolare di prima specie; di dimensione 5, se è singolare di seconda specie.

Per la prop. 7.3, 7.4, lo spazio doppio di una quadrica del sistema $\theta(\underline{a}', \underline{b}')$ può essere di uno dei tipi seguenti: 1) S_3 passante per un piano p contenuto nell' $S_3(x)$ relativo a un punto \underline{x} di $W_{2,2}^1 - W_{2,2}^0$; 2) S_5 passante per lo spazio $\tau(x)$, tangente a $W_{2,2}^0$ in un suo punto \underline{x} .

Consideriamo uno spazio del tipo 1). Le forme di θ segano su di esso le superfici spezzate in p e nelle quadriche passanti per la conica γ intersezione di p con la quadrica $q(x)$ secondo cui $S_3(x)$ interseca $W_{2,2}^0$. Ne segue che un tale spazio è l'immagine di una V_3^2 di $G(2,5)$.

Su uno spazio S_5 del tipo 2) le forme di θ segano V_4 spezzate in $\tau(x)$ e in quadriche passanti per i piani α e β secondo cui $\tau(x)$ interseca $W_{2,2}^0$. Tale spazio rappresenta quindi una V_5 di $G(2,5)$ il cui ordine è uguale al numero dei punti, esterni ad α e β , comuni a 5 quadriche dello S_5 passanti per α e β .

Per valutare questo numero, assumiamo una delle quadriche, che indicheremo con Q_1 , spezzata in $\tau(x)$ e in un S_4 generico di S_5 , che denoteremo con \tilde{S} e le altre quattro, che indicheremo con Q_2, \dots, Q_5 , generiche per α e β . I punti comuni a Q_1, \dots, Q_5 , che cadono fuori di α e β , risultano allora essere i punti esterni alle rette r e s , secondo cui α e β intersecano \tilde{S} , comuni alle quadriche q_2, \dots, q_5 , sezioni di Q_2, \dots, Q_5 con \tilde{S} . Consideriamo la superficie F , del quart'ordine, comune a due di esse, ad esempio a q_2 e q_3 . La F è razionale e si rappresenta su un piano col sistema delle cubiche per 5 punti P_1, \dots, P_5 [13] e si può fare in modo che le rette r, s si rappresentano con due di questi punti, ad esempio P_1 e P_2 . Le quadriche q_4 e q_5 segano allora su F le curve rappresentate da curve del sest'ordine passanti triplamente per P_1 e P_2 e doppiamente per P_3, P_4, P_5 . Queste curve s'intersecano in sei punti, fuori di P_1, \dots, P_5 . Si conclude così che uno spazio del tipo 2) rappresenta una V_5^6 di $G(2,5)$.

Le conclusioni precedenti, relative alla dimensione e all'ordine della varietà V secondo cui un iperpiano tangente a $G(2,5)$ nei punti $\underline{a}, \underline{b}$ di una coppia singolare tocca la $G(2,5)$, valgono se su V si può scegliere θ in modo che nella rappresentazione che ne deriva $\underline{a}, \underline{b}$ siano rappresentati da punti esterni a T , cioè in modo che l'iperpiano osculatore in θ a $G(2,5)$ non passi per uno dei punti $\underline{a}, \underline{b}$. Tale condizione equivale a quella che non accada che l'iperpiano osculatore a $G(2,5)$ in uno dei punti $\underline{a}, \underline{b}$ passi per ogni punto di V , ossia che l'iperpiano non sia osculatore a $G(2,5)$ in uno dei due punti. Ora è stato rilevato in [6], e si dimostra immediatamente servendosi della rappresentazione spaziale qui usata, che l'iperpiano osculatore a $G(2,5)$ in un punto \underline{x} è tangente a $G(2,5)$ lungo la V_5^6 secondo cui la varietà è segata dall' S_9 tangente in \underline{x} . Vale dunque, senza alcuna eccezione, la

PROPOSIZIONE 7.8. *Un iperpiano piano tangente a $G(2,5)$ tocca la varietà*

o in una V_3^2 o in una V_5^6 .

Si ha inoltre

PROPOSIZIONE 7.9. *Gli iperpiani tangenti a $G(2,5)$ in due punti $\underline{a}, \underline{b}$, formanti una coppia singolare, toccano la varietà lungo una V_3^2 ad eccezione di quelli appartenenti a un sistema algebrico di dimensione 2, se $\underline{a}, \underline{b}$ è singolare di prima specie, di dimensione 3, se $\underline{a}, \underline{b}$ è singolare di seconda specie, che invece toccano la $G(2,5)$ lungo una V_5^6 .*

BIBLIOGRAFIA

- [1] T.G. ROOM: The geometry of determinantal loci, Cambridge (1938).
- [2] P. BONERA: Dei sistemi lineari di quadriche di S_r a matrice jacobiana nulla identicamente, nota II, Boll. U.M.I., (3) XXI (1966).
- [3] J.G. SEMPLE: On representations of the S_k of S_n and of the Grassmann manifolds $G(k,n)$, Proc. London Math. Soc., (2) XXXII (1931).
- [4] S. KANTOR: Theorie der linearen Strahlencomplexe im Raume von r Dimensionen, Journ. sur Math., vol. 118 (1897).
- [5] F. PALATINI: Sui complessi lineari di rette negli iperspazi, Giorn. di Mat., 41 (1903).
- [6] C. SEGRE: Sui complessi lineari di piani nello spazio a 5 dimensioni, Annali di Mat. (3), 27 (1918).
- [7] B. SEGRE: Bertini forms and hessian matrices, J. London Math. Soc., 26 (1951).
- [8] C. CILIBERTO: Ipersuperficie algebriche a punti parabolici e relative hessiane, Rend. Acc. Naz. delle Scienze, Memorie di Matematica, Vol. IV, fasc. 3, 98°(1979-80).
- [9] C. SEGRE: Sulle varietà che rappresentano coppie di punti di due piani o spazi, Rend. Circ. Mat. di Palermo (1891).
- [10] J.A. TODD: The locus representing the lines of four-dimensional space and its application to linear complexes in four dimensions, Proc. London Math. Soc., (2) XXXII (1931).
- [11] L. DI FIORE, S. FRENI: Ancora sulle grassmanniane contenute in una grassmanniana assegnata, Rend. Acc. delle Scienze Fis. e Mat., Soc. Naz. di Sc. Lett. e Arti in Napoli, (4) XLIX/I (1982).

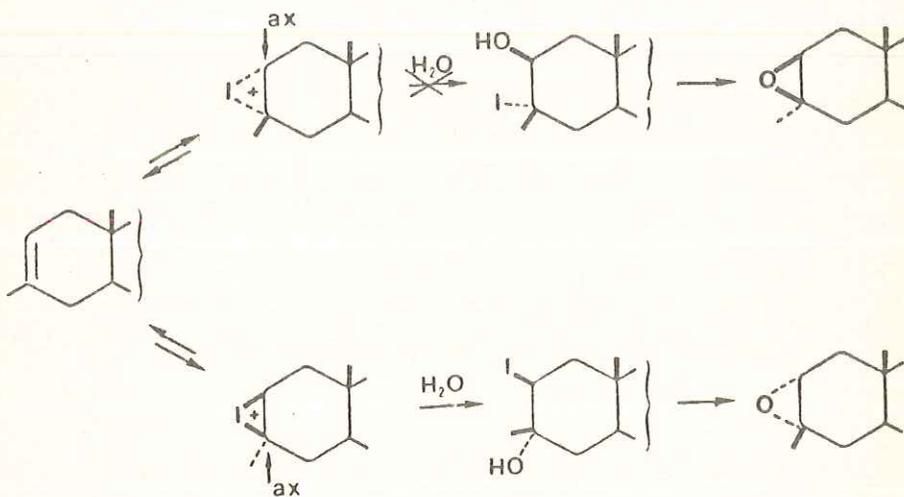
- [12] B. SEGRE: *Prodromi di geometria algebrica*, Roma, Cremonese (1972).
- [13] F. CONFORTE: *Le superficie Razionali*, Bologna, Zanichelli (1939).
- [14] W.V.D. HODGE, D. PEDOE: *Methods of algebraic geometry*, Cambridge (1968).

La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci C. Ciliberto, M. Curzio, A. Franchetta.

INFLUENZA DELL'ALOGENO SULLA REAZIONE DI FORMAZIONE DI EPOSSIDI PER AZIONE
DI ALOGENO E OSSIDO DI ARGENTO SU ALCHENI TRISOSTITUITI STEROIDICI

Nota di M. Adinolfi, G. Barone, R. Lanzetta, G. Laonigro, M. Parrilli* e del socio L. Mangoni
Istituto di Chimica Organica e Biologica dell'Universita' di Napoli
Adunanza del 23 luglio 1983

Il classico metodo per ottenere epossidi dal lato piu' ingombrato di un alchene steroidico si basa sull'addizione di "acido ipoalogenoso", generato comunemente da una N-aloammide in ambiente acquoso, seguita da una idrolisi in ambiente basico (1). Tuttavia, di solito nel caso di alcheni steroidici trisostituiti tale reazione procede con rese molto basse (2). Alcuni anni fa realizzammo un metodo (3), applicabile anche ad alcheni steroidici trisostituiti, che permette di avere epossidi direttamente dagli alcheni, con buone rese. Tuttavia, tale metodo, che si basa sull'addizione di "acido ipoiodoso" ottenuto da I_2/Ag_2O in acqua-diossano, puo' dare a seconda del substrato sia epossidi α che β -orientati. Il decorso sterico della reazione, infatti, e' determinato dalla diversa velocita' di attacco nucleofilo sui due ioni iodonio α e β , in equilibrio tra loro, attraverso l'alchene. Nello schema, descritto per il 3-metil-5 α -colest-2-ene, si osserva che mentre l'attacco trans-diassiale sullo iodonio α



avviene su una posizione secondaria, quello sullo iodonio β risulta essere cineticamente favorito, avvenendo su un sito terziario. Nella tabella seguente sono riportate le rese in α - e β -epossido delle reazioni condotte su vari alcheni trisostituiti:

	Reazione con I_2/Ag_2O		Reazione con Br_2/Ag_2O	
	α	β	α^3	
2-metil-5 α -colest-2-ene		70 ¹		
3-metil-5 α -colest-2-ene	70 ¹		24	32
colesterolo	54 ¹	28 ¹	24	41
colest-4-ene	78 ²	13 ²	13	40
colest-5-ene	68 ²	17 ²	20	30

¹Rif. 3 ²Questo lavoro ³Dopo idrolisi alcalina

Da tali dati si osserva come in tutti gli esempi, escluso il caso del 2-metil-5-colest-2-ene, si ottenga predominantemente, se non esclusivamente, l'epossido α e cio' perche' in tutti i casi e' il β -iodonio quello che subisce l'attacco sul sito terziario. Allo scopo di migliorare le rese di epossido β abbiamo sostituito il Br_2 allo I_2 nella reazione con Ag_2O in acqua-diossano, prendendo spunto dall'osservazione, fatta (4) per alcune olefine monocicliche sostituite, che l'aggiunta di "BrOH", a differenza di quella di "IOH", sembra procedere con uno stadio elettrofilo apparentemente irreversibile. Nella tabella le rese in epossidi della reazione con Br_2/Ag_2O sui vari substrati. Dall'esame di tali dati appare immediatamente evidente che in tutti i casi predomina il β -epossido sull' α -epossido ed inoltre che le rese totali in epossidi sono piu' basse di quelle con la reazione con I_2/Ag_2O . La diversa stereoselettivita' delle due reazioni, che si manifesta in un capovolgimento del rapporto tra gli epossidi α e β , puo' a nostro avviso essere attribuita al fatto che gli attacchi nucleofili sugli ioni bromonio sono piu' veloci di quelli sugli ioni iodonio relativamente alle rispettive reazioni inverse che portano ad alchene di partenza, e cio' a causa del maggior carattere carbocationico dei carboni del ponte nel caso del bromonio rispetto dei carboni dello iodonio. Pertanto il decorso sterico della reazione con Br_2 appare essere meno influenzato dallo stadio nucleofilo che non quello della reazione con I_2 , mentre risente maggiormente dell'influenza dello stadio elettrofilo che e' tale da favorire l'alonio α e quindi l'epossido β . Il motivo delle piu' basse rese in epossido della reazione con Br_2/Ag_2O sta, a nostro avviso, nella maggiore abbondanza, nell'ambiente di reazione, dell'aloidrina con l'alogeno terziario (quella derivante dallo alonio α e che fornirebbe l'epossido β), la quale subirebbe piu' facilmente della corrispondente aloidrina con l'alogeno secondario (derivante dall'alonio β) reazioni di eliminazione.

Attualmente il nostro lavoro e' diretto ad ottenere evidenze sperimentali di tale ipotesi. Comunque la reazione con Br_2/Ag_2O sembrerebbe, nonostante le rese non particolarmente

alte, la reazione da preferire per ottenere β -epossidi da alcheni steroidici trisostituiti

BIBLIOGRAFIA

- (1) G. J. Matthews and A. Hassner in "Organic Reactions in Steroid Chemistry", Ed. J. Friedlander and J. A. Edwards, VanNostrand Reinhold Co., vol. 2, p. 15.
- (2) C. R. Eck, P. Kullberg, B. Green, Chem. Comm. 539 (1972)
- (3) M. Parrilli, G. Barone, M. Adinolfi, L. Mangoni, Tetrahedron Lett. 207 (1976)
- (4) G. Bellucci, G. Berti, G. Ingrosso, E. Mastrolilli, Tetrahedron Lett. 3911 (1973)

COMPONENTI DITERPENICI DELLA *STACHYS RECTA* L.

Nota di M. Adinolfi, G. Barone, R. Lanzetta, G. Laonigro^M, M. Parrilli e del socio L. Mangoni

Istituto di Chimica Organica e Biologica dell'Universita' di Napoli

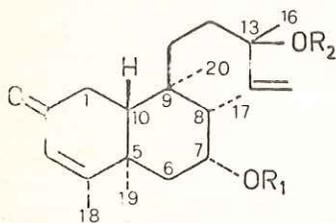
Adunanza del 23 luglio 1983

Nell'ambito delle nostre ricerche su struttura e sintesi dei diterpeni (1) abbiamo esaminato la composizione della frazione diterpenica estratta dalla parte aerea della *Stachys recta* L. (Labiata). Mediante cromatografia su colonna e strato sottile di gel di silice sono stati isolati tre composti a struttura clerodanica, successivamente identificati come il diacetato 1 ed i due monoacetati 2 e 3 (2) dello stachisolone 4, un diterpene clerodanico presente (2,3) nella *Stachys annua* e di cui non era ancora stata determinata la configurazione a C-8 e C-13 (4).

La struttura dei composti 1-3 e' stata determinata essenzialmente sulla base dei dati ¹H-NMR (vedi tavola) e confermata per confronto dei valori di p.f. e $[\alpha]_D$ con quelli riportati (2).

Con una misura di effetto Overhauser e' stato facilmente dimostrato che il metile 17 legato a C-8 e' α -orientato. Infatti fu rilevato un aumento della intensita' del segnale ¹H-NMR del 17-CH₃ a δ 0.90 di 1 per irradiazione del segnale del 20-CH₃ a δ 1.06, e viceversa, risultati compatibili solo con la orientazione α del metile-17.

Infine, data la scarsita' dei dati ¹³C-NMR reperibili in letteratura sui diterpeni clerodanici, sono stati registrati gli spettri ¹³C-NMR di 1-4 e sono stati assegnati tutti i segnali ai rispettivi carboni (vedi tabella) sulla base di uno studio degli spettri on- ed off-resonance, tenendo conto dell'effetto della acetilazione a C-7 e C-13 sui chemical shifts e dei valori gia' riportati per l'acido 2-chetokolavenico (5).



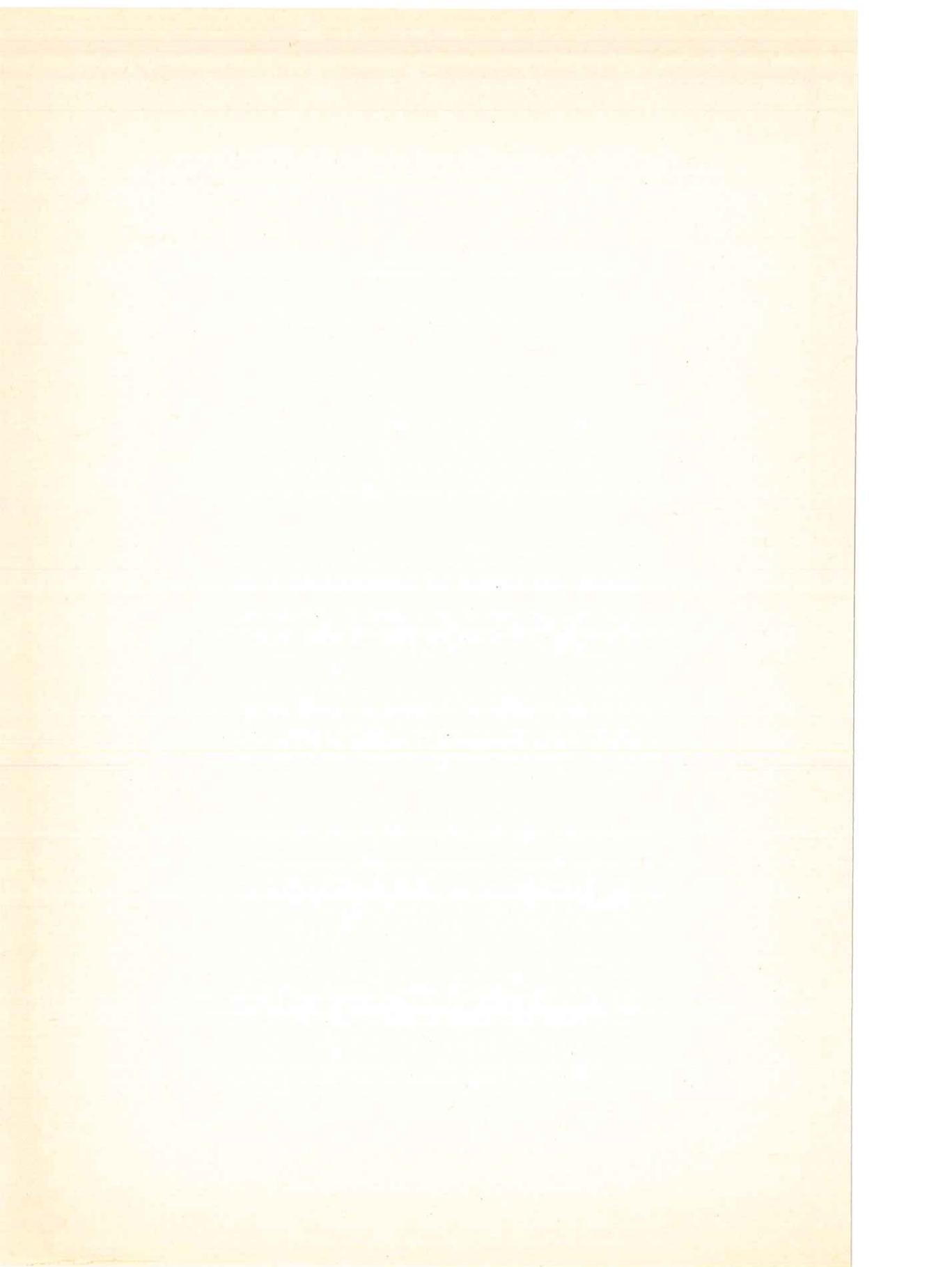
	R ₁	R ₂
1	-Ac	-Ac
2	-Ac	H
3	H	-Ac
4	H	H

TABELLA

- 1 p.f. 93-94°. $[\alpha]_D -68^\circ$ (CHCl₃, c=1). ¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃): δ 0,90 (d, J=7, 17-H₃), 1,29 (s, 19-H₃), 1,06 (s, 20-H₃), 1,51 (s, 16-H₃), 1,88 (d, J=1, 18-H₃), 1,92 (X di ABX, J_{AX}=13,5, J_{BX}=5,1, 10-H_{ax}), 2,36 (B di ABX, J_{BX}=17,6, J_{BX}=5,1, 1-H_{eq}), 2,44 (A di ABX, J_{AB}=17,6, J_{AX}=13,5, 1-H_{ax}), 1,56 (m, 6-H_{ax}), 2,21 (dd, J_{6α,6β}=14,5, J_{6α,7}=2,7, 6-H_{eq}), 5,70 (bs, 3-H), 5,12 (m, A e B di ABX, 15-H₂), 5,93 (q, X di ABX, J_{AX}+J_{BX}=27,8, 14-H₂), 2,03 e 2,13 (2 x OAc), 5,16⁷⁻¹ ¹³C-NMR (67,88 MHz, CDCl₃): δ 34,73 (C-1), 199,59 (C-2), 125,22 (C-3), 171,81 (C-4), 39,07 (C-5), 33,60 (C-6), 141,71 (C-14), 113,66 (C-15), 23,65 (C-16), 11,89 (C-17), 18,85-19,35-20,02 (C-18, C-19 e C-20), 21,42-22,22 (2x OCOCH₃), 170,01-170,61 (2 x OCOCH₃).
- 2 $[\alpha]_D -73^\circ$ (CHCl₃, c=0,7). ¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃): δ 0,91 (d, J=7, 17-H₃), 1,29 (s, 19-H₃), 1,05 (s, 20-H₃), 1,27 (s, 16-H₃), 1,88 (d, J=1, 18-H₃), 1,93 (X di ABX, J_{AX}+J_{BX}=17,6, 10-H_{ax}), 2,40-2,45 (m, A e B di ABX, 1-H₂), 1,50 (dd, J_{6β,7}=3,7, J_{6α,6β}=14,7, 6-H_{ax}), 2,21 (dd, J_{6α,7}=3,7, J_{6α,6β}=14,7, 6-H_{eq}), 5,17 (m, 7-H), 5,70 (bs, 3-H), 5,14 (m, AB di ABX, 15-H₂), 5,85 (q, X di ABX, J_{AX}+J_{BX}=28,2, 14-H), 2,08 (OAc). ¹³C-NMR (67,88 MHz, CDCl₃): δ 34,61 (C-1), 199,88 (C-2), 125,32 (C-3), 170,89 (C-4), 39,04 (C-5), 38,62 (C-6), 74,60 (C-7), 37,69 (C-8), 38,01 (C-9), 45,49 (C-10), 32,18 (C-11), 35,06 (C-12), 72,99 (C-13), 144,81 (C-14), 112,26 (C-15), 27,82 (C-16), 11,90 (C-17), 18,97-19,33-19,94 (C-18, C-19 e C-20), 21,41 (OCOCH₃), 170,60 (OCOCH₃).
- 3 p.f. 130-131°. $[\alpha]_D -45,2^\circ$ (CHCl₃, c=0,8). ¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃): δ 1,01 (d, J=7, 17-H₃), 1,08 (s, 19-H₃), 1,40 (s, 20-H₃), 1,51 (s, 16-H₃), 1,91 (d, J=1, 18-H₃), 1,88 (X di ABX, 10-H_{ax}), 2,35 (B di ABX, J_{AB}=17,7, J_{BX}=4, 1-H_{eq}), 2,46 (A di ABX, J_{AB}=17,7, J_{BX}=13,1, 1-H_{ax}), 1,53 (m, 6-H_{ax}), 2,19 (dd, J_{6α,7}=2,6, J_{6α,6β}=14, 6-H_{eq}), 4,08 (q, 7-H), 5,70 (bs, 3-H), 5,12 (m, 15-H₂), 5,49 (q, X di ABX, J_{AX}+J_{BX}=28,6, 14-H), 2,02 (s, OAc). ¹³C-NMR (67,88 MHz, CDCl₃): δ 34,76 (C-1), 200,27 (C-2), 125,09 (C-3), 172,78 (C-4), 39,33 (C-5), 41,38 (C-6), 73,22 (C-7), 38,68 (C-8), 37,95 (C-9), 45,69 (C-10), 31,83 (C-11), 33,17 (C-12), 83,30 (C-13), 141,68 (C-14), 113,46 (C-15), 23,43 (C-16), 12,26 (C-17), 19,03-19,70-20,24 (C-18, C-19 e C-20), 22,22 (OCOCH₃), 170,22 (OCOCH₃).
- 4 p.f. 156-159°. $[\alpha]_D -29,3$ (CH₃OH, c=0,4). ¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃): δ 1,02 (d, J=7, 17-H₃), 1,08 (s, 19-H₃), 1,40 (s, 20-H₃), 1,28 (s, 16-H₃), 1,91 (d, J=1, 18-H₃), 1,89 (X di ABX, J_{AX}=12,9, J_{BX}=4,4, 10-H_{ax}), 2,39 (B di ABX, J_{AB}=17,2, J_{BX}=4,4, 1-H_{eq}), 2,45 (A di ABX, J_{AB}=17,2, J_{AX}=12,9, 1-H_{ax}), 1,54 (m, 6-H_{ax}), 2,20 (dd, J_{6α,6β}=14,0, J_{6α,7}=2,9, 6-H_{eq}), 4,08 (q, 7-H), 5,69 (bs, 3-H), 5,13 (m, A e B di ABX, 15-H₂), 5,82 (q, X di ABX, J_{AX}+J_{BX}=27,9, 14-H). ¹³C-NMR (67,88 MHz, CDCl₃): δ 34,69 (C-1), 199,87 (C-2), 125,03 (C-3), 172,76 (C-4), 39,35 (C-5), 41,43 (C-6), 73,30 (C-7), 38,77 (C-8), 37,89 (C-9), 45,84 (C-10), 32,35 (C-11), 35,09 (C-12), 73,08 (C-13), 144,87 (C-14), 112,17 (C-15), 27,70 (C-16), 12,32 (C-17), 19,02-19,67-20,18 (C-18, C-19 e C-20).

BIBLIOGRAFIA

- (1) G. Laonigro, R. Lanzetta, M. Parrilli, M. Adinolfi, L. Mangoni, Gazz. Chim. It., 145 (1979)
e lett. cit.
- (2) T. M. Orgiyan, D. P. Popa, Khim. Prir. Soedin, 7 (1969)
- (3) D. P. Popa, T. M. Orgiyan, Z. Samek, L. Dolcis, Khim. Prir. Soedin, 295 (1972)
- (4) D. P. Popa, T. M. Orgiyan, Khim. Prir. Soedin., 735 (1972)
- (5) C. E. Hassan, T. M. Healey, P. G. Waterman, Phytoch., 1365 (1982).



DECORSO STERICO DELLA ADDIZIONE DI ALOGENURI DI IODIO ALL' 1-METIL-4-T-BUTILCICLOESENENE:

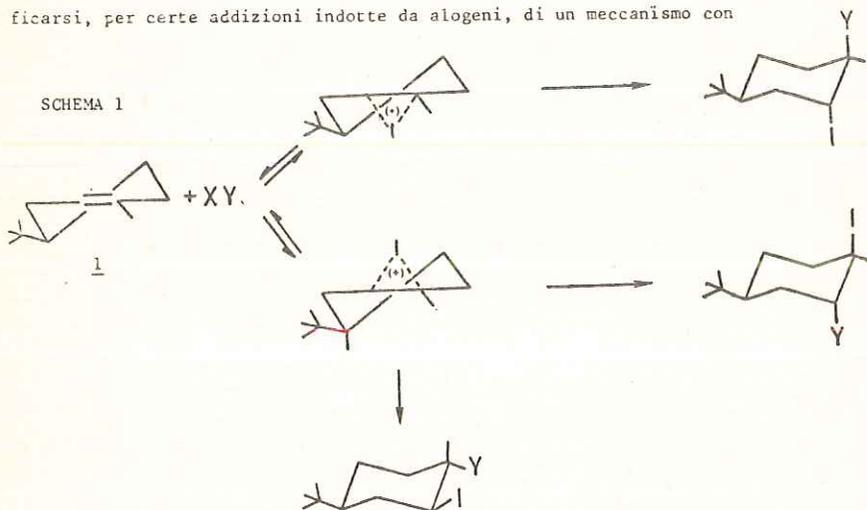
INFLUENZA DELLA SPECIE ELETTROFILA

Nota di M. Adinolfi, G. Barone, R. Lanzetta, G. Laonigro, M. Parrilli* e del socio L. Mangoni

Istituto di Chimica Organica e Biologica dell'Universita' di Napoli

Adunanza del 23 luglio 1983

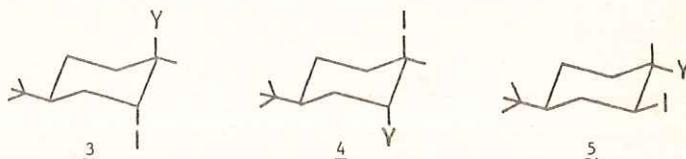
Il meccanismo comunemente accettato (1) per l'addizione elettrofila di alogeni e specie alogeniche ad alcheni prevede un primo stadio elettrofilo irreversibile seguito da un veloce stadio nucleofilo che porta agli addotti di reazione. Negli ultimi anni tuttavia sono state accumulate evidenze (2-4), essenzialmente di natura stereochimica, che hanno portato ad ipotizzare un meccanismo in cui lo stadio elettrofilo e' di equilibrio veloce mentre quello nucleofilo determina sia la velocita' che la distribuzione dei prodotti di reazione. Tali evidenze sono state derivate dalla analisi della distribuzione dei prodotti in reazioni di addizione elettrofila indotte da alogeni su alcheni che permettono di distinguere il decorso sterico dello stadio elettrofilo da quello dello stadio nucleofilo. Un substrato di questo tipo e' l' 1-metil-4-t-butilcicloesene 1, per il quale sia da noi (3) che da altri (2-5) e' gia' stato ipotizzato il verificarsi, per certe addizioni indotte da alogeni, di un meccanismo con



uno stadio elettrofilo di equilibrio veloce (Schema 1).

Nel quadro delle nostre ricerche (3,6) sulle applicazioni sintetiche delle addizioni elettrofile ad alcheni ciclici trossostituiti, abbiamo intrapreso uno studio sistematico dei fattori che possono influenzare il decorso sterico di queste reazioni. In questo lavoro ci proponiamo di esaminare l'andamento sterico della reazione in funzione del nucleofilo, a parità di alogeno elettrofilo attaccante, di solvente e di temperatura. A tale scopo abbiamo addizionato ICl e IBr ad 1 in CCl_4 e CHCl_3 , che sono solventi non nucleofili e quindi non inquinano la reazione con la formazione di prodotti misti di reazione. In tutti i casi le reazioni (condotte al buio, a 0°C , con rapporti molari di 0,95:1 tra IY ed alchene e per 5 min.) procedono con un meccanismo ionico portando esclusivamente a miscele di trans-iodoalogenuri (schema 2), che nel caso dell'addizione di IBr sono accompagnate da piccole percentuali di trans-dibromuri. Gli iodoalogenuri sono stati identificati sulla base dei loro segnali all' $^1\text{H-NMR}$ (7). Nella tabella sono riportate la distribuzione degli iodoalogenuri e la stereoselettività dell'attacco elettrofilo come rapporti tra le rese dei prodotti derivanti dall'attacco anti con quelle dei prodotti

SCHEMA 2



derivanti dall'attacco sin rispetto al t-butile. Si nota immediatamente che per tutte le addizioni degli iodoalogenuri la stereoselettività è più alta di quella di una tipica reazione di addizione elettrofila irreversibile come la epossidazione, per la quale il rapporto degli attacchi anti/sin è di 0,61 (5). Si nota inoltre che, a parità di solvente, il rapporto anti/sin per IBr è più alto di quello che si ha per l'addizione di ICl. Tali osservazioni portano a concludere che nelle addizioni sia di ICl che di IBr la distribuzione dei prodotti risente an-

specie XY	solvente	distribuzione degli iodoalogenuri, %			stereoselettività' dello attacco elettrofilo rapporto anti/sin $\frac{3}{(4+5)}$
		<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	
ICl	CCl_4	52	40	8	1,08
ICl	CHCl_3	48	45	7	0,92
IBr	CCl_4	58	36	6	1,38
IBr	CHCl_3	59	31	10	1,44

che dello stadio nucleofilo, e non solo di quello elettrofilo che avrebbe invece determinato un

rapporto anti/sin simile a quello della epossidazione, e che l'influenza dello stadio nucleofilo e' maggiore nella addizione di IBr rispetto a quella che si ha per l'ICl. Una possibile interpretazione di tali fatti implica un meccanismo in cui non si abbia ne' uno stadio elettrofilo irreversibile ne' uno di preequilibrio veloce. In questo ultimo caso, infatti, nella ragionevole ipotesi che i rapporti delle concentrazioni degli ioni iodonio anti e sin all'equilibrio siano praticamente eguali per le due addizioni di IBr ed ICl, la diversa stereoselettivita' delle due addizioni sarebbe stata determinata dalla competitivita' degli attacchi sui due ioni iodonio anti e sin diversa per Cl^- e Br^- . Ora, considerando che il sito terziario dello iodonio anti e' piu' hard (8) di quello secondario dello iodonio sin e che il Cl^- e' piu' hard (9) di Br^- , tale diversa competitivita' dovrebbe essere tale da portare, sulla base del principio HSAB (10), ad un valore della stereoselettivita' per ICl piu' alto di quello per la addizione di IBr; ma sperimentalmente troviamo un andamento esattamente opposto. Pertanto noi ipotizziamo uno stadio elettrofilo reversibile ma non di preequilibrio veloce. In tale visione, la piu' bassa stereoselettivita' di ICl rispetto ad IBr sarebbe razionalizzata assumendo che nella addizione di IBr il rapporto tra la velocita' di reversione e quella di evoluzione degli ioni iodonio sia piu' alta che non nel caso di ICl. Una possibile spiegazione di tale comportamento puo' essere trovata sulla base del principio HSAB. Lo ione iodonio puo' essere considerato come un elettrofilo ambidente che puo' subire l'attacco nucleofilo o sui carboni del ponte o sullo iodio positivo, che, a causa della sua alta polarizzabilita', costituisce un sito piu' soft. Poiche' il Br^- e' piu' soft di Cl^- , esso presentera' maggiore tendenza a reagire con lo iodio positivo piuttosto che con i carboni del ponte. Pertanto la reversione dello ione alonio ad alchene rispetto alla sua evoluzione negli addotti di reazione sara' piu' veloce nel caso di IBr che non nel caso di ICl.

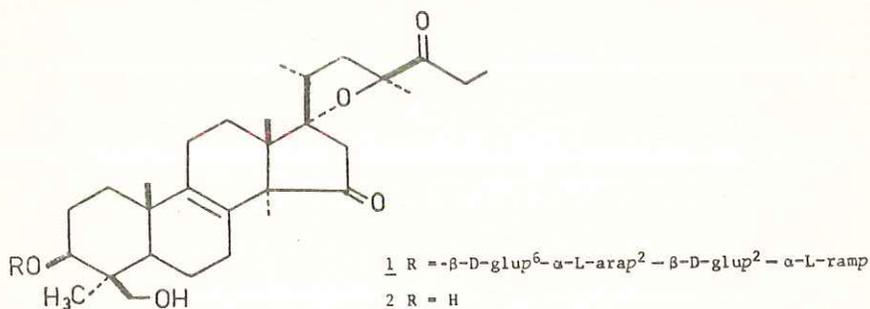
BIBLIOGRAFIA

- (1) G.H.Schmid, D.C.Garrat in "The chemistry of double-bond functional groups", Ed. S. Patai parte 2 (suppl. A), 1977, p. 725
- (2) D.J.Pasto, J.A.Gontarz, J. Am. Chem. Soc., 6909 (1971)
- (3) M.Parrilli, G.Barone, M.Adinolfi, L.Mangoni, Gazz. Chim. It., 819 (1974)
- (4) G.Bellucci, G.Berti, M.Ferretti, G.Ingrosso, E.Mastrorilli, J. Org. Chem., 472 (1978)
- (5) P.L.Barili, G.Bellucci, B.Macchia, F.Macchia, G.Parmiggiani, Gazz. Chim. It., 300 (1971)
- (6) L.Mangoni, M.Adinolfi, G.Barone, M.Parrilli, Gazz. Chim. It., 377 (1975); Tetrahedron Lett. 207 (1976)
- (7) L.M.Jackman, S.Sterhell, "Application of Nuclear Magnetic Resonance in Organic Chemistry", Pergamon Press, Oxford, 1969, II Ed., Cap. 2-3-4
- (8) J.E.Dubois, M.H.Durand, G.Manvier, J.Chretins, Tetrahedron Lett., 3911 (1973)
- (9) Tsa-Lok-Ho, "Hard and soft acids and bases principles in organic chemistry", Academic Press, New York, 1977, p. 6.
- (10) R. Pearson, J. Am. Chem. Soc., 3555 (1963)

STRUTTURA DI UN GLICOSIDE ESTRATTO DAI BULBI DI *MUSCARI COMOSUM*

Nota di M. Adinolfi, G. Barone, R. Lanzetta, G. Laonigro, M. Parrilli* e del socio L. Mangoni
 Istituto di Chimica Organica e Biologica dell'Universta' di Napoli
 Adunanza del 23 luglio 1983

Recentemente abbiamo riportato (1) la determinazione della struttura del Muscaroside A 1, un glicoside triterpenico estratto dai bulbi del *Muscari comosum* Mill. (Liliaceae). In questa nota riportiamo i dati preliminari circa l'isolamento e la determinazione di struttura di un secondo glicoside, piu' polare, il Muscaroside B. Per cromatografia su colonna di gel di silice (eluente cloroformio/metanolo) della frazione glicosidica estratta dai bulbi come precedentemente descritto (1), si ottengono quattro frazioni denominate a-d in ordine di polarita' crescente. La frazione b, per cromatografia HPLC su colonna a fase inversa, fornisce il Muscaroside B come solido puro a TLC, $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$. Per cristallizzazione da etanolo si ottengono aghi bianchi a p.f. $202-6^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{20} -32^\circ$ (metanolo). L'analisi chimica da' una formula molecolare $\text{C}_{62}\text{H}_{96}\text{O}_{31}$, in accordo con il picco ionico pseudomolecolare (MH^+ 1361) presente nello spettro FAB/MS. Dal confronto tra gli spettri protonici e ^{13}C del Muscaroside A (1) con quelli del Muscaroside B si desume che anche in questo ultimo l'aglicone e' costituito dall'eucosterolo 2, al cui ossidrilico in 3 e' legata la catena zuccherina che, a differenza di quella del Muscaroside A,

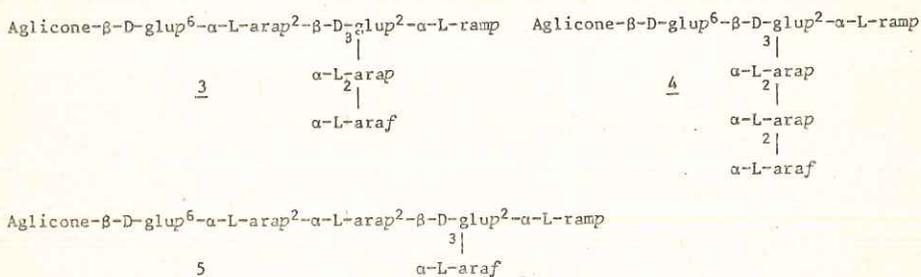


Istituto di Chimica Organica e Biologica - Fac. di Scienze
 Via Mezzocannone 10 - Napoli

e' esasaccaridica. Questa, come si evince dalla idrolisi acida (7% H₂SO₄) del glicoside, e' costituita da ramnosio, arabinosio e glucosio, nel rapporto 1:3:2 (spettro ¹H-NMR in DMSO-d₆). Le configurazioni dei singoli monosi sono state determinate dalle loro rotazioni ottiche, dopo smistamento della miscela monosaccaridica mediante HPLC, e risultano essere: D per i glucosi, L per gli arabinosi e per il ramnosio. La permetilazione del Muscaroside B (DMF/NaH/MeI), seguita dalla idrolisi acida (HCl 2N/diossano) fornisce il 2,3,4-tri-O-metil-L-arabino-L-ramnopiranosio, il 2,3,5-tri-O-metil-arabinofuranosio, il 2,3,4-tri-O-metilglucopiranosio, il 4,6-di-O-metil-D-glucopiranosio ed il 3,4-di-O-metil-L-arabinopiranosio. Dalla struttura dei componenti di questa miscela appare subito chiaro che la catena zuccherina presenta una sola ramificazione con un glucosio in posizione nodale e con il ramnosio e l'arabinofuranosio nelle posizioni terminali. Le configurazioni α per le tre unita' di arabinosio e per quella di ramnosio e β per le due unita' di glucosio sono suggerite dalla applicazione della regola di Klyne (2).

Per quanto riguarda la sequenza delle unita' monosiche, un esperimento di NOE, misurato per l'H-1 del glucosio legato in 6 irradiando il metile C-30 dell'aglicone, porta a concludere che tale unita' di glucosio e' legata direttamente all'aglicone. Inoltre, dal piccolo valore del glycosylation shift del C-2 dell'unita' nodale di glucosio si evince che il ramnosio terminale e' legato direttamente a tale posizione.

Dalla serie di dati suesposti risultano possibili per il Muscaroside B le strutture 3, 4 e 5.



Misure di spettrometria di massa FAB, attualmente in corso, ci potranno consentire di scegliere tra le tre possibilita'.

BIBLIOGRAFIA

- (1) M. Adinolfi, G. Barone, R. Lanzetta, G. Laonigro, L. Mangoni, M. Parrilli, Can. J. Chem. in corso di stampa (1984)
- (2) W. Klyne, Biochem. J., 47, 4 (1950)

STRUTTURA DI DUE NORTRITERPENI A SCHELETRO LANOSTANICO ESTRATTI DAI BULBI DI *MUSCARI COMOSUM*

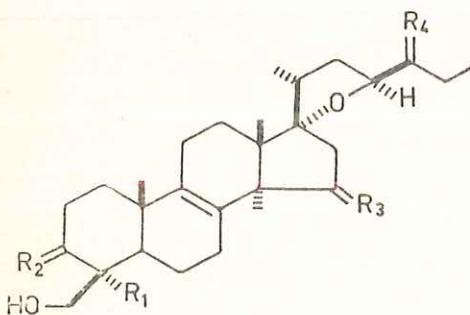
Nota di M. Adinolfi, G. Barone, R. Lanzetta, G. Laonigro, M. Parrilli* e del socio L. Mangoni

Istituto di Chimica Organica e Biologica della Università di Napoli

Adunanza del 23 luglio 1983

Abbiamo recentemente (1, 2) identificato sette dei componenti della frazione terpenica estratta dai bulbi di *Muscari comosum* Mill. (Liliaceae). Riportiamo ora la determinazione della struttura di altri due triterpeni, 1 e 2, a scheletro lanostanico isolati dalla stessa fonte.

Il composto 1 presenta i seguenti segnali $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3): δ 0,924 (3H, s, 18- H_3), 0,949 (3H, s, 19- H_3), 1,227 (3H, s, 30- H_3), 1,252 (3H, s, 32- H_3), 1,221 (3H, d, $J=6,99$), 3,346 e 4,229 (2H, ABq, $J=11,70$), 3,456 (1H, dd, 3-H), 2,2 (1H, m, 20-H), 1,5 (2H, m, 22- H_2), 4,002 (1H, m, 23-H), 3,351 (1H, m, 24-H), 1,3 (2H, m, 25- H_2), 0,9969 (3H, t, $J=7,35$, 26- H_3), 2,342 e 2,689 (2H, ABq, $J=19,12$, 16- H_2). La struttura di 1 e' chiaramente desumibile dal confronto dello spettro con quello di 3 (2), ed in particolare dalla presenza del segnale del protone sul carbonio carbinolico a C-24 e dalla sostanziale somiglianza dei chemical shifts dei segnali degli altri protoni. In accordo, la spettrometria di massa da' un p.m. di 474,3337 (calc. per $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_5$: 474,3345).



	R_1	R_2	R_3	R_4
<u>1</u>	CH_3	$\begin{array}{l} \text{OH} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$	O	$\begin{array}{l} \text{OH} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$
<u>2</u>	CH_3	$\begin{array}{l} \text{OH} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$	H_2	O
<u>3</u>	CH_3	O	O	$\begin{array}{l} \text{OH} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$
<u>4</u>	CH_2OH	$\begin{array}{l} \text{OH} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$	H_2	O
<u>5</u>	CH_3	$\begin{array}{l} \text{OH} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$	O	O

Istituto di Chimica Organica e Biologica - Fac. di Scienze
Via Mezzocannone 16 - Napoli

Il composto 2, p.f. 195-7°C (da metanolo), presenta i seguenti segnali $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3): δ 0,901 (3H, s, 18- H_3), 0,949 (3H, s, 19- H_3), 1,255 (3H, s, 30- H_3), 1,229 (3H, s, 32- H_3), 1,058 (3H, d, $J=6,99$, 21- H_3), 3,354 e 4,227 (2H, ABq, $J=11,03$, 31- H_2), 3,468 (1H, dd, 3-H), 4,530 (1H, dd, 23-H), 2,553 (2H, q, $J=7,35$, 25- H_2) e 1,071 (3H, t, $J=7,35$, 26- H_3) ed i seguenti segnali $^{13}\text{C-NMR}$ (67,88 MHz, CDCl_3): δ 35,35 (C-1), 28,31 (C-2), 80,68 (C-3), 42,84 (C-4), 51,20 (C-5), 18,29 (C-6), 26,46 (C-7), 134,03 (C-8), 135,28 (C-9), 36,80 (C-10), 20,46 (C-11), 24,90 (C-12), 48,66 (C-13), 50,50 (C-14), 31,71 (C-15), 39,64 (C-16), 91,65 (C-17), 19,56 (C-18), 19,20 (C-19), 43,52 (C-20), 17,19 (C-21), 36,80 (C-22), 81,41 (C-23), 213,46 (C-24), 32,26 (C-25), 7,50 (C-26), 22,23 (C-30), 64,37 (C-31) e 25,85 (C-32). Un confronto di questi dati spettrali con quelli del nortriterpene 4 (4), isolato come uno degli agliconi dei glicosidi presenti anch'essi nei bulbi di *M. bomosum*, indica con sufficiente attendibilita' la struttura del nuovo nortriterpene. In particolare, va osservato che in 2, come in 4, non e' presente il gruppo chetonico in posizione 15. Di conseguenza i chemical shifts dei segnali dei protoni a C-15 sono analoghi a quelli di 4; inoltre, a differenza di 4 ma come in 1, 3 e 5 (1-3), non e' presente il gruppo ossidrilico in posizione 30, come mostrato dal chemical shift del C-30 e dal fatto che i carboni della'anello A hanno chemical shifts praticamente identici a quelli di 5 (1). In accordo, la spettrometria di massa da' un p.m. di 458,3388 (per $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_4$, calc. 458,3396).

BIBLIOGRAFIA

- (1) M. Adinolfi, G. Barone, R. Lanzetta, G. Laonigro, L. Mangoni, M. Parrilli, J. Nat. Prod. in corso di stampa (1983)
- (2) idem, J. Nat. Prod., inviato per la pubblicazione
- (3) idem, J. Nat. Prod., inviato per la pubblicazione
- (4) M.Parrilli, R. Lanzetta, M. Adinolfi, L. Mangoni, Tetrahedron, 3591 (1980).

LA 7-O-METIL-3,9-DIIDROPUNCTATINA: UN NUOVO OMOISOFILAVANONE DAL *MUSCARI COMOSUM*

Nota di G. Barone¹, M. Belardini², R. Lanzetta¹, G. Laonigro¹ e M. Parrilli¹

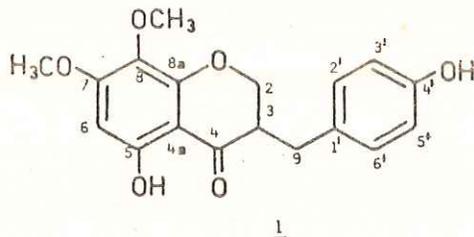
presentata dal Socio V. Leone

Adunanza del 23 luglio 1983

Riassunto - Viene descritta la struttura dell'omoisoflavanone 1.

Summary - The structure of homoisoflavanone 1 is described.

Nel corso di uno studio chimico dei bulbi di *Muscari comosum* Mill. (Liliaceae) abbiamo isolato, oltre ad una serie di nortriterpeni e di glicosidi, un nuovo rappresentante della classe degli omoisoflavanoni (1), la 7-O-metil-3,9-diidropunctatina 1.



La struttura del composto 1, isolato mediante tecniche di cromatografia su colonna e su strato sottile dall'estratto etereo dei bulbi liofilizzati, e' stata determinata sulla base di evidenze spettrali, specialmente di risonanza magnetica nucleare.

Il composto 1 ha una formula molecolare $C_{18}H_{16}O_6$, dedotta per spettrometria di massa ad alta risoluzione, ed un λ_{max} 293 nm (etanolo). Lo spettro ^1H-NMR (270 MHz, DMSO- d_6) mostra la presenza di due gruppi metossilici a δ 3,85 ed a δ 3,61 e di due gruppi ossidrilici a δ 12,06 (5-OH) ed a δ 9,26. Il singoletto a δ 6,23 e' da attribuire al protone isolato a C-6 mentre i restanti quattro protoni aromatici formano un sistema AA'BB' a δ 7,04 (2H, J=8,5 Hz) e a δ 6,71 (2H, J=8,5 Hz), indicante un anello benzenico 1,4-disostituito. A δ 4,35 e 4,16 sono centrati i protoni a C-2 come parte AB di un sistema ABX, la cui parte X (protone a C-3) risuona a δ 3,03, sovrapponendosi ad uno dei due protoni benzilici a C-9; l'altro protone a C-9 appare come multipletto a δ 2,63.

Una conferma della posizione dei due gruppi ossidrilici e dei due gruppi metossili

sui due anelli benzenici si e' avuta rilevando, con una serie di spettri NOE differenza, gli effetti Overhauser tra il 6-H ed i protoni del 7-OCH₃ e del 5-OH e tra il 4'-OH ed i protoni 3'-H e 5'-H.

In perfetto accordo con la struttura 1 e' anche lo spettro ¹³C-NMR (67,88, DMSO-d₆, vedi tabella). Le attribuzioni dei segnali ai singoli carboni e' basata sul confronto con dati della letteratura (1). In particolare, si e' potuto confermare che un gruppo OCH₃ e' legato a C-8 e non a C-6, come pure sarebbe stato in linea di principio possibile (1), esaminando la molteplicita' del segnale del C-6 in uno spettro eteronucleare gated completamente accoppiato. Si osserva infatti che le linee del doppietto del C-6 sono ulteriormente sdoppiate da una $J_{C-H}^3 = 6,62$ Hz a causa dell'accoppiamento con il protone del 5-OH impegnato nel legame idrogeno con l'ossigeno carbonilico a C-4.

TABELLA

C-2	69,1	C-9	31,1
C-3	45,7	C-1'	127,9 ^b
C-4	198,5	C-2'	} 129,9
C-4a	101,7	C-6'	
C-5	155,6 ^a	C-3'	} 115,1
C-6	92,8	C-5'	
C-7	159,1 ^a	C-4'	160,9 ^a
C-8	128,7 ^b	OCH ₃	} 56,2
C-8a	153,3		

^{a, b} valori intercambiabili

BIBLIOGRAFIA

- (1) W. Helle, Ch. Tamm, Fort. Ch. Org. Natur., 40, 105 (1981)

La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci R. Nicolaus, L. Mangoni, V. Leone.

SELECTIVE DEBROMINATION OF SUBSTITUTED *VIC*-DIBROMIDES

Nota di Romualdo Caputo, Pietro Monaco, Giovanni Palumbo, Lucio Previtiera, Lorenzo Mangoni*

Presentata dal Socio Lorenzo Mangoni

Adunanza del 23 luglio 1983

Riassunto: Sono state messe a punto nuove condizioni di reazione molto blande per la debromurazione di *vic*-dibromuri sostituiti, ottenendo gli alcheni corrispondenti con rese soddisfacenti.

Abstract: New and very mild reaction conditions have been devised for the debromination of substituted *vic*-dibromides leading to alkenes with satisfactory yield.

Dehalogenation reactions of *vic*-dihalides to give alkenes effected by a variety of reagents have been reported previously¹. In this communication we wish to report some preliminary results on the conversion of *vic*-dibromides to alkenes achieved without any specific reagents, i.e. by simply heating dimethylformamide (DMF) solutions of the starting dibromides at 60°C (see the Table), under neutral and extremely mild conditions².

Two main conclusions from the data presented in the Table are: (i) The bromine elimination is stereospecific and requires *anti*-alignment of the bromine atoms. In fact, under our experimental conditions, *meso*- and *racemic*-2,3-dibromobutanes afforded respectively *trans*- and *cis*-2-butene only. Also 2 β ,3 α -dibromo-5 α -cholestane afforded 5 α -cholest-2-ene, whereas its *trans*-diequatorial isomer 2 α ,3 β -dibromo-5 α -cholestane remained unchanged after 72 h under the same conditions.

(ii) The rate of bromine elimination is strongly affected by the substitution of the carbon atoms bearing bromine and, most importantly, only debrominations of such *vic*-dibromides having at least one of the bromine atoms bonded to a tertiary carbon are of preparative interest.

As a consequence, such experimental conditions can be exploited conveniently to achieve unprecedented sharp selective debromination of substituted *vic*-dibromides. In fact, when a solution of 2 β ,3 α ,5 α ,6 β -tetrabromocholestane (0.2 mmol) in DMF (10 mL) was heated at 60°C for 6 h, 2 α ,3 β -dibromocholest-5-ene was obtained in 65% yield, accompanied only by traces of the completely debrominated product.

The mechanism of the reaction may be assumed confidently to be the reverse of the alkene bromination mechanism³, the molecular bromine released in the reaction being consumed most likely by the solvent itself⁴. As a matter of fact, 2 β ,3 α -dibromo-3 β -methyl-5 α -cholestane, when treated un-

* Istituto di Chimica Organica e Biologica dell'Università di Napoli, Via Mezzocannone 16 - Napoli

Table - Debromination of *vic*-dibromides in 0.02 M DMF solutions at 60°C.

Substrate	Time (h)	Yield % ^(a)	Product
2,3-Dibromo-2,3-dimethylbutane	9	80	2,3-Dimethyl-2-butene
2,3-Dibromo-2-methylbutane	8	65	2-Methyl-2-butene
<i>meso</i> -2,3-Dibromobutane	18	8	<i>trans</i> -2-Butene
<i>racemic</i> -2,3-Dibromobutane	18	7	<i>cis</i> -2-Butene
1,2-Dibromobutane	12	=	n.r.
<i>meso</i> -1,2-Dibromo-1,2-diphenylethane	96	7	<i>trans</i> -Stilbene
<i>racemic</i> -1,2-Dibromo-1,2-diphenylethane	112	8 ^(b)	<i>cis</i> -Stilbene
<i>trans</i> -1,2-Dibromocyclohexane	12	<1 ^(b)	Cyclohexene
1 β ,2 α -Dibromo-1 α -methyl-4 β -tBu-cyclohexane	6	65	1-Methyl-4-tBu-cyclohexene
3 β -Hydroxy-5 α ,6 β -dibromocholestane	6	70	Cholest-5-en-3 β -ol
3 β -Hydroxy-5 β ,6 α -dibromocholestane	18	8	Cholest-5-en-3 β -ol
2 β ,3 α -Dibromo-5 α -cholestane	12	6	5 α -Cholest-2-ene
2 β ,3 α -Dibromo-5 α -cholestane ^(c)	12	50	5 α -Cholest-2-ene
2 α ,3 β -Dibromo-5 α -cholestane	72	=	n.r.
2 β ,3 α -Dibromo-3 β -methyl-5 α -cholestane	6	98	3-Methyl-5 α -cholest-2-ene
2 β ,3 α -Dibromo-3 β -methyl-5 α -cholestane ^(c)	1	90	3-Methyl-5 α -cholest-2-ene
2 α ,3 β -Dibromo-3 α -methyl-5 α -cholestane	36	=	n.r.
2 β ,3 α ,5 α ,6 β -Tetrabromocholestane	6	65	2 β ,3 α -Dibromocholest-5-ene

(a) Yield of isolated product with purity \geq 95%, unless otherwise specified. (b) Estimated by G.L.C. analysis. (c) Reaction carried out in the presence of cyclohexene (equimolar amount).

der our debromination conditions, but in the presence of 5% methanol, afforded stereoselectively 2 β -bromo-3 α -methoxy-3 β -methyl-5 α -cholestane. Both its formation and the absence of any traces of its C-3 epimer may indicate the existence of an intermediate bromonium ion-like species which undergoes nucleophilic attack by methanol only from the α -face of the molecule. Moreover, addition of the cyclohexene (0.02 mol/L) to the DMF solution of the starting dibromide accelerates debromination (see the Table) and leads to the formation of *trans*-1,2-dibromocyclohexane thus showing that electrophilic (and/or molecular) bromine is formed in the reaction. Finally, under normal reaction conditions, i.e. in the absence of any bromine acceptors, the bromide ion as well as the alkene are isolated in the same equivalent amounts.

On the basis of the above data, the mechanistic interpretation given in a previous paper⁵, describing the debromination of *vic*-dibromides with sodium dithionite in boiling DMF, seems to be questionable and has to be revised.

Work is in progress on mechanistic and synthetic aspects of such an elimination and further details will be published in due course.

REFERENCES AND NOTES

- K. Ramasamy, S.K. Kalyanasundaram, P. Shanmugam, *Synthesis*, 311 (1978) and literature cited therein.
- Stilbene dibromides in DMF solutions had already been observed to undergo debromination to a negligible extent. Cf. I.M. Mathai, K. Shug, S.I. Miller, *J. Org. Chem.*, **35**, 1733 (1970).
- R.E. Buckles, J.L. Miller, R.G. Thurmaier, *J. Org. Chem.*, **32**, 888 (1967); J.E. Dubois, E. Bienvenue-Goetz, *Bull. Soc. Chim. (France)*, 2086 (1968).
- DMF solutions of bromine have been reported to undergo rapid loss in titre, when heated at 60°C. Cf. I.M. Mathai, S.I. Miller, *J. Org. Chem.*, **35**, 3416 (1970).
- T. Kempe, T. Norin, R. Caputo, *Acta Chem. Scand.*, B **30**, 366 (1976).

PROBLEMI QUASI - ELLITTICI NEL SEMISPAZIO DIPENDENTI DA UN PARAMETRO

E PERTURBAZIONI SINGOLARI. (*)

Nota di Ornella FIODO (a Napoli) (**)

Presentata dal socio ordinario Carlo CILIBERTO

Adunanza del 23/7/1983

Sommario - In questo lavoro si considerano nel semispazio problemi quasi-ellittici dipendenti da un parametro, con i coefficienti variabili, e si utilizzano i risultati relativi per stabilire teoremi di convergenza e stime a priori per le soluzioni di perturbazioni singolari quasi-ellittiche.

Summary - In this paper we consider in the half-space quasi-elliptic problems dependent on one parameter, with variable coefficients, and we use the results to prove convergence and estimates for solutions of quasi-elliptic singular perturbations.

In un precedente lavoro [7] ho studiato una classe di perturbazioni singolari quasi-ellittiche negli spazi $H^s(\mathbb{R}_+^n)$ (cfr. n.1) con condizioni al bordo tipo Shapiro-Lopatinski, del tipo:

$$\begin{cases} \epsilon^m A(D)u + u = f_\epsilon & \text{in } \mathbb{R}_+^n \quad (\epsilon > 0) \\ B_j(D)u(x', 0) = 0 \quad j = 1, \dots, \nu \end{cases}$$

ed ho stabilito la convergenza per $\epsilon \rightarrow 0$ in $L^2(\mathbb{R}_+^n)$ della soluzione u_ϵ al limite di f_ϵ ed inoltre, fra l'altro, la "più regolarità" lontano dal bordo di tale proprietà e delle stime a priori; ciò nell'ordine di idee di HUET [12, 13].

In questa nota estendo tali risultati ad una più ampia classe di problemi, inquadrando la problematica nell'ambito di quella degli operatori dipendenti da parametro studiati, nel caso ellittico L^2 , da AGRANOVICH e VISHIK [1] (cfr. anche [6], [8], [9]; per una trattazione L^p cfr. [2]). La maggiore generalità riguarda i coefficienti degli operatori, che sono variabili, e le condizioni al bordo, che sono di ti-

(*) Ricerca effettuata con fondi erogati dal Ministero della Pubblica Istruzione.

(**) Istituto di Matematica della Facoltà di Ingegneria.

po generale e anch'esse dipendenti da ε .

Dopo alcuni preliminari (n.1), innanzitutto estendo (n.2) agli operatori quasi-ellittici nel semispazio i corrispondenti risultati di [1] (per il caso dei coefficienti costanti cfr.[15] e, per i coefficienti variabili, relativamente al problema di Dirichlet, cfr. [10]). Utilizzando poi tali risultati, con le stesse tecniche di cui mi sono servita in [7] si stabilisce (n.3) la convergenza della soluzione u_ε al limite di f_ε . Sempre nel n.3 stabilisco infine la "più regolarità" locale lontano dal bordo delle proprietà di convergenza e delle stime della soluzione, usando gli operatori di convoluzione adeguati agli spazi H^s . L'ulteriore approfondimento e la diversa impostazione rispetto al lavoro precedente hanno determinato anche una più precisa formulazione dei risultati in esso stabiliti. A tale proposito colgo l'occasione per segnalare un'evidente inesattezza contenuta nel teorema [3.1] dello stesso: al secondo membro della formula di maggiorazione nell'enunciato e di tutte quelle con lo stesso secondo membro nel corso della dimostrazione, va aggiunta la norma $K \| \cdot \|_{0, R_+^n}$ della stessa funzione ivi indicata (cfr. il teorema [3.4] di questa nota).

Abbastanza generali perturbazioni singolari quasi-ellittiche, in cui però il problema ridotto ($\varepsilon = 0$) è ancora un problema differenziale, sono state trattate in [3, 4] con tecniche differenti da quelle qui seguite.

1 - Preliminari

Indichiamo con \mathbb{R}^n lo spazio euclideo a n (≥ 2) dimensioni, di punto $x = (x_1, \dots, x_n) = (x', x_n)$, e con \mathbb{R}_+^n il semispazio $\{x \in \mathbb{R}^n : x_n > 0\}$.

Se $\alpha = (\alpha_1, \dots, \alpha_n)$ è un multiordine, poniamo:

$$D^\alpha = D_{x_1}^{\alpha_1} \dots D_{x_n}^{\alpha_n} \quad \text{con} \quad D_{x_k} = \frac{1}{i} \frac{\partial}{\partial x_k} \quad (i^2 = -1),$$

e, se (m_1, \dots, m_n) è una n -pla di interi positivi,

$$m = \max_1 m_i, \quad q_i = m/m_i, \quad \langle \alpha, q \rangle = \sum_1 \alpha_i q_i;$$

poniamo inoltre, per $\xi = (\xi', \xi_n) = (\xi_1, \dots, \xi_n) \in \mathbb{R}^n$ e per $s, r \in \overline{\mathbb{R}}_+$,

$$A_s(\xi) = \sum_{i=1}^n (1 + \xi_i^2)^{s/2q_i}, \quad A_r'(\xi') = \sum_{i=1}^{n-1} (1 + \xi_i^2)^{r/2q_i};$$

infine, indichiamo con $\sim [\wedge]$ la trasformazione di Fourier in \mathbb{R}^n [\mathbb{R}^{n-1}].

Ciò posto, elenchiamo gli spazi funzionali che useremo (cfr. [17], [16], [11], [14], [18], [5]):

$H^s(\mathbb{R}^n)$, con $s \in \overline{\mathbb{R}}_+$, è lo spazio delle distribuzioni temperate in \mathbb{R}^n , u , tali che $A_s(\xi) \tilde{u}(\xi) \in L^2(\mathbb{R}^n)$, munito della norma:

$$\|u\|_{s, \mathbb{R}^n} = \|A_s \tilde{u}\|_{L^2(\mathbb{R}^n)} \quad ;$$

$H^r(\mathbb{R}^{n-1})$, con $r \in \overline{\mathbb{R}}_+$, è lo spazio delle distribuzioni temperate su \mathbb{R}^{n-1} , u , tali che $A_r'(\xi') \hat{u}(\xi') \in L^2(\mathbb{R}^{n-1})$, munito della norma:

$$\|u\|_{r, \mathbb{R}^{n-1}} = \|A_r' \hat{u}\|_{L^2(\mathbb{R}^{n-1})} \quad ;$$

$H^s(\Omega)$, con $s \in \overline{\mathbb{R}}_+$ e Ω aperto di \mathbb{R}^n , è lo spazio delle distribuzioni su Ω , u , che sono restrizioni ad Ω di elementi $U \in H^s(\mathbb{R}^n)$, munito della norma:

$$\|u\|_{s, \Omega} = \inf \|U\|_{s, \mathbb{R}^n}, \quad U = u \quad \text{su } \Omega \quad ;$$

se $\Omega = I_1 \times \dots \times I_n$ con I_i intervallo di \mathbb{R} , posto $\forall s \in \bar{\mathbb{R}}_+$ e $\forall i = 1, \dots, n$

$$s_i = [s/q_i]^{(1)}, \quad \sigma_i = s/q_i - s_i,$$

e, se $x = (x_1, \dots, x_n) \in \Omega$ e $y_i \in I_i$:

$$\Delta f(x, y_i) = f(x_1, \dots, x_n) - f(x_1, \dots, x_{i-1}, y_i, x_{i+1}, \dots, x_n)$$

$$\Delta_{s_i, \Omega}^{(i)} \varphi \begin{cases} = 0 & \text{se } \sigma_i = 0 \\ = \left(\sup_{\Omega} \int_{I_i} |x_i - y_i|^{-1-2\sigma_i} |\Delta D_{x_i}^h \varphi(x, y_i)|^2 dy_i \right)^{1/2} & \text{se } \sigma_i \neq 0, \end{cases}$$

$A^s(\Omega)$ ($s \in \bar{\mathbb{R}}_+$) è lo spazio delle (classi di) funzioni $\varphi \in L^\infty(\Omega)$ con tutte le derivate $D_{x_i}^h \varphi$, per $h \leq s_i$ e $i = 1, \dots, n$, tali che $\sum_i \Delta_{s_i, \Omega}^{(i)} \varphi < +\infty$, munito della norma:

$$\|\varphi\|_{A^s(\Omega)} = \sum_{i=1}^n \sum_{h=0}^{s_i} (\|D_{x_i}^h \varphi\|_{L^\infty(\Omega)} + \Delta_{s_i, \Omega}^{(i)} \varphi)$$

$A^r(\mathbb{R}^{n-1})$, con $r \in \bar{\mathbb{R}}_+$, è definito analogamente.

Interessano per il seguito i risultati che ora elenchiamo.

Usando le notazioni sopra introdotte, poniamo:

$$\delta_{s_i, \Omega}^{(i)} u \begin{cases} = \|D_{x_i}^{s_i} u\|_{L^2(\Omega)} & \text{se } \sigma_i = 0 \\ = \left(\int_{\Omega} dx \int_{I_i} |x_i - y_i|^{-1-2\sigma_i} |\Delta D_{x_i}^{s_i} u(x, y_i)|^2 dy_i \right)^{1/2} & \text{se } \sigma_i \neq 0; \end{cases}$$

si ha:

[1. 1] Se $\Omega = I_1 \times \dots \times I_n$, $H^s(\Omega)$ ($s \in \bar{\mathbb{R}}_+$) è isomorfo algebricamente e topologicamente allo spazio delle (classi di) funzioni $u \in L^2(\Omega)$ tali che $\sum_i \delta_{s_i, \Omega}^{(i)} u < +\infty$, munito della norma:

$$\|u\|_{L^2(\Omega)} + \sum_{i=1}^n \delta_{s_i, \Omega}^{(i)} u$$

Analogamente in riferimento agli spazi $H^r(\mathbb{R}^{n-1})$ ($r \in \bar{\mathbb{R}}_+$).

[1. 2] - Se $s_1 < s_2$, si ha:

*) $[x]$, con $x \in \bar{\mathbb{R}}_+$, indica il più grande intero non superiore a x .

$$H^{s_2}(\Omega) \subset H^{s_1}(\Omega)$$

con immersione continua. Analogamente per gli spazi $H^r(\mathbb{R}^{n-1})$.

[1.3] - Se $\Omega = I_1 \times \dots \times I_n$ e $u \in H^s(\Omega)$ e $\varphi \in A^s(\Omega)$, risulta:

$$\varphi u \in H^s(\Omega), \quad \|\varphi u\|_{s,\Omega} \leq K \|\varphi\|_{A^s(\Omega)} \|u\|_{s,\Omega}$$

con K indipendente da u e da φ ; analogamente per gli spazi $H^r(\mathbb{R}^{n-1})$.

[1.4] - Sia $u \in H^{s+\langle \alpha, q \rangle}(\Omega)$; allora $D^\alpha u \in H^s(\Omega)$ e si ha:

$$\|D^\alpha u\|_{s,\Omega} \leq K \|u\|_{s+\langle \alpha, q \rangle, \Omega}$$

con K indipendente da u ; analogamente per gli spazi $H^r(\mathbb{R}^{n-1})$.

[1.5] - Siano, $u \in H^s(\Omega)$, $0 < \bar{s} < s$, $\eta > 0$; risulta:

$$\|u\|_{\bar{s},\Omega} \leq \eta \|u\|_{s,\Omega} + K \eta^{-\bar{s}/(s-\bar{s})} \|u\|_{0,\Omega}$$

con K indipendente da u ; analogamente per gli spazi $H^r(\mathbb{R}^{n-1})$.

[1.6] - Sia $s > q_n/2$; l'applicazione lineare, definita in $C_0^\infty(\mathbb{R}_+^n)$, $u \rightarrow u(x', 0)$, si prolunga in una applicazione lineare e continua da $H^s(\mathbb{R}_+^n)$ su $H^{s-q_n/2}(\mathbb{R}^{n-1})$.

Indichiamo con λ_s la distribuzione su \mathbb{R}^n tale che:

$$\tilde{\lambda}_s(\xi) = A_s(\xi) \quad ;$$

si ha:

[1.7] - L'applicazione:

$$u \rightarrow \lambda_{\bar{s}} * u$$

è un isomorfismo algebrico e topologico di $H^s(\mathbb{R}^n)$ su $H^{s-\bar{s}}(\mathbb{R}^n)$.

Poniamo, formalmente:

$$[\lambda_\gamma, a] u = \lambda_\gamma * a u - a (\lambda_\gamma * u);$$

sussiste la proposizione :

[1.8]- Siano, $u \in H^{s+\gamma}(\mathbb{R}^n)$ con $s \geq 0$ e $\gamma \in]0,1]$, $a \in S(\mathbb{R}^n)$;

si ha :

$$\| [\lambda_\gamma, a] u \|_{s, \mathbb{R}^n} \leq K \| u \|_{s, \mathbb{R}^n} \| A_{s+\gamma}(\xi) \tilde{a}(\xi) \|_{L^1(\mathbb{R}^n)}$$

con K indipendente da u (e da a).

Dim. Osserviamo dapprima che, utilizzando la diseguaglianza generalizzata di Minkowski, si ha :

$$\begin{aligned} \| \lambda_\gamma * au - a(\lambda_\gamma * u) \|_{s, \mathbb{R}^n} &= \| \overbrace{A_s(\lambda_\gamma * au) - a(\lambda_\gamma * u)} \|_{0, \mathbb{R}^n} = \\ &= \left\| \int_{\mathbb{R}^n} \tilde{a}(\eta) \tilde{u}(\xi - \eta) A_s(\xi) \left\{ A_\gamma(\xi) - A_\gamma(\xi - \eta) \right\} d\eta \right\|_{0, \mathbb{R}^n} \leq \\ &\leq \int_{\mathbb{R}^n} |\tilde{a}(\eta)| d\eta \left(\int_{\mathbb{R}^n} |A_s(\vartheta + \eta) \tilde{u}(\vartheta)| \left\{ A_\gamma(\vartheta + \eta) - A_\gamma(\vartheta) \right\}^2 d\vartheta \right)^{1/2}; \end{aligned}$$

per concludere la dimostrazione basta osservare che risulta :

$$A_s(\vartheta + \eta) \leq K A_s(\vartheta) A_s(\eta), \quad |A_\gamma(\vartheta + \eta) - A_\gamma(\vartheta)| \leq A_\gamma(\eta)^2.$$

Seguendo le notazioni di [1], per $\lambda \in \mathbb{C}$ e $u \in H^s(\Omega)$ poniamo :

$$\| \lambda u \|_{s, \Omega} = |\lambda|^s \| u \|_{s, \Omega} + \| u \|_{s, \Omega};$$

analogamente negli spazi $H^r(\mathbb{R}^{n-1})$. Facilmente si verificano le seguenti proposizioni:

[1.9] - Siano, $u \in H^s(\Omega)$ e $0 < \bar{s} < s$; risulta :

$$|\lambda|^{\bar{s}} \| u \|_{s-\bar{s}, \Omega} \leq K \| u \|_{s, \Omega}$$

2) Si osservi che, essendo $\gamma \in]0,1]$ si ha che $\gamma/q, \in]0,1]$; inoltre, se $a, b \geq 0$ e $\alpha \in]0,1]$, risulta:

$$(a^\alpha + b^\alpha) \leq a + b^\alpha;$$

tenendo conto di ciò si prova facilmente che si ha:

$$A_\gamma(\vartheta + \eta) \leq A_\gamma(\vartheta) + A_\gamma(\eta)$$

da cui ovviamente l'asserto.

con K indipendente da u e da λ . Analogamente negli spazi $H^r(\mathbb{R}^{n-1})$.

[1.10] - Sia $u \in H^{s+\langle \alpha, q \rangle}(\Omega)$; si ha:

$$\| D^\alpha u \|_{s, \Omega} \leq K \| u \|_{s+\langle \alpha, q \rangle, \Omega}$$

con K indipendente da u e da λ . Analogamente negli spazi $H^r(\mathbb{R}^{n-1})$.

Infine, proviamo che risulta:

[1.11] - Siano, $u \in H^s(\mathbb{R}_+^n)$ e $\varphi \in A^s(\mathbb{R}_+^n)$; si ha:

$$\| \varphi u \|_{s, \mathbb{R}_+^n} \leq K \left(\| \varphi \|_{L^\infty(\mathbb{R}_+^n)} + o_\infty(\lambda) \right) \| u \|_{s, \mathbb{R}_+^n},$$

con K indipendente da φ , u , λ e $o_\infty(\lambda)$ un infinitesimo per $\lambda \rightarrow \infty$, dipendente da φ ma non da u . Analogamente negli spazi $H^r(\mathbb{R}^{n-1})$.

Dim. Supponiamo dapprima $0 < s < 1$; allora se $I_i = \mathbb{R}$ per $i \neq n$ e $I_n = \mathbb{R}_+$, si ha:

$$\begin{aligned} & \left(\delta_{s, \mathbb{R}_+^n}^{(u)}(\varphi u) \right)^2 \leq \\ & \leq K \left(\int_{\mathbb{R}_+^n} |\varphi(x)|^2 dx \int_{I_1} |x_1 - y_1|^{-1-2s} |\Delta u(x, y_1)|^2 dy_1 + \int_{\mathbb{R}_+^n} |u(x)|^2 dx \int_{I_1} |x_1 - y_1|^{-1-2s} |\Delta \varphi(x, y_1)|^2 dy_1 \right) \\ & \leq K \| \varphi \|_{L^\infty(\mathbb{R}_+^n)}^2 \| u \|_{s, \mathbb{R}_+^n}^2 + K \varphi \| u \|_{0, \mathbb{R}_+^n}^2. \end{aligned}$$

Se poi $s \geq 1$, basta tenere conto che risulta:

$$\| \varphi u \|_{s, \mathbb{R}_+^n} \leq K \left(\| \varphi u \|_{0, \mathbb{R}_+^n} + \sum_i \| D_{x_i}^{s_i}(\varphi u) \|_{s-s_i, q_i, \mathbb{R}_+^n} \right).$$

*) In una stessa dimostrazione K denota genericamente una costante rispetto agli elementi variabili precisati nell'enunciato.

2 - Problemi quasi-ellittici dipendenti da un parametro

Consideriamo in \mathbb{R}_+^n l'operatore :

$$\mathcal{A}(x, D, \lambda) = \sum_{\langle a, q \rangle + n_{\text{g.m.}} = m} a_{a,k}(x) \lambda^k D^a$$

$$\lambda \in \mathbb{C}, \quad a \leq \arg \lambda \leq b, \quad k \in \mathbb{N}_0;$$

posto

$$\mathcal{A}_0(x, D, \lambda) = \sum_{\langle a, q \rangle + n_{\text{g.m.}} = m} a_{a,k}(x) \lambda^k D^a,$$

supponiamo verificate le seguenti condizioni:

- 1) i coefficienti $a_{a,k}$ sono di classe $A^{s-\langle a, q \rangle}(\mathbb{R}_+^n)$ con $s \geq m$ fissato, e quelli di \mathcal{A}_0 sono anche continui in $\overline{\mathbb{R}_+^n}$ e convergenti all'infinito;
 2) $\forall x \in \overline{\mathbb{R}_+^n} \cup \{\infty\}, \forall (\xi, \lambda) \neq (0, 0)$, risulta:

$$\mathcal{A}_0(x, \xi, \lambda) \neq 0.$$

Grazie alle condizioni poste, con noti ragionamenti si deduce che $\forall x' \in \mathbb{R}^{n-1} \cup \{\infty\}$ e $\forall (\xi', \lambda) \neq (0, 0)$, l'equazione in \mathbb{C} :

$$\mathcal{A}_0((x', 0), \xi', \tau, \lambda) = 0 \quad \tau \in \mathbb{C}$$

ammette sempre lo stesso numero di radici con parte immaginaria positiva,

$$\tau_1^+, \dots, \tau_\nu^+.$$

Consideriamo quindi ν operatori al bordo :

$$\mathcal{B}_j(x', D, \lambda) = \sum_{\langle a, q \rangle + k \leq p_j} b_{j,a,k}(x') \lambda^k D^a$$

$$p_j < s - q_n/2 \quad j = 1, \dots, \nu;$$

posto:

$$\mathcal{B}_{j,0}(x', D, \lambda) = \sum_{\langle a, q \rangle + k = p_j} b_{j,a,k}(x') \lambda^k D^a,$$

supponiamo verificate le seguenti condizioni :

- 3) i coefficienti $b_{i,a,k}$ sono di classe $A^{s-q, q > -q_n/2}(\mathbb{R}^{n-1})$ e quelli di $\mathcal{B}_{j,0}$ sono anche continui e convergenti all'infinito;
- 4) $\forall x' \in \mathbb{R}^{n-1} \cup \{\infty\} \in \mathcal{V}(\xi', \lambda) \neq (0,0)$, i polinomi $\mathcal{B}_{j,0}(x', \xi', \tau, \lambda)$ sono linearmente indipendenti modulo $\prod_i (\tau - \tau_i)$.

Orbene, nelle condizioni descritte si ha:

[2.1] - Esiste $\lambda_0 > 0$ tale che per $|\lambda| > \lambda_0$ il problema:

$$(2.1) \quad \begin{cases} \mathcal{A}(x, D, \lambda) u = f & f \in H^{s-m}(\mathbb{R}_+^n) \\ \mathcal{B}_j(x', D, \lambda) u(x', 0) = g_j & g_j \in H^{s-p_j - q_n/2}(\mathbb{R}^{n-1}) \\ j = 1, \dots, \nu \end{cases}$$

ammette in $H^s(\mathbb{R}_+^n)$ una ed una sola soluzione e risulta:

$$(2.2) \quad \|u\|_{s, \mathbb{R}_+^n} \leq K \left(\| \mathcal{A} u \|_{s-m, \mathbb{R}_+^n} + \sum_j \| \mathcal{B}_j u \|_{s-p_j - q_n/2, \mathbb{R}^{n-1}} \right)$$

con K indipendente da u e da λ .

Accenniamo brevemente alla dimostrazione, che sostanzialmente segue lo schema sviluppato in [1] (cfr. anche [10]).

Innanzitutto si prova che $\forall \bar{x} \in \bar{\mathbb{R}}_+^n$ e $\forall \lambda \neq 0$, l'operatore $\left\{ \mathcal{A}_0(\bar{x}, D, \lambda), \mathcal{B}_{j,0}(\bar{x}, D, \lambda) (j = 1, \dots, \nu) \right\}$ è invertibile e risulta:

$$\|u\|_s \leq K \left(\| \mathcal{A}_0(\bar{x}, D, \lambda) u \|_{s-m} + \sum_j \| \mathcal{B}_{j,0}(\bar{x}, D, \lambda) u \|_{s-p_j - q_n/2} \right)^{1/2}$$

per $u \in H^s(\mathbb{R}_+^n)$, con K indipendente da u , \bar{x} e λ .

Si dimostra successivamente che $\exists \delta > 0, \lambda_0 > 0$ tali che la (2.2) sussiste per $|\lambda| > \lambda_0$ e per $u \in H^s(\mathbb{R}_+^n)$ con il supporto di diametro $< \delta$ oppure distante da 0 per più di $1/\delta$.

Si considerano quindi, un ricoprimento finito $\{ \mathcal{O}_i \}$ di \mathbb{R}_+^n costituito da aperti di cui uno, \mathcal{O}_k , non limitato, tali che risulta:

4) D'ora innanzi, quando non ci sono possibilità di equivoci, nei simboli delle norme omettiamo l'indicazione dell'insieme cui si riferiscono.

$$\text{diam}_{i \neq k} \mathcal{O}_i < \delta, \quad \text{dist}(\mathcal{O}_k, 0) > 1/\delta$$

ed una partizione dell'unità $\{\varphi_i\}$ relativa a tale ricoprimento; si ha:

$$\|\varphi_i u\|_s \leq K \left(\|A u\|_{s-m} + \sum_j \|B_j u\|_{s-p_j-q_n/2} + o_\infty(\lambda) \|u\|_s \right)$$

con K indipendente da $u \in H^s(\mathbb{R}_+^n)$ e da λ , e $o_\infty(\lambda)$ un infinitesimo per $\lambda \rightarrow \infty$ indipendente anch'esso da u ; dopo ciò si perviene facilmente alla (2.2). Al fine di provare l'esistenza della soluzione, si dimostra dapprima che $\exists \varepsilon > 0$ e $\lambda_0 > 0$ tali che, se l'oscillazione dei coefficienti di A_0 e dei $B_{j,0} \leq \varepsilon$, l'operatore $\{A_0, B_j\}$ si inverte per $|\lambda| > \lambda_0$; allora, considerando un adeguato ricoprimento di \mathbb{R}_+^n del tipo di sopra, scelto in modo che negli \mathcal{O}_i l'oscillazione di tali coefficienti $\leq \varepsilon$, si ottiene, con i ragionamenti svolti in [1], l'invertibilità dell'operatore assegnato.

3 - Perturbazioni singolari

Consideriamo in \mathbb{R}_+^n l'operatore

$$A(x, D) = \sum_{\langle a, q \rangle \leq m} a_a(x) D^a$$

e la famiglia, di parametro $\varepsilon > 0$,

$$A_\varepsilon(x, D) = \varepsilon^m A(x, D) + I \quad ;$$

posto :

$$A_0(x, D) = \sum_{\langle a, q \rangle = m} a_a(x) D^a \quad ,$$

imponiamo le seguenti condizioni :

(1) i coefficienti a_a sono di classe $A^{s - \langle a, q \rangle}(\mathbb{R}_+^n)$, con $s \geq m$ fissato, e quelli di A_0 sono anche continui in \mathbb{R}_+^n e convergenti all'infinito;

(2) $\forall x \in \mathbb{R}_+^n \cup \{\infty\}$ risulta :

$$A_0(x, \xi) \neq 0 \quad \forall \xi \neq 0, \quad A_0(x, \xi) + 1 \neq 0 \quad \forall \xi$$

(2)₀ $\forall \xi^* \neq 0$ è costante, ν , il numero delle radici con parte immaginaria positiva dell'equazione in \mathbb{C} , $A_0(0, \xi^*, \tau) = 0$.

In conseguenza di ciò, si ha che $\forall x' \in \mathbb{R}^{n-1} \cup \{\infty\}$ e $\forall \xi^* \neq 0$ [$\forall \xi^*$] le radici con parte immaginaria positiva dell'equazione:

$$A_0(x', 0, \xi^*, \tau) = 0 \quad \left[A_0(x', 0, \xi^*, \tau) + 1 = 0 \right]$$

sono ancora ν ; le indichiamo con $\tau_{1,0}^+, \dots, \tau_{\nu,0}^+ [\tau_1^+, \dots, \tau_\nu^+]$

Consideriamo quindi ν operatori al bordo:

$$\mathcal{B}_j^{(\varepsilon)}(x', D) = \sum_{\langle a, q \rangle + k \leq p_j} \varepsilon^{p_j - k} b_{j,a,k}(x') D^a$$

$$j = 1, \dots, \nu \quad p_j < s - q_n/2$$

e, posto :

$$B_{j,0}(x', D) = \sum_{\langle a, q \rangle = p_j} b_{j,a,k}(x') D^a \quad , \quad \mathcal{B}_{j,0}(x', D) = \sum_{\langle a, q \rangle + k = p_j} b_{j,a,k}(x') D^a \quad ,$$

supponiamo che risulta :

- (3) i coefficienti $b_{j,\alpha}$ sono di classe $A^{s-\langle\alpha, q\rangle - q_n/2} (R^{n-1})$ e quelli di $\mathcal{B}_{j,0}$ sono anche continui e convergenti all'infinito;
- (4) $\forall x' \in R^{n-1} \cup \{\infty\}$ e $\forall \xi' \neq 0 [\forall \xi']$ i polinomi $B_{j,0}(x', \xi', \tau)$ $\left[\mathcal{B}_{j,0}(x', \xi', \tau) \right]$ sono linearmente indipendenti mod. $\prod_i (\tau - \tau_{i,0})$.

Nelle condizioni descritte, le perturbazioni singolari :

$$(3.1) \quad \left\{ \begin{array}{l} \mathcal{A}_\varepsilon(x, D) u = f_\varepsilon \quad f_\varepsilon \in H^{s-m}(R_+^n) \\ \mathcal{B}_j^{(\varepsilon)}(x', D) u(x', 0) = g_j^{(\varepsilon)} \quad g_j^{(\varepsilon)} \in H^{s-p_j - q_n/2}(R^{n-1}) \\ j = 1, \dots, \nu \end{array} \right.$$

si inquadrano nell'ambito dei problemi dipendenti da un parametro considerati nel n. 2; qui λ è reale ≥ 0 e $\lambda = 1/\varepsilon$ per $\lambda \neq 0$. Dal teorema [2.1] si deduce il seguente:

[3.1] - Esiste $\varepsilon_0 > 0$ tale che $\forall \varepsilon < \varepsilon_0$ e $\forall f_\varepsilon \in H^{s-m}(R_+^n)$, $g_j^{(\varepsilon)} \in H^{s-p_j - q_n/2}(R^{n-1})$, il problema (3.1) ammette in $H^s(R_+^n)$ una ed una sola soluzione, e $\forall u \in H^s(R_+^n)$ si ha:

$$\|u\|_{0, R_+^n} + \varepsilon^s \|u\|_{s, R_+^n} \leq K \left\{ \varepsilon^{s-m} \|\mathcal{A}_\varepsilon u\|_{s-m, R_+^n} + \|\mathcal{A}_\varepsilon u\|_{0, R_+^n} + \sum_j \varepsilon^{q_n/2} \|\mathcal{B}_j^{(\varepsilon)} u\|_{0, R^{n-1}} + \sum_j \varepsilon^{s-p_j} \|\mathcal{B}_j^{(\varepsilon)} u\|_{s-p_j - q_n/2, R^{n-1}} \right.$$

con K indipendente da u e da ε ; in particolare ($s=m$) si ha:

$$\forall h \in [0, m] \quad \varepsilon^h \|u\|_{h, R_+^n} \leq K \left\{ \|\mathcal{A}_\varepsilon u\|_{0, R_+^n} + \sum_j \varepsilon^{q_n/2} \|\mathcal{B}_j^{(\varepsilon)} u\|_{0, R^{n-1}} + \sum_j \varepsilon^{m-p_j} \|\mathcal{B}_j^{(\varepsilon)} u\|_{m-p_j - q_n/2, R^{n-1}} \right\}$$

Ciò premesso, con gli stessi ragionamenti svolti in [7] si prova che nelle condizioni descritte, con $s=m$, si ha:

[3.2] - Sia $\varepsilon < \varepsilon_0$ e u_ε la soluzione di classe $H^m(R_+^n)$ del problema:

$$(3.2) \quad \left\{ \begin{array}{l} \mathcal{A}_\varepsilon(x, D) u = f_\varepsilon \quad f_\varepsilon \in L^2(\mathbb{R}_+^n) \\ \mathcal{B}_j^{(\varepsilon)}(x', D) u(x', 0) = 0 \\ j = 1, \dots, \nu \end{array} \right.$$

allora, se per $\varepsilon \rightarrow 0$ $f_\varepsilon \rightarrow f$ in $L^2(\mathbb{R}_+^n)$, risulta:

$$u_\varepsilon \rightarrow f \text{ in } L^2(\mathbb{R}_+^n), \quad \varepsilon^m \|u_\varepsilon\|_{m, \mathbb{R}_+^n} \rightarrow 0$$

$$\varepsilon^m \|u_\varepsilon\|_{m, \mathbb{R}_+^n} + \|u_\varepsilon\|_{0, \mathbb{R}_+^n} \leq K \|f_\varepsilon\|_{0, \mathbb{R}_+^n}$$

con K indipendente da ε .

Immediato corollario del teorema [3.2] è la seguente proposizione:

[3.3] - Sia $\varepsilon < \varepsilon_0$ e u_ε la soluzione di classe $H^m(\mathbb{R}_+^n)$ del problema (3.1); se risulta che per $\varepsilon \rightarrow 0$, $f_\varepsilon \rightarrow f$ in $L^2(\mathbb{R}_+^n)$ ed esiste $\{w_\varepsilon\}$ in $H^m(\mathbb{R}_+^n)$ tale che:

$$a) \mathcal{B}_j^{(\varepsilon)}(x', D) w_\varepsilon(x', 0) = g_j^{(\varepsilon)}, \quad b) \{w_\varepsilon\} \text{ converge in } L^2(\mathbb{R}_+^n), \quad c) \varepsilon^m \|A(x, D) w_\varepsilon\|_{0, \mathbb{R}_+^n} \rightarrow 0,$$

allora si ha:

$$u_\varepsilon \rightarrow f \text{ in } L^2(\mathbb{R}_+^n);$$

e se, in luogo della c), risulta che $\varepsilon^m \|w_\varepsilon\|_{m, \mathbb{R}_+^n} \rightarrow 0$ ^{s)}, si ha pure:

$$\varepsilon^m \|u_\varepsilon\|_{m, \mathbb{R}_+^n} \rightarrow 0$$

Dim. Basta osservare che $u_\varepsilon - w_\varepsilon$ è soluzione del problema:

$$\left\{ \begin{array}{l} \mathcal{A}_\varepsilon(x, D) u = f_\varepsilon - \varepsilon^m A(x, D) w_\varepsilon - w_\varepsilon \\ \mathcal{B}_j^{(\varepsilon)}(x', D) u(x', 0) = 0 \end{array} \right.$$

e quindi applicare il teorema [3.2].

s) Tale condizione include evidentemente la c)

Ci proponiamo ora di stabilire un risultato di "più regolarità" locale lontano dal bordo, delle proprietà di convergenza e delle stime a priori delle soluzioni u_ε descritte nel teorema [3.2]. Come è noto (cfr. [12]) non ci si può attendere che analoghe proprietà valgano in prossimità del bordo.

Supponiamo verificate le condizioni del teorema [3.2] e supponiamo inoltre che i coefficienti degli operatori A e $\mathcal{B}_j^{(\varepsilon)}$ sono localmente nelle classi descritte all'inizio di questo paragrafo e quelli di A_0 sono anche C^∞ .

[3.4] Nelle condizioni poste, per le u_ε soluzioni del problema (3.2) risulta: se, per $\varepsilon \rightarrow 0$,

$$f_\varepsilon \rightarrow f \quad \text{in } H^{s-m}(\Omega'), \quad \text{con } \Omega' \subset \subset \mathbb{R}_+^n$$

allora, $\forall \Omega'' \subset \subset \Omega'$ si ha:

$$u_\varepsilon \rightarrow f \quad \text{in } H^{s-m}(\Omega''), \quad \varepsilon^m u_\varepsilon \rightarrow 0 \quad \text{in } H^s(\Omega'')$$

$$(3.3) \quad \|u_\varepsilon\|_{s-m, \Omega''} + \varepsilon^m \|u_\varepsilon\|_{s, \Omega''} \leq K \left(\|f_\varepsilon\|_{s-m, \Omega'} + \|f_\varepsilon\|_{0, \mathbb{R}_+^n} \right)$$

con K indipendente da ε .

Dim. Sia $s = m + r$, $r = t\gamma$ con $t \in \mathbb{N}_0$ e $\gamma \in]0, 1]$; ragioniamo per induzione su t . Il teorema è vero per $t = 0$; supponiamolo vero per $t - 1$ e proviamolo per t .

Siano $\Omega'' \subset \subset \Omega_2 \subset \subset \Omega_1 \subset \subset \Omega'$ e $\varphi \in C_0^\infty(\Omega_2)$ tale che $\varphi(x) = 1$ in Ω'' ; osserviamo che $u_\varepsilon \in H^{m+t\gamma}(\Omega_1)$, che $\varphi(\lambda_\gamma * \varphi u_\varepsilon) \in H^{m+(t-1)\gamma}(\mathbb{R}_+^n)$, e che risulta:

$$(3.4) \quad \mathcal{A}_\varepsilon(x, D)(\varphi(\lambda_\gamma * \varphi u_\varepsilon)) =$$

$$= \varepsilon^m \varphi A(\lambda_\gamma * \varphi u_\varepsilon) + \varphi(\lambda_\gamma * \varphi u_\varepsilon) + \varepsilon^m \sum_{\substack{0 \neq \beta \leq \alpha \\ \langle \alpha, \alpha \rangle \leq m}} a_\alpha \binom{\alpha}{\beta} D^\beta \varphi D^{\alpha-\beta}(\lambda_\gamma * \varphi u_\varepsilon) =$$

$$= \varphi(\lambda_\gamma * \varphi f_\varepsilon) + \varepsilon^m \varphi(A(\lambda_\gamma * \varphi u_\varepsilon) - \lambda_\gamma * \varphi A u_\varepsilon) + \varepsilon^m I_1, \quad ,$$

$$\mathcal{B}_j^{(\varepsilon)}(\varphi(\lambda_\gamma * \varphi u_\varepsilon))(x', 0) = 0 \quad j = 1, \dots, \nu;$$

si osservi ora che si ha:

$$(3.5) \quad \|\varphi(\lambda_\gamma * \varphi(f_\varepsilon - f))\|_{(t-1)\gamma, \Omega_1} \leq \|\varphi(\lambda_\gamma * \varphi(f_\varepsilon - f))\|_{(t-1)\gamma, \mathbb{R}_+^n} \leq K \|f_\varepsilon - f\|_{t\gamma, \Omega_1} \rightarrow 0$$

e che per $\langle \alpha, q \rangle = m$ risulta :

$$(3.6) \quad \begin{aligned} & \varepsilon^m \|\varphi_{a_\alpha}(\lambda_\gamma * D^\alpha(\varphi u_\varepsilon)) - \varphi(\lambda_\gamma * \varphi_{a_\alpha} D^\alpha u_\varepsilon)\|_{(t-1)\gamma, \Omega_1} \leq \\ & \leq \varepsilon^m \|\lambda_\gamma * a_\alpha \varphi\|_{(t-1)\gamma, R^n} + \varepsilon^m \|\lambda_\gamma * \varphi\|_{(t-1)\gamma, R^n} + \varepsilon^m \|\varphi_{a_\alpha} D^\alpha u_\varepsilon\|_{(t-1)\gamma, R^n} + \\ & \quad + \varepsilon^m \sum_{0 \neq \beta \leq \alpha} \|\varphi_{a_\alpha}(\lambda_\gamma * \binom{\alpha}{\beta} D^\beta \varphi D^{\alpha-\beta} u_\varepsilon)\|_{(t-1)\gamma, R^n} \leq \\ & \leq K \varepsilon^m \left(\|\varphi D^\alpha u_\varepsilon\|_{(t-1)\gamma} + \sum_{0 \neq \beta \leq \alpha} \|D^\beta \varphi D^{\alpha-\beta} u_\varepsilon\|_{t\gamma} \right) \leq K \varepsilon^m \|u_\varepsilon\|_{m+(t-1)\gamma, \Omega_1} \rightarrow 0 \end{aligned}$$

d'altra parte, per $\langle \alpha, q \rangle < m$ risulta :

$$(3.7) \quad \begin{aligned} & \varepsilon^m \|\varphi_{a_\alpha}(\lambda_\gamma * D^\alpha(\varphi u_\varepsilon)) - \varphi(\lambda_\gamma * \varphi_{a_\alpha} D^\alpha u_\varepsilon)\|_{(t-1)\gamma, \Omega_1} \leq \\ & \leq K \varepsilon^m \left(\|\lambda_\gamma * D^\alpha(\varphi u_\varepsilon)\|_{(t-1)\gamma, R^n} + \|\lambda_\gamma * \varphi_{a_\alpha} D^\alpha u_\varepsilon\|_{(t-1)\gamma, R^n} \right) \leq \\ & \leq K \varepsilon^m \|u_\varepsilon\|_{\langle \alpha, q \rangle + t\gamma, \Omega_1} \rightarrow 0 ; \end{aligned}$$

analogamente si ha :

$$\varepsilon^m \|I_1\|_{(t-1)\gamma, \Omega_1} \leq K \varepsilon^m \|u_\varepsilon\|_{m+(t-1)\gamma, \Omega_1} \rightarrow 0 ;$$

allora, ricordando ancora l'ipotesi di induzione, dalla (3.4) si deduce:

$$(3.9) \quad \varphi(\lambda_\gamma * \varphi u_\varepsilon) \rightarrow \varphi(\lambda_\gamma * \varphi f) \quad \text{in } H^{(t-1)\gamma}(\Omega_2)$$

$$(3.10) \quad \varepsilon^m \varphi(\lambda_\gamma * \varphi u_\varepsilon) \rightarrow 0 \quad \text{in } H^{m+(t-1)\gamma}(\Omega_2)$$

$$(3.11) \quad \|\varphi(\lambda_\gamma * \varphi u_\varepsilon)\|_{(t-1)\gamma, \Omega_2} + \varepsilon^m \|\varphi(\lambda_\gamma * \varphi u_\varepsilon)\|_{m+(t-1)\gamma, \Omega_2} \leq$$

$$\leq K \left(\|\mathcal{B}_\varepsilon(\varphi(\lambda_\gamma * \varphi u_\varepsilon))\|_{(t-1)\gamma, \Omega_1} + \|\mathcal{B}_\varepsilon(\varphi(\lambda_\gamma * \varphi u_\varepsilon))\|_{0, R_+^n} \right);$$

da questa disuguaglianza, tenendo conto delle (3.6), (3.7), (3.8), e ragionando su $\|\mathcal{B}_\varepsilon(\varphi(\lambda_\gamma * \varphi u_\varepsilon))\|_{0, R_+^n}$ similmente al termine precedente, si ottiene :

$$(3.12) \quad \|\varphi(\lambda_\gamma * \varphi u_\varepsilon)\|_{(t-1)\gamma, \Omega_2} + \varepsilon^m \|\varphi(\lambda_\gamma * \varphi u_\varepsilon)\|_{m+(t-1)\gamma, \Omega_2} \leq K \left(\|\varepsilon_\varepsilon\|_{t\gamma, \Omega_2} + \|\varepsilon_\varepsilon\|_{0, R_+^n} \right)$$

Dalla (3.9) si deduce che $u_\varepsilon \rightarrow f$ in $H^{(t-1)\gamma}(\Omega^m)$; infatti si ha:

$$\|u_\varepsilon - f\|_{t\gamma, \Omega^m} \leq \|\varphi^2(u_\varepsilon - f)\|_{t\gamma, R^n} \leq K \|\lambda_\gamma * \varphi^2(u_\varepsilon - f)\|_{(t-1)\gamma, R^n} \leq$$

$$\leq K \left(\| [\lambda_\gamma, \varphi] (u_\varepsilon - f) \|_{(t-1)\gamma, \mathbb{R}^n} + \| \varphi (\lambda_\gamma * \varphi (u_\varepsilon - f)) \|_{(t-1)\gamma, \mathbb{R}^n} \right) \leq$$

$$\leq K \left(\| u_\varepsilon - f \|_{(t-1)\gamma, \Omega_2} + \| \varphi (\lambda_\gamma * \varphi (u_\varepsilon - f)) \|_{(t-1)\gamma, \Omega_2} \right) \rightarrow 0$$

da cui l'asserto. In modo analogo, dalla (3.10) si ha che $\varepsilon^m u_\varepsilon \rightarrow 0$ in $H^{m+t\gamma}(\Omega'')$ e dalla (3.12) si ottiene la (3.3).

- [1] AGRANOVICH M.S., VISHIK M.I., Elliptic problems with a parameter and parabolic problems of general type. Russian Math. Surveys, 19 (1964), 53-157
- [2] ALVINO A., TROMBETTI G., Problemi ellittici dipendenti da un parametro in L^p , Ricerche di Mat. XXVI (1977), 335-348.
- [3] COCLITE M.M., Perturbazioni singolari per un problema quasi-ellittico a coefficienti costanti nel semispazio, Annali Mat. Pura Appl., (4) 117 (1978), 349-385.
- [4] COCLITE M.M., Perturbazioni singolari per un problema quasi ellittico a coefficienti variabili nel semispazio, Annali Univ. Ferrara, Sez.VII-Sc. Mat. XXV (1979), 109-142.
- [5] DEL PRETE V., FORTUNATO D., Teoremi di regolarizzazione per problemi quasi-ellittici in un semispazio ed applicazioni, Ricerche di Mat., XXIII (1974), 87-128.
- [6] FIFE P.C., Singularly perturbed elliptic boundary value problems, I. Poisson kernels and potential theory, Annali di Mat. 90 (1971), 99-148.
- [7] FIODO O., Perturbazioni singolari e problemi quasi-ellittici, Rendiconto Acc. Sc. Fis. Mat. Soc. Naz. Sc. Lett. Arti Napoli, (IV), XLVII (1980), 217-229.
- [8] FRANK L.S., Coercive singular perturbations, I: A priori estimates, Annali Mat. Pura Appl. 119 (1979), 41-113.
- [9] FRANK L.S., WENDT W.D., Coercive singular perturbations, II: Reduction and convergence, Journal of Math. An. and Appl., 88 (1982), 464-504.

- [10] GIARRUSSO E., Problemi quasi-ellittici dipendenti da un parametro in L^p ,
Rendiconti Acc. Naz. Sc. dei XL, Memorie di Matematica, 98° (1979-80),
IV-5; 63-82.
- [11] HORMANDER L., Linear Partial Differential Operators, Springer-Verlag
1963.
- [12] HUET D., Perturbations singulières relatives au problème de Dirichlet
dans un demi-espace, Ann. Sc. Norm. Sup. Pisa, 18 (1964); 425-448.
- [13] HUET D., Sur quelques problèmes de perturbation singulière dans les
espaces L^p , Rev. Fac. Cien. Lisboa, 11 (1965), 137-164.
- [14] PARENTI C., Valutazioni a priori e regolarità per soluzioni di equa-
zioni quasi-ellittiche, Rendiconti Sem. Mat. Univ. Padova, XLV (1971),
1-70.
- [15] SCHIANCHI R., Problemi quasi-ellittici nel semispazio. Rendiconti del
Cir. Mat. di Palermo, II, XXIX (1980), 103-138.
- [16] SLOBODECKII, Generalized Sobolev spaces and their applications to boun-
dary problems for partial differential equations, (1958); Am. Math.
Soc. Transl., 57 (1966), 207-275.
- [17] TROISI M., Problemi al contorno con condizioni omogenee per le equa-
zioni quasi-ellittiche, Annali di Mat. Pura Appl. (IV), XC (1971), 331-412.
- [18] VOLEVICH L.R., PANEYAKH B.P., Alcuni spazi di funzioni generalizzate
e teoremi di immersione, Russian Math. Surveys, 20 (1965), 1-73.

La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una
commissione composta dai soci D. Greco, G. Cimmino, C. Ciliberto.

VITELLOGENIN SYNTHESIS INDUCED BY ESTRADIOL 17 β IN THE GREEN FROG
RANA ESCULENTA COMPLEX.

Nota di *Gobbetti A., *Polzonetti-Magni A., *Zerani M., **Paolucci M.

Presentata dal Socio Ordinario G. Chieffi.

Adunanza del 23/7/83.

Riassunto.

E' stato studiato l'effetto della somministrazione di estradiolo 17 β sulla sintesi di vitellogenina plasmatica in femmine di Rana esculenta durante il periodo estivo. L'estradiolo determina un aumento molto significativo della concentrazione di vitellogenina nel plasma degli animali ovariectomizzati; mentre l'aumento è molto modesto negli animali ipofisectomizzati. Questi risultati suggeriscono che altri ormoni di origine ipofisaria agiscano sinergicamente con gli estrogeni nell'indurre la sintesi di vitellogenina.

Abstract.

The effects of estradiol 17 β on vitellogenin synthesis were studied in the plasma of female Rana esculenta during Summer period. Estradiol induces a significant increase of vitellogenin titre in ovariectomized animals, while after hypophysectomy a reduced response was observed. These data suggest the involvement of the pituitary gland for optimal response to estrogen.

Vitellogenesis is known to play a key role in the reproductive biology of most oviparous species. Oocytes are, in fact, capable of accumulating large amounts of reserve materials, generally referred to as yolk, which are utilized during their subsequent embryonic development. The general consensus today is that, non-mammalian vertebrates possess a common mechanism by which oocytes may acquire their protein to a large extent (Wallace, 1978). This is known to occur through pinocytotic uptake of a haematic yolk precursor, namely vitellogenin (Pan et al. 1969; Wallace, 1970). Synthesis of such a precursor is known to take place in the liver following treatment with estrogens either under in vivo

* Dipartimento di Biologia Cellulare, Università di Camerino, Camerino (ITALY).

** Istituto e Museo di Zoologia, Università di Napoli, Napoli (ITALY).

(Follet and Redshaw, 1968; Wittliff and Kenney, 1972; Zelson and Wittliff, 1973) and in vitro conditions (Wangh and Knowland, 1975). According to this model any variation in the vitellogenin titre, either induced experimentally or naturally occurring, is thought to result from the hormonal regulation of vitellogenesis (Korsgaard and Petersen, 1976; Signorini et al. 1981).

Vitellogenin titre has been measured by rocket immunoelectrophoresis in specimens of Rana esculenta by Giorgi et al. (1982). Variations in the serum level of vitellogenin are temporally related to ovarian growth during the reproductive cycle; in fact vitellogenin titre is low at spawning but increases prior to ovarian recovery. We report a study on how vitellogenin increase may be experimentally induced by oestradiol-17 β in Rana esculenta. In this study we aimed to verify whether the high concentration of estrogens found in July in these specimens (Polzonetti-Magni et al. in press) is such as to affect vitellogenin increase as naturally occurs prior to ovarian recovery.

Materials and Methods.

Sexually mature female frogs, Rana esculenta, were obtained from Colfiorito (Umbria) in July 1981. Three groups of animals were used in this experiment: intact, hypophysectomized (HYPOX), ovariectomized (OV). Hypophysectomy was performed under brevial anesthesia with MS 222 Sandoz using a ventral approach through the root of the mouth. Completeness of hypophysectomy was verified by

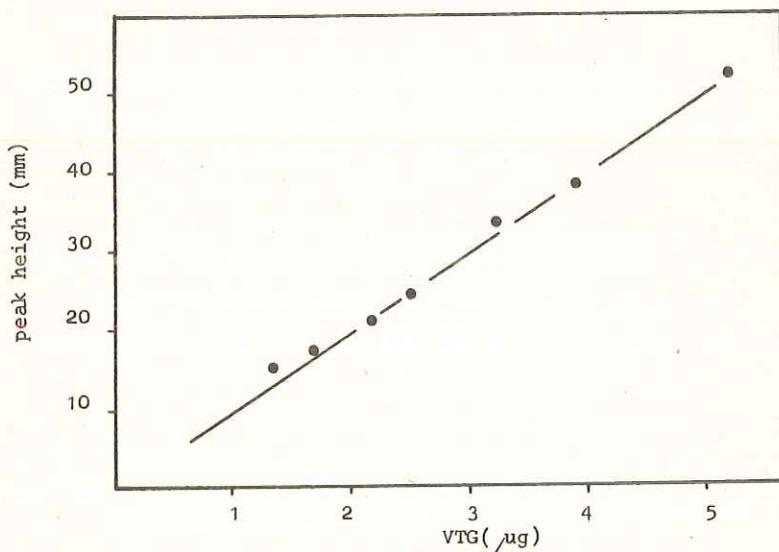


Fig.1 - Calibration curve for vitellogenin as determined by quantitative immunoelectrophoresis. The peak height of the immunoprecipitation rockets was plotted versus the relative amount (μl) of antigen placed in the corresponding well. Each point represents the mean of three independent measurements.

examination of the sella turcica under a dissecting microscope. The HYPOX and OV animals were injected with $7\mu\text{g}$ of 17β -estradiol (Sigma) in saline and then maintained in water tanks on diet of mealworms. After a period of a week, the animals were anaesthetized on tricaine (Sandoz) and bled by heart puncture. After clotting at room temperature, blood was centrifuged at $3000g$ and the serum stored at -20°C until used for analysis. Samples of blood serum from all female frogs collected in this study were assayed for vitellogenin titre by rocket immunoelectrophoresis in 1% agarose gels (Laurell, 1966). The antiserum was obtained as previously described by Giorgi et al. (1982). The electrophoretic system was calibrated by reference to an agarose gel in which aliquots of vitellogenin were electrophoresed at the same electric conditions (15mA, 200V per gel plate) on agarose gels containing the same antiserum dilution (1ml/10ml of gel solution). Data represented in the figure 2 as the mean \pm SE; statistical significance was assessed by Student's t.

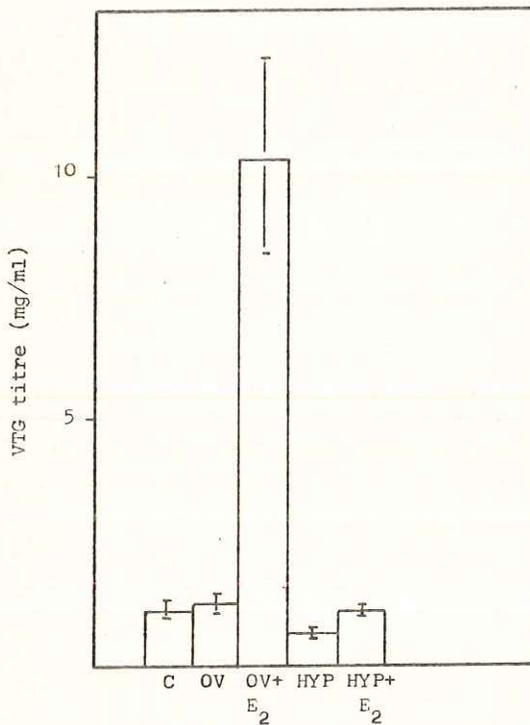


Fig. 2 - Vitellogenin titre in the serum of normal (C), ovariectomized (OV) and hypophysectomized (HYPOX) female frogs followed injection of a single dose of oestradiol 17β , as determined by rocket immunoelectrophoresis with reference to the calibration curve (Fig.1). Each point represents the mean of 8 observations \pm SE.

Results.

As can be seen in fig.1 the height of the peaks obtained at electrophoretic equilibrium holds a linear relationship with the amounts of antigen actually placed on the gel. The use of this calibration curve has allowed us to measure vitellogenin titre in all frog sera collected for this study. The results of this analysis are shown in fig.2 where the vitellogenin titre is reported in normal, ovariectomized and hypophysectomized female frogs. The administration of estradiol-17 β induces a statistically significant increase ($P < 0,001$) in ovariectomized frogs from 1mg/ml to about 10mg/ml of serum. The concentration of vitellogenin declines drastically ($P < 0,001$) in hypophysectomized frogs. The administration of estradiol-17 β induces in these frogs moderate increase even if statistically significant ($P < 0,001$).

Discussion.

The high level of plasmatic estrogens has been found in female Rana esculenta during the Summer: in this period the target organs of this hormone, for instance, the oviducts are quiescent (Polzonetti-Magni et al. in press). The estradiol increase may be related to the induction of vitellogenin synthesis by liver: it is noteworthy that this protein increases in the blood of Rana esculenta in next September (Giorgi et al. 1982). The hormone could also exert a negative feedback on the nervous system centres responsible for gonadotropin synthesis (Barker-Jørgensen, 1982).

The results of the present investigation demonstrate that in the Summer the frog liver responds to the estrogen treatment by increasing the efficiency of the vitellogenin synthesizing machinery. It remains, however, to be determined exactly how this is achieved in frogs. Nevertheless after hypophysectomy, animals showed a reduced response to estrogen inducing serum vitellogenin titre. The involvement of the pituitary gland for optimal response to estrogen has also been recently demonstrated in the freshwater turtle by Ho et al. (1982). Similar observations are lacking in Amphibia; as Follet and Redshaw (1974) have shown, the pituitary was not involved in vitellogenesis in the amphibian Xenopus laevis.

References.

- BARKER JØRGENSEN C. (1982). Factors controlling the ovarian cycle in a temperate zone anuran, the toad Bufo bufo: food uptake, nutritional state, and gonadotropin.
 J. EXPERIM. ZOOL.: 224, 437-443.
- FOLLET B.K. and REDSHAW M.R. (1968). The effect of estrogen and gonadotropins on lipid and protein metabolism in Xenopus laevis Daudin.
 J. ENDOCRIN. : 40, 439-456.

- FOLLET, B.K. and REDSHAW, M.R. (1974). The physiology of vitellogenesis. In "PHYSIOLOGY OF AMPHIBIA" (B.LOFTS ed.) Vol.2, pp.219-308. Academic Press, New York.
- GIORGI, F. GOBBETTI, A., POLZONETTI-MAGNI, A. (1982). Variations in the vitellogenin titre during the reproductive cycle of Rana esculenta L. COMP. BIOCHEM. PHYSIOL.: 72B, 501-506.
- HO SHUK-MEI, TAYLOR, S., CALLARD, I.P. (1982). Effect of hypophysectomy and growth hormone on estrogen-induced vitellogenesis in the freshwater turtle Chrysemys picta. GEN. COMP. ENDOCRIN.: 48, 254-260.
- KORSGAARD, B.E. and PETERSEN, I.M. (1976). Natural occurrence and experimental induction by estradiol 17 β of a lipophosphoprotein (vitellogenin) in blounder (Platichthys flesus L.). COMP. BIOCHEM. PHYSIOL.: 54B, 443-446.
- LAURELL, C.B., (1966). Quantitative estimation of protein by electrophoresis in agarose containing antibodies. ANAL. BIOCHEM. 15, 45-52.
- PAN, M.L., BELL, W.J. and TELFER, W.H. (1969). Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. SCIENCE: 165, 393-395.
- POLZONETTI-MAGNI, A., BOTTE, V., BELLINI-CARDELLINI, L., GOBBETTI, A., CRASTO, A.. Plasma sex hormones and post-reproductive period in the green frog, Rana esculenta complex. GEN. COMP. ENDOCRINOL. (in press).
- SIGNORINI, G., BUCCI INNOCENTI, S., RAGGHIANI, M., GIORGI, F., (1981). Vitellogenin synthesis induced by estradiol 17 β in the newt Triturus cristatus carnifex (Laurenti). COMP. BIOCHEM. PHYSIOL.: 69B, 121-126.
- WALLACE, R.A. (1978). Oocyte growth: non-mammalian vertebrates. In "THE VERTEBRATE OVARY - COMPARATIVE BIOLOGY AND EVOLUTION" (ed. by JONES R.E.) Plenum Press, New York pp. 469-502.
- WALLACE, R.A. (1970). Studies on amphibian yolk IX. Xenopus vitellogenin. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA.: 215; 176-183.
- WANGH L.J. and KNOWLAND J. (1975). Synthesis of vitellogenin in cultures of male and female frog liver regulated by estradiol treatment in vitro. PROC. NAT. ACAD. SCI. U.S.A.: 72, 3172-3175.

WITTLIFF, J.L. and KENNEY, F.F. (1972). Regulation of yolk protein synthesis in amphibian liver. I. Induction of lipovitellin synthesis by estrogen. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA*, :269, 485-492.

ZELSON, P.R., WITTLIFF, J.L. (1973). Secretion of lipovitellin into serum following induction of synthesis in the liver by estradiol 17 β . *J. ENDOCRIN.*: 93, 250-258.

La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci G. Ghiara, M. De Vincentis, G. Chieffi.

la pelle delle torpedini (Torpedo marmorata Risso e Torpedo ocellata Rafinesque)
con particolare riguardo all'istochimica del secreto epidermico e dei raggi cartilaginei delle pinne *pettorali*.

Nota di M.C. Grimaldi, A. Pica, S. D'Ippolito e F. Della Corte **

Presentata dal Socio Ordinario

Prof. G. Ghiara

Adunanza del 23/7/1983

SUMMARY

Integument of Torpedoes is interesting both for the variety of epidermic cells and for the occurrence of dermic cartilaginous structures. The aim of this study is to observe morphological and histochemical differences between dorsal, ventral skin and pectoral fin skin as well as the condrogenesis of cartilaginous fin rays occurring in the dermis of Torpedoes. Pieces of dorsal, ventral and pectoral fin skin, were stained with histochemical methods for neutral and acid polysaccharides, for basic and sulphated proteins, for lipids and some enzymatic activities. The dorsal epidermis can be distinguished in three layers: basal middle and superficial. The basal layer consists in columnar cells negative to the histochemical reactions performed. In the middle layer the epidermic cells show mucopolysaccharide-protein complexes. Numerous typical mucous cells can be observed; they are large and show secretory mucopolysaccharidic materials. Some serous cells with proteic secretory material can also be observed. In the dermis a dense layer of melanophore cells is present. The ventral skin shows less abundant mucous cells than the dorsal one. The melanophore cells are absent. In the pectoral fin skin there are cartilaginous rays in the dermis that sometimes show condrogenetic activity also in adult animals.

** Istituto di Istologia ed Embriologia - Facoltà di Scienze
Via Mezzocannone 8 - 80134 Napoli

RIASSUNTO

Sono state studiate le differenze morfologiche ed istochimiche delle cellule epidermiche nella pelle di differenti regioni delle Torpedini, nonché la condrogenesi dei raggi cartilaginei che giungono nel derma delle pinne.

In animali di varia età è stata prelevata la pelle dalla regione dorsale e ventrale nonché dalle pinne pettorali, ed è stata colorata con metodi istochimici per i polisaccaridi neutri ed acidi, per le proteine totali, basiche e solforate, per i lipidi e per alcune attività enzimatiche.

L'epidermide della regione dorsale è composta di 3 strati principali: basale, intermedio e superficiale. Lo strato basale è composto da una fila di cellule cilindriche negative alle reazioni eseguite. Lo strato intermedio comprende tre tipi cellulari. Le cellule epidermiche (disposte in 4-6 file) che mostrano un secreto complesso mucopolisaccaridico e proteico; le cellule mucose, numerose, e che secernono mucopolisaccaridi acidi e neutri e le cellule sierose, rare, che elaborano secreto proteico. Lo strato superficiale è formato da due file di cellule epidermiche il cui secreto è composto prevalentemente da mucopolisaccaridi acidi; inoltre vi giungono gli apici delle cellule sierose e mucose che versano in superficie il loro secreto. Sotto la membrana basale è localizzato un denso strato di cellule melanofore. Nella pelle ventrale le cellule mucose e sierose sono molto più rare e sono del tutto assenti le melanofore. Nelle pinne pettorali sono presenti, nello spessore del derma, raggi cartilaginei che mostrano fenomeni di attiva condrogenesi anche in animali adulti.

Introduzione

la pelle nei Pesci risulta formata da uno strato cuticolare amorfo (composto da protoplasma cellulare, cellule desquamate e secreto mucoso), dall'epidermide (formata da diversi strati di cellule epidermiche inframmezzate da cellule glandolari mucose e da cellule sierose) e dal derma (comprendente uno strato spugnoso con eventuali scaglie ed uno strato compatto più profondo). (Bullock e Roberts 1974).

Numerosi studi sono stati effettuati negli ultimi anni sulla struttura ed organizzazione dei vari componenti della pelle dei Teleostei e sul ruolo svolto dall'epidermide e dal suo secreto mucoso. A differenza di quanto avviene nei Mammiferi la pelle dei Pesci si presenta solitamente non cheratinizzata con l'eccezione dell'epidermide di Bagarius bagarius (Mittal 1979) e Murena helena (Zaccone 1979). In assenza di cheratinizzazione le cellule epidermiche sono vive e metabolicamente attive anche negli strati superficiali (Bullock et al., 1978). Esse inoltre secernono un rivestimento mucopolisaccaridico, la cuticola (Whitear 1970), composto di glicoproteine neutre ed acide (Bremer 1972; Banerjee e Mittal 1975; Zaccone 1979) che rappresenta una protezione meccanica e svolge altre importanti funzioni quali quella di difesa da microorganismi tramite la presenza nel muco di anticorpi (Fletcher e Grant 1969); emoagglutinine (Spitzer et al. 1976); enzimi (Lebedeva e Burlakov 1973; Banerjee et al. 1976; Zaccone 1982); di partecipare ai processi osmotici (Marshall 1978) ed infine di ridurre l'attrito durante il nuoto (Rosen e Conford 1971).

Pochi sono gli studi condotti sulla pelle degli Elasmobranchi. Wessler e Verner (1957) hanno riscontrato con metodi biochimici, l'assenza di acido sialico nel muco superficiale di Raja sp. Celada e De Paoli (1962) nell'epidermide di Torpedo ocellata trovano oltre alle cellule mucose le cellule albuminose di Schneider e vi riscontrano materiale proteico, mucopolisaccaridico e RNA. Seno e Meyer (1963), nella pelle degli squali con metodiche biochimiche evidenziano notevoli quantità di condroitin solfato B. Mc Conchie e Ford (1966) negli embrioni di Raja Binoculata si sono occupati della localizzazione dei mucopolisaccaridi acidi in vari tessuti tra cui la pelle. Albanese-Carmignani e Zaccone (1975) nell'epidermide

di Torpedo ocellata riscontrano nelle cellule mucose la presenza di mucopolisaccaridi contenenti gruppi fosfati e carbossilici e di glicoproteine contenenti acido sialico, di condroitin solfato B e di piccole quantità di glicogeno; inoltre nelle cellule epidermiche propriamente dette riscontrano la presenza di complessi mucopolisaccaridi-proteine.

Il presente studio si propone di osservare nella pelle delle torpedini i tipi di secreto che vanno a costituire la cuticola epidermica superficiale nonché la condrogenesi dei raggi cartilaginei che si trovano nel derma delle pinne pettorali.

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati 12 esemplari di Torpedini (6 di Torpedo marmorata e 6 di Torpedo ocellata), di cui 3 giovani (peso compreso tra 60 e 250 g.) e 9 adulti (peso compreso tra 300 e 650 g.)

Dopo breve narcosi con MS222 sciolto in acqua, sono stati prelevati piccoli pezzi di pelle dalla regione dorsale, ventrale e dal margine laterale delle pinne pettorali. Sono stati fissati in formalina neutra (al 10 % e al 4 %), Carnoy, Stieve per l'inclusione ed affettazione in paraffina; alcuni pezzetti di pelle freschi, ed altri fissati in formolo-calcio al 4 % a freddo per 15-24 ore, sono stati affettati al criostato.

Le sezioni in paraffina sono state colorate con le seguenti metodiche istologiche: emallume-eosina, Galgano I ed ematossilina cromica. Le metodiche istochimiche utilizzate sono state invece le seguenti:

per i polissaccaridi: PAS, con e senza trattamento con α -amilasi (Spicer et al., 1967); PAS-tionina/boroidruro/idrossido di potassio/PAS (PAT/PBT/KOH/PAS) per l'acido sialico O-acetilato (Culling et al. 1974, 1976); Alcian blu 8Gx (AB) a pH 1 (Lev e Spicer, 1964); AB (pH 1 e 2,5) - PAS (Mowrey e Winkler, 1956); Safranina O (1:1000) (Lillie, 1965); blu di Toluidina (1:10000) per tempi crescenti (Chiara, 1952);

per le proteine: bromofenolo blu (BPB) (Pearse, 1968); Fast green a pH 8 (Pearse, 1968); Ninidrina-Schiff (Yasuma e Ichikawa, 1953); Acido Performico-Schiff (PFA/S)

per i gruppi sulfidrilici (Pearse, 1968);

per i lipidi: Sudan nero B (Pearse, 1968);

per gli enzimi: Fosfatasi acida (ACP) (Pearse, 1968); Fosfatasi alcalina (ALP) (Mc Gadey, 1970); Aliesterasi (ALE) (Pearse, 1968).

Le reazioni per i lipidi e per le attività enzimatiche sono state tutte effettuate su fette ottenute al criostato.

OSSERVAZIONI (cfr. TAB. A)

Pelle dorsale

Nell'epidermide si possono distinguere tre strati principali: basale, intermedio e superficiale.

Lo strato basale è formato da un'unica fila di cellule epidermiche di forma generalmente cilindrica (fig. 1 e 7). Il nucleo è grosso rotondeggiante ed la posizione centrale. IL citoplasma è abbondante ed appare acidofilo nella colorazione tricromica (fig. 8); risulta negativo alle reazioni istochimiche eseguite solo con la ACP, appare debolmente positivo.

Lo strato intermedio è composto da 3-5 file di cellule epidermiche tra cui sono sparse varie cellule ghiandolari, in prevalenza mucose e poche sierose. Le cellule principali, hanno forma poligonale ma possono essere allungate se schicciate dalle cellule mucose. Il nucleo rotondeggiante, è leggermente più piccolo che nello strato basale. Il citoplasma contiene materiale secretivo in forma di granuli o talvolta di ammassi densi. Istochimicamente esso presenta positività che diminuisce solo lievemente con il pre-trattamento con diastasi, all' AB, alla Safranina, al Blu di Toluidina, al Bromo-fenolo, alla Ninidrina-Schiff, invece è negativo al Fast green per le proteine basiche contenenti arginina e lisina. Le cellule mucose tipiche si presentano generalmente ovoidali oppure a fiasco e sono di grandezza pari a circa 3-4 volte le cellule epidermiche. Il nucleo non è ben visibile perchè spinto lateralmente e coperto dal muco. Questo può presentarsi denso o vacuolato e risulta intensa-

LASCIARE QUESTO SPAZIO LIBERO IN TUTTE LE PAGINE

TABELLA A

CITOCHIMICA DELLE CELLULE EPIDERMICHE

	Basali	Intermedie		Superficiali	
		Poligonali	Mucipare	Sierose	
<u>Per vari tipi di polissaccaridi:</u>					
PAS	---	++	+++	+	+++
PAS/amilasi	---	+	+++	+	++
A.B. pH 1 e pH 2,5	---	++	+++	---	+++
A.B. pH 1 e pH 2,5/PAS	---	++	+++	+	+++
PAT/PBT/KOH/PAS	---	---	---	---	---
PAT/KOH/PAS	---	---	---	---	---
Safranina	---	+	+++	---	++
Elu-toluidina	---	+	+++	---	++
<u>Per i lipidi:</u>					
Sudan nero B	---	---	---	---	---
<u>Per vari tipi di proteine:</u>					
Bromofenolo - blu	+	++	---	+++	+++
Fast-green (pH 8)	---	---	---	---	---
Ninidrina-Schiff	+	+	---	++	++
Performico-Schiff	---	+	---	---	+
<u>Per attività enzimatiche:</u>					
ACP	++	+++	---	---	---
ALE	---	+	---	---	+++
ALP	---	---	---	---	---

Leggenda

PAS= acido periodico-Schiff. AB= alcian blu. PAT/PBT/KOH/PAS= PAS-tionina/boridruro/idrossido di potassio/ PAS. PAT/KOH/PAS= PAS-tionina/idrossido di potassio/PAS. ACP= fosfatasi acida. ALE= aliesterasi. ALP= fosfatasi alcalina.

mente positivo al PAS, all'AB, alla Safranina, al BLU di Toluidina, mentre risulta negativo a tutte le reazioni eseguite per le proteine, per i lipidi e per le attività enzimatiche. Le cellule sierose sono più rare, hanno forma tondeggiante od ovale e di grandezza pari a circa 2-3 volte le cellule epidermiche. Il nucleo solitamente si presenta ovale e può occupare la zona centrale o quella basale. Il citoplasma appare omogeneo ed istochimicamente presenta pochissima PAS positività, risulta negativo alle reazioni eseguite per evidenziare i polisaccaridi acidi, i lipidi e gli enzimi. Positivo alle reazioni per le proteine totali e contenenti gruppi NH₂ liberi.

Lo strato superficiale è formato da cellule epidermiche con citoplasma PAS positivo, alcianofilo, leggermente metacromatico, positivo al Bromofenolo e all'ALE.

PELLE VENTRALE

L'epidermide presenta lo strato intermedio un po' più spesso (6-7 file cellulari) rispetto alla dorsale. Le cellule mucose e sierose sono molto più rare e mancano completamente le melanofore (fig.7).

PELLE DELLA PINNA PETTORALE

Qui le cellule mucose e sierose, nonché le cellule melanofore nel derma sono abbondanti e presentano le stesse caratteristiche che nella pelle dorsale. Inoltre nellaprofondità dello strato compatto del derma sono visibili raggi cartilaginei che presentano fenomeni di attiva condrogenesi anche in animali adulti. (Fig.10). La cartilagine presenta intensa PAS-positività nella matrice e nelle capsule (dopo trattamento con diastasi diminuisce lievemente solo la PAS-positività della matrice mentre rimane invariata quella delle capsule),alcianofilia ed è fortemente metacromatica (Fig. 12).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le reazioni istochimiche eseguite rivelano risultati sostanzialmente concordanti con quelli ottenuti da altri AA. sulla pelle dei Teleostei (Sato 1957, 1978; Mittal et al. 1977, Banerjee et al. 1979; Zacone 1979) e con quelli sulla pelle dei pochi selaci finora studiati (Celada e De Paoli 1962; Albanese-Carr

Le cellule principali conservano la capacità di elaborare secreto proteico accanto a quella di sintetizzare un secreto con proprietà simili a quelle del muco. Le reazioni per le proteine rivelano assenza di proteine con gruppi sulfidrilici e ciò concorda con l'assenza di cheratinizzazione. Infatti le cellule dello strato intermedio omologo a quello granuloso dell'epidermide cheratinizzata, accumulano materiale mucopolisaccaridico in luogo della cheratojalina. Alcune di queste cellule si ingrossano fino a diventare delle vere ghiandole unicellulari, le altre presentano quantità variabili di granuli fino ad esserne completamente riempite pur restando di piccole dimensioni fino alla superficie.

In conclusione, sia pure con oscillazioni quantitative tra la regione dorsale e quella ventrale, quasi tutte le cellule epidermiche, salendo verso la superficie sintetizzano ed accumulano mucopolisaccaridi in modo da costituire esse stesse uno strato superficiale a guisa di mantello cellulare protettivo, la cui funzione è resa più efficace dal muco secreto dalle ghiandole unicellulari mucose.

BIBLIOGRAFIA

- Albanese-Carmignani, M.P.; Zaccone, G.: Histochemical analysis of epidermal cells and mucous cells. *Acta histochem.* 61, 100-110, 1975.
- Banerjee, T.K.; Mittal, A.K.: Histochemistry and functional organization of the skin of a "live fish" "Clarias batracus L. *Mikroskopie* 31, 333-349, 1975.
- Bremer, H.: Einige Untersuchungen zur Histochemie der sezernierenden Elemente der Teleostier-Epidermis. *Acta histochem.* 43, 28-40, 1972.
- Bullock, A.M.; Roberts, R.J.: the dermatology of marine Teleost Fish. I The normal integument. *Oceogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 13, 383-411, 1974.
- Celada, M.; De Paoli, A.M.: Contributo alla conoscenza delle cellule albuminose (Schneider) cutanee di Torpedo ocellata Raf. *Riv. Istochim. Norm. Pat.* 8, 411-416, 1962.
- Fletcher, T.C.; Grant, P.T.: Immunoglobulins in the serum and mucous of the plaice. *Biochem. J.* 115, 65, 1969.
- Ghiara, G.: Metacromasia e natura chimica dei corpi cromotropi: il tempo di colorazione quale possibile mezzo di differenziazione. *Atti Soc. Anat. XIV Conv. Soc. Napoli* p. 1-7, 1952.
- Lillie, R.D.: *Histopathologic technic and practical histochemistry.* Mc Graw-Hill Book Company. New York and London. 1965.
- Mc Connachie, P.R.; Ford, P.: Acid mucopolysaccharides in the development of the Pacific great skate, Raja binoculata. *J. Embriol. exp. Morph.* 16, 17-28, 1966.
- Mc Gadey, J.A.: A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. *Histochemie* 23, 180-184, 1970.
- Mc Manus, J.F.A.: *Histological demonstration of mucin after periodic acid.* *Nature (London).* 15, 202, 1946.
- Mittal, A.K.; Agarwal, S.K.: Histochemistry of the unicellular glands in relation to their physiological significance in the epidermis of Monopterusuchia. *J. Zool. London.* 182, 429-439, 1977.
- Mittal, A.K.; Whitear, M.: Keratinization of fish skin with special reference

- to th catfish Bagerius bagarius. Cell. Tiss. Res. 202, 213-230, 1979.
- Pearse, A.G.E.: Histochemistry teoretical and applied. Churchill Ltd, London, 1968.
- Rosen M.V.; Conford, N.E.: Fluid friction of fish slimes. Nature (London). 234, 49-51, 1971.
- Sato, M.: Histological and histochemical observations on the eosinophilic vesicles found in the head epidermis of Elepsias cirrhous (Pallas). A preliminary report. Arch. Histol. Jap. 28, 377-382, 1967.
- Sato, M.: Light and trasmission electron microscopy of the granular cells in skin epidermis of a cottid Pseudoblemnius cottoides. Jap. J. Ichtiol. 24, 231-238, 1978.
- Seno, N.; Meyer, K.: Comparative biochemistry of skin. Biochem. Biophys. Acta. 78, 258, 1963.
- Spitzer, R.H.; Downing, S.W.: Hemagglutinins in the mucus of pacific hagfish. Comp. Biochem. Physiol. 54, 409-411, 1976.
- Whitear, M.: The skin surface of bony fishes. J. Zool. London. 160, 437-454, 1970.
- Zaccone, G.: Histochemistry of the keratinization and epithelial mucins in the skin of the marin Teleost Muraena helena L. Cellular Molecular Biology. 24, 27-50, 1979.

Spiegazione delle figure.

Tavola 1

- Fig. 1- Torpedo marmorata. Pelle della regione dorsale. Colorazione E.E. Si nota
Una cellula sierosa con nucleo centrale.
- Fig. 2- Torpedo ocellata. Pelle della pinna pettorale. Colorazione Galgano I.
Sono visibili sia il lato dorsale (con una cellula mucosa) sia quello
ventrale .
- Fig. 3- Torpedo marmorata. Pelle della regione dorsale . Colorazione PAS. Al
centro una grossa cellula mucosa col nucleo schicciato in posizione
basale.
- Fig. 4- Torpedo marmorata. Pelle della regione dorsale. Colorazione AB pH 1.
Si notano due grosse cellule mucose intensamente colorate.
- Fig. 5- Pelle della pinna pettorale colorata con Safranina O . Le cellule mucose
sono più o meno intensamente colorate.
- Fig. 6- Torpedo ocellata. Pelle della pinna pettorale colorata con AB a pH 2.5.
Le cellule mucose (a destra) sono intensamente colorate mentre le cel-
lule sierose (al centro) sono negative.

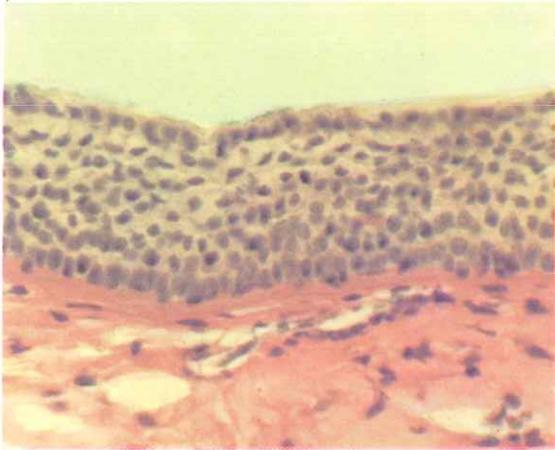
Tavola 2

- Fig. 7- Torpedo marmorata. Pelle della regione ventrale. Colorazione E.E. Si
nota la scarsità di cellule mucose e l'assenza di melanofore.
- Fig. 8- Torpedo marmorata. Pelle della regione dorsale. Colorazione Galgano I.
Sono numerose le cellule mucipare.
- Fig. 9- Torpedo ocellata. Pelle della pinna pettorale. Colorazione PAS. Dal lato
dorale è visibile una cellula mucosa intensamente PAS-positiva.
- Fig. 10- Torpedo ocellata. Pelle della pinna pettorale. Colorazione PAS. Raggio
cartilagineo sezionato trasversalmente. In periferia si notano bene i
condroblasti. La matrice è fortemente PAS-positiva.
- Fig. 11- Torpedo marmorata. Pelle della regione dorsale colorata con AB a pH
1. Notare le cellule epidermiche progressivamente più alcianofile pro-
cedendo verso la superficie, una grossa cellula mucosa intensamente

positiva ed una cellula sierosa negativa.

Fig. 12- Torpedo ocellata. Pelle della pinna pettorale colorata con Safranina
O Le cellule mucose appaiono leggrrmente positive e la cartilagine è
fortemente metacromatica.

La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una
commissione composta dai soci G. Ghiara, M. De Vincentis, G. Chieffi.



1



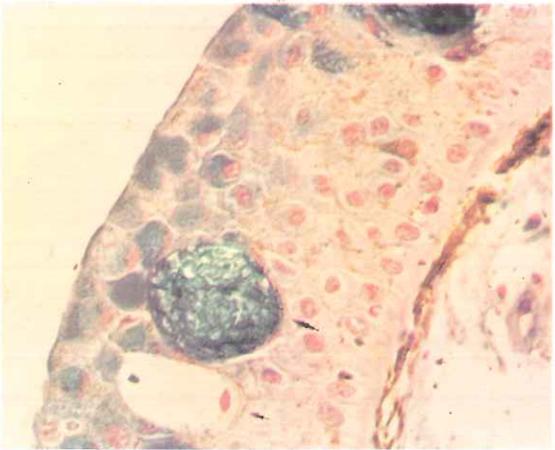
2



3



4



5



6

PALAEOMAGNETIC STUDY OF THE RED FLYSCH FORMATION (SOUTHERN APENNINES, ITALY)

Nota di Alberto Incoronato

presentata dal socio ordinario

Bruno D'Argenio

Adunanza del 23/7/1983

ABSTRACT Palaeomagnetic study of the silicified Mesozoic allochthonous sediments of Red Flysch Formation indicates an anticlockwise rotation of 94° in respect to the Apulia foreland. Magnetic carriers consist of magnetite and haematite with no appreciable difference in terms of direction. The study, the first ever made on cherts, widens the range of sedimentary rocks suitable for palaeomagnetic investigation which might become an important tool in understanding silicification processes.

RIASSUNTO Lo studio paleomagnetico dei sedimenti silicizzati alloctoni della formazione mesozoica del Flysch Rosso indica una rotazione antioraria di circa 94° nei confronti dell'avamposto apulo. I minerali magnetici consistono in magnetite ed ematite che non mostrano apprezzabili differenze in termini di direzioni di magnetizzazione. Lo studio, il primo mai effettuato su materiale silicizzato, allarga il campo di rocce suscettibili di studio paleomagnetico che potrebbe rivelarsi un importante strumento nella comprensione dei processi di silicizzazione.

INTRODUCTION

Palaeomagnetic studies can improve our knowledge of the pre-orogenic orientation of the Mesozoic continental margin in the Southern Apennines. In this one, for which data are scarce, the Lagonegro Basin seems ideal for such a study as sedimentation was continuous from Middle Triassic to Lower Miocene, its terrain forms an arcuate structure of folds and thrusts extending for about 350 km and facies analyses and stratigraphy are also available. This paper, on the Formation of the Lagonegro Basin, reports on the opportunity of considering silicified materials as subject of palaeomagnetic studies.

* 1° Istituto di Geologia e Geofisica - Facoltà di Scienze
Largo S. Marcellino 10 - 80134 Napoli

SAMPLING AND PREPARATION OF SPECIMENS

Twenty-six sites (six magnetically orientated hand samples for each site) were collected from the basal part of the Red Flysch at Pescopagano (fig: 1). The outcrop consists of alternations of calcilutites often silicified, green and red jaspers and silicified clays (Cocco et al., 1974). The collection has been almost entirely based on materials silicified to different extent and characterized by a red-dark brown colour. Palaeontological age determinations on the upper part of this same member indicate the sediments of the basal part cannot be younger than Upper Cretaceous (Cocco et al., 1974).

Due to the hardness of the silicified sediments and the reduced thickness of strata, 2cm x 2cm cores were prepared in laboratory as described in Inconorato (1982). During such a preparation process some samples were destroyed and sites 140-145, 308-313 and 122-127 consist of only 3, 5 and 5 samples respectively.

MEASUREMENTS

NRM directions of Red Flysch specimens are plotted in fig. 2. They are mainly concentrated in the South West quadrant and have predominantly positive, medium to shallow, inclinations. The intensities of magnetization vary between 0.44 and 10.01×10^{-6} G. Four sites, 158-163, 164-169, 332-338, were unmeasurable; their intensities of magnetization being undistinguishable from the instrumental noise level.

One pilot specimen was selected from each site and subjected to stepwise thermal demagnetization. Pilots 140 and 93 disintegrated during the 350° thermal demagnetization step therefore the related sites were excluded from the analysis. Measurements of very few specimens with stronger magnetization have been carried out by a Digico magnetometer; for the remaining specimens has been used.

As thermal demagnetization proceeds the remanence of pilot 170 (fig. 3.a) moves initially southwards and then northwestwards grouping around a western direction with a moderate inclination. These characteristics are exhibited by all pilots except 95 and 119 which have revealed to belong to sites with high scatter (see table 1). Differences may lie in the magnitude of the initial southwards movement or all directional changes can be confined to a small area of the stereonet but all directions tend to cluster around the above mentioned western direction. The normalized intensity versus temperature plot (fig. 3.b) are also representative of the general behaviour of pilots. The same can be said for the susceptibility changes (fig. 3.b) except in very few cases in which at 630° or higher temperatures changes have taken place probably as a result of transformation of Fe-silicates into magnetite (Dunlop, 1972).

DEMAGNETIZATION

Pilot specimen directional changes analyses suggest that more components might contribute to the remanence. Techniques for identifying multicomponents NRMs are Hoffman and Day's (1978) subtraction vector and Zijdeveld vector diagrams (Dunlop, 1979). Hoffman and Day's method applies great circles to directional changes of component removed during demagnetization. Dunlop's method works on identification of linear segments on the Zijdeveld diagrams. Both techniques require that the blocking temperature spectra of different components do not overlap completely with respect to one another. Both techniques have been attempted, without success, in the case of Red Flysch pilots.

The bulk demagnetization has been carried out at temperatures indicates in table 1 following analyses of pilot directional changes. Data with high within site scatter (σ_{95} 15; k 15) have been rejected (table 1). The following Red Flysch directions of magnetization were obtained:

DEC = 248.8 INC = 30.4 σ_{95} = 5.2 k = 48
 POLE: LON = 312.0 LAT = -4.2

We shall refer to this direction of magnetization as Characteristic Remanent Magnetization (ChRM) as long as a better definition of its nature is achieved.

MAGNETIC CARRIER

Site 80-85 has been used for investigating the nature of magnetic carriers. This site, the stratigraphically lowest, has been chosen because it is located at the threshold of the silicified layers and, in its upper part, contains a siliceous lens with variable silicification. Sample from 80-85 site exhibit a three-layered pattern. The lower part, white and not affected by silicification, is calcareous. In fact, it reacts vigorously to the hydrochloric acid. The upper cherty part exhibits a dark brown colour while the middle, also silicified, has a pinkish colour.

In sediments the red-brown colour is generally attributed to the presence of pigmentary haematite. The occurrence of haematite raises a three-fold problem. The first one is about the detrital or authigenic origin of the haematite; the second one is whether detrital haematite was deposited as such or resulted from diagenetic alteration of magnetite; the last one is about the timing of authigenesis.

The white colour of the lower part of samples from the site 80-85 suggests that at least pigmentary haematite should not be present. In order to assess the relative importance of different magnetic carriers, IRM acquisition curves and coercivity spectra, together with directional changes during thermal demagnetization, have been investigated.

Specimens from the upper and middle part show a very similar IRM pattern (fig. 4.a) and the coercivity spectra are dominated by coercivities lower than 1KOe (fig. 4.b).

The IRM curve of the specimen from the lower part stabilizes at 6KOe (fig. 4.a) and coercivity spectrum is characterized by coercivity lower than 1KOe with an important contribution in the range 3-4 KOe.

Coercivities lower than 1KOe are generally attributed to magnetite; the absence of any saturation even in a field as high as 15KOe is related to the presence of pigmentary haematite and the contribution in the range 1-6 is likely to be due to the specular haematite (Dunlop, 1972; Lowrie and Alvarez 1975). The absence of pigmentary haematite in the specimen from the lower part agrees with its white colour.

IRM acquisition curves and coercivity spectra of other Red Flysch specimens (not depicted) are very similar to those of the specimens from the upper and middle part of site 80-85.

Differences in the nature of the magnetic carriers between the upper, middle and lower part of site 80-85 do not alter the general characteristics pattern of directional changes illustrated previously (fig. 5). This similarity in directional changes suggests that the ChRM is not related to the presence of a particular haematite fraction. Generally in sediments pigmentary haematite is present as a cement or matrix, and forms a very thin coating on well crystallized silica or feldspar grains and as an adsorbed fraction in some other minerals. It derives from the precipitation in situ of percolating ground water. Pigmentary haematite is therefore related to the diagenetic process. Specular haematite is generally regarded as an alteration product of original magnetite, unless it derives directly from a weathered source area.

DISCUSSION AND CONCLUSION

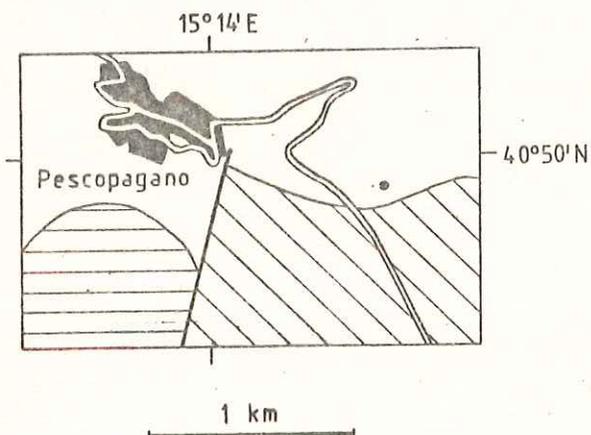
Palaeomagnetic investigation on autochthonous Upper Cretaceous rocks in the Southern Apennines have been carried out on the Apulia Carbonate Platform (Channell and Tarling, 1975). This platform acted as a foreland without being affected by the Tertiary tectogenesis (D'Argenio et al., 1970). Apulia is believed to have moved with Africa during Mesozoic and Early Tertiary as part of Adria promontory (D'Argenio et al., 1980). In contrast Red Flysch, part of Lagonegro Basin sediments, has been extensively affected by the tertiary tectogenesis since Tortonian (D'Argenio et al., 1970). Comparison of the Red Flysch direction of magnetization (248.8 ± 30.4) and magnetization of the Senonian bauxitic horizon of the Apulia Platform (342.4 ± 36.0) (Channell and Tarling, 1975) would suggest that the part of Red Flysch being discussed underwent an anticlockwise rotation of about 94° in respect to the Apulia platform. Such a rotation does not conflict with the progressive change in the direction of movement, from northeasterly to northerly, of the alloctonous units (Pescatore and Ortolani, 1973). In particular an anticlockwise rotation does not conflict with tectonic evidence from the area of sampling itself. In fact the sediments investigated have been collected from an arcuate overturned anticline the axis of which changes from N-E to NW-SE orientation (Cocco et al., 1974; fig. 39).

On the grounds of the preceding discussion, it can be concluded that the Red Flysch GhRM is likely to reflect a genuine Upper Cretaceous magnetic field direction. This implies that the haematization of the sediment took place shortly after the material was deposited.

As far as it is known silicified materials has never been the subject of palaeomagnetic investigations. This study indicates that at least in the case of Red Flysch Formation reliable palaeomagnetic data can be obtained. In addition, palaeomagnetic studies can be a tool for a better understanding of unsolved questions in such sediments; i.e. the timing of silicification. In any case the range of rocks usable for palaeomagnetic studies certainly widens.

REFERENCES

- Cocco, E., Cravero, E., Ortolani, F., Pescatore, T., Russo, M., Torre, M., and Coppola, L., 1974
LE UNITA' IRPINE A NORD DI MONTE MARZANO, APPENNINO MERIDIONALE.
Mem. Soc. Geol. Italiana, 13, 607-654
- D'Argenio, B., Pescatore, T. and Scandone, P., 1975
STRUCTURAL PATTERN OF CAMPANIA-LUCANIA APENNINES
- in Ogniben L., Parotto, M. and Praturlon, A. eds. Structural model of Italy, Quaderni della Ricerca Scientifica, C.N.R., 90, 313-328
- D'Argenio, B., Horvath, F., Channell, J.E.T., 1980
PALAEOTECTONIC EVOLUTION OF ADRIA, THE AFRICAN PROMONTORY
Geologie des chaines alpines issues de la Tethys du 26° CGI, 331-351
- Dunlop, D.J., 1972
MAGNETIC MINERALOGY OF UNHEATED AND HEATED RED SEDIMENTS BY COERCIVITY SPECTRUM ANALYSIS
Geophys. j. Royal Astron. Soc., 27, 37-55
- Incoronato A. 1982
PALAEOMAGNETIC STUDY IN THE SOUTHERN APENNINES? ITALY
Ph.D. Thesis University of Newcastle Upon Tyne (GB) pp 220
- Lowrie, W. and Alvarez, W., 1975
PALAEOMAGNETIC EVIDENCE FOR ROTATION OF ITALIAN PENINSULA
J. Geophys. Res., 85, 3597-3605
- Pescatore, T. and Ortolani, F., 1973
SCHEMA TETTONICO DELL' APPENNINO CAMPANO-LUCANO
Boll. Soc. Geol. Italiana 92, 453



Lagonegro Unit II

-  Red flysch (Clay-marl member)
Aquitania-Oligocene
-  Red flysch (Siltaceous-calcareous-marl member)
Oligocene-Upper Cretaceous
-  Galestri - Lower Cretaceous
-  Fault

Fig. 1 Geological map of the area surrounding the sampled outcrop (●) of Red Flysch.
(after Cocco et al., 1974)

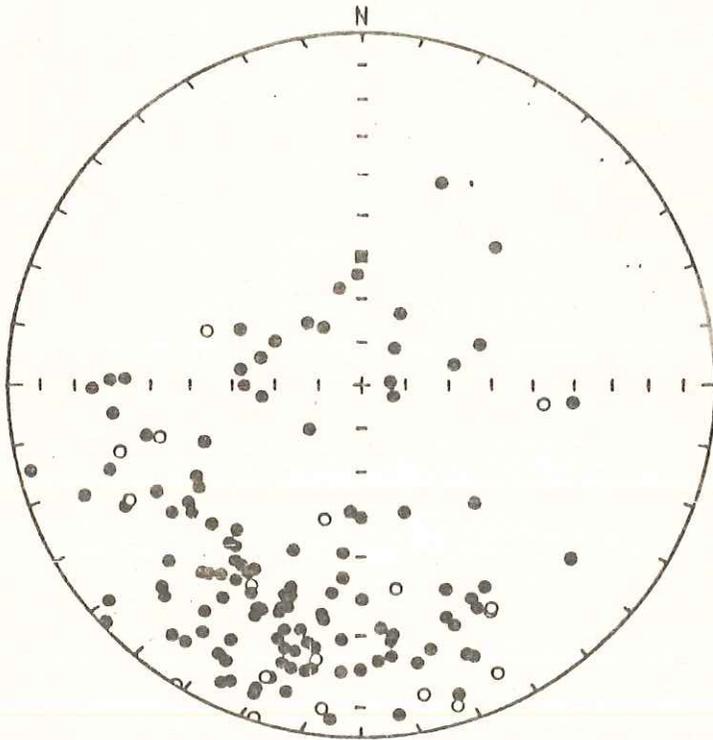


Fig. 2 Equal area projection of NRM directions of Red Flysch specimens. Bedding corrected. Open (closed) symbols: upward (downward) inclination. The solid square represents the axial geocentric magnetic dipole.

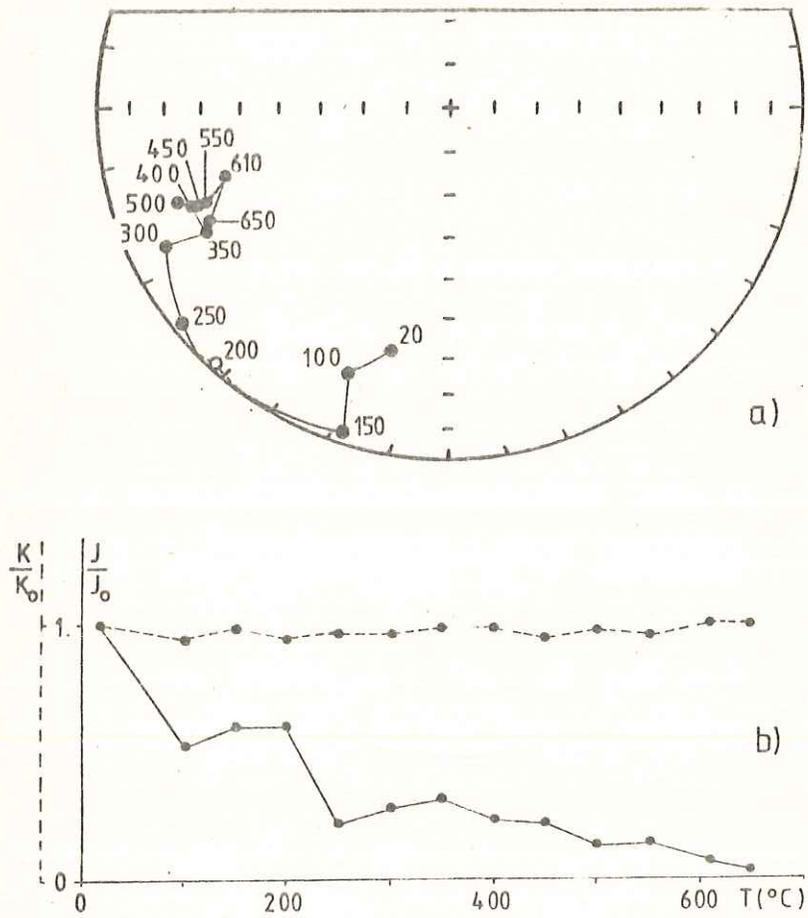
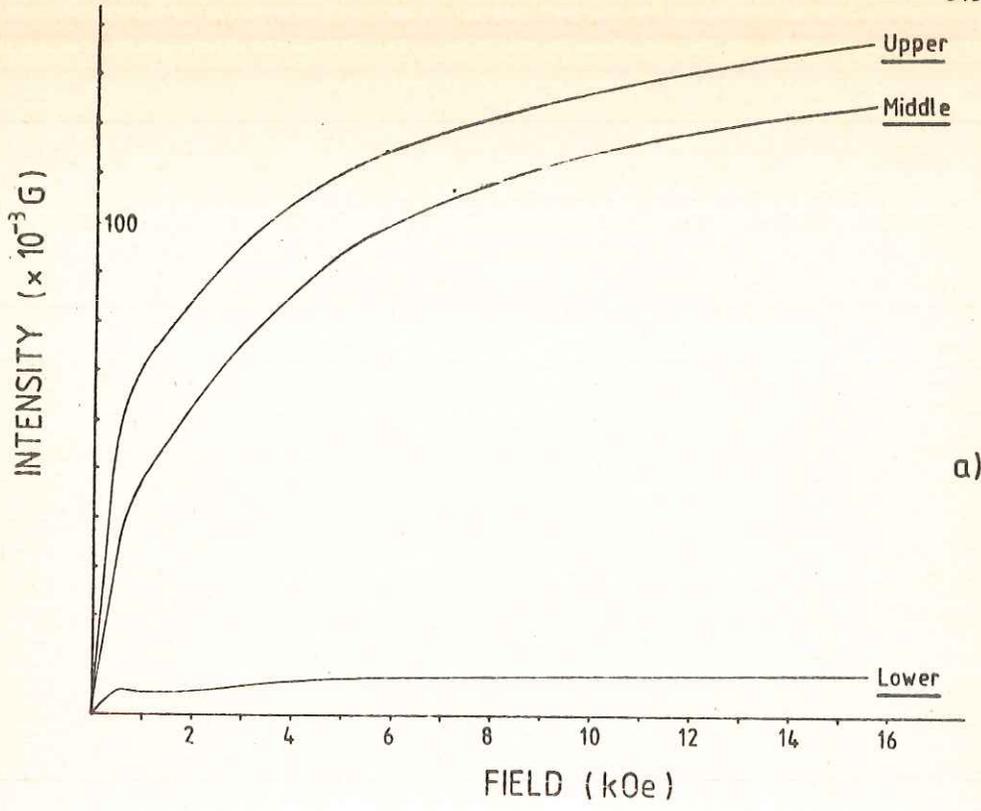
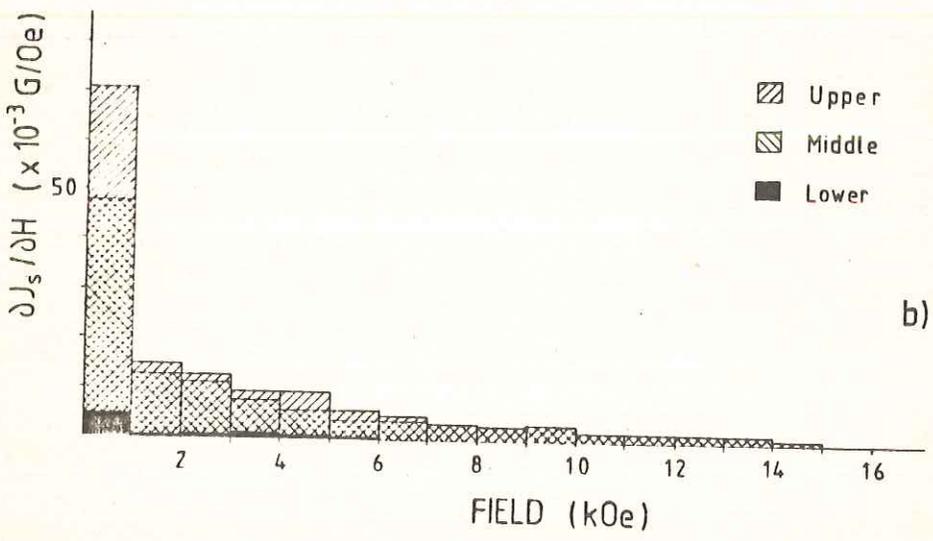


Fig. 4.3 Thermal demagnetization plots of pilot 170
 Symbols as in fig. 4.3.



a)



b)

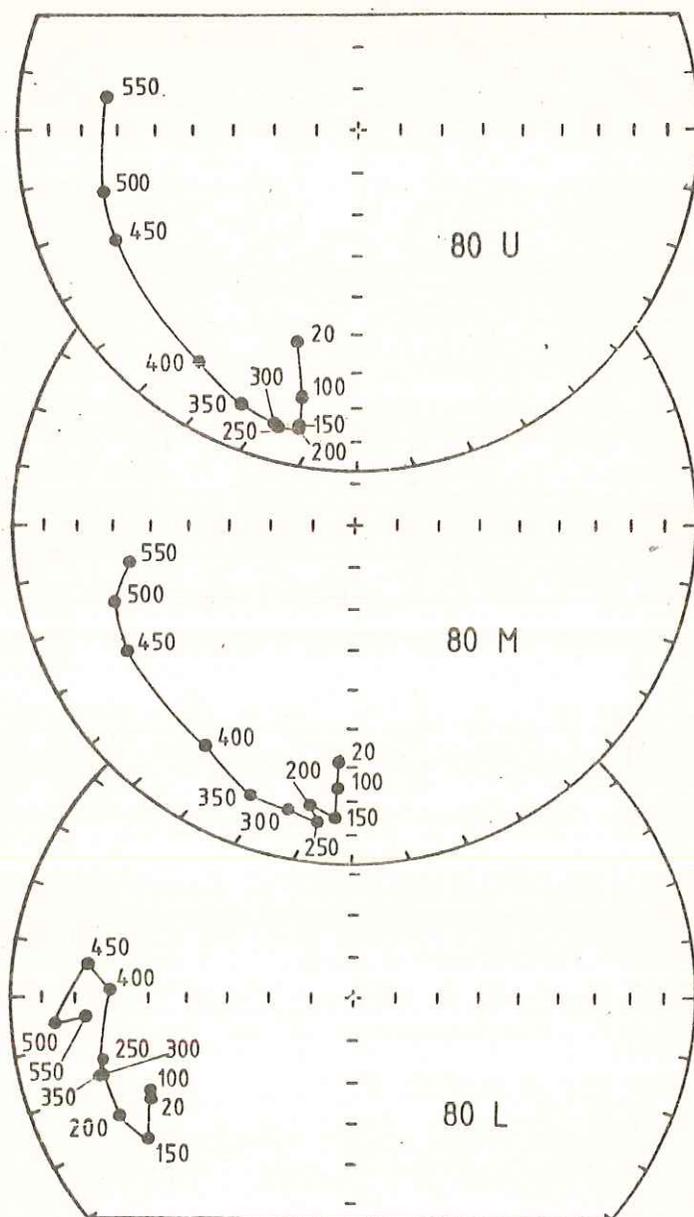


Fig. 5 Directional changes during thermal demagnetization of specimens 80 U, 80 M and 80 L. Bedding corrected

TABLE 1 Cleaned site mean data : Red Flysch Formation
Data arranged in stratigraphical order

SITE	T(°C)	FIELD CORRECTED		TILT CORRECTED		α_{95}	K	N _{sa}
		DEC	INC	DEC	INC			
128-133	400	244.2	12.9	254.5	37.3	2.7	602	6
134-139	350	239.8	14.0	251.3	42.1	5.9	130	6
152-157	400	241.8	13.7	249.7	30.5	8.0	12	6
170-175	500	244.1	10.6	251.1	25.2	3.7	327	6
176-181	300	229.0	11.7	236.3	30.7	7.4	82	6
182-187	350	241.8	14.4	249.7	29.5	12.9	28	6
188-193	400	246.7	-0.0	249.2	14.0	8.1	69	6
*194-199	200	201.6	-62.3	198.6	-36.7	41.2	4	6
302-307	350	241.9	12.0	249.2	28.9	3.2	441	6
308-313	350	230.8	0.0	235.9	28.4	12.4	30	6
314-319	400	229.7	19.3	241.8	42.3	10.1	45	6
320-325	410	251.6	3.0	256.1	19.1	4.9	191	6
326-331	510	252.7	-3.9	254.8	17.0	8.0	71	6
332-337	410	245.1	11.4	250.9	28.8	8.5	63	6
116-121	250	200.7	-3.5	200.7	16.0	4.9	190	6
110-115	350	239.8	27.1	250.8	40.7	5.2	164	6
104-109	350	186.3	-11.4	186.9	-4.2	8.2	68	6
*02-07	350	254.4	21.5	267.6	38.1	20.0	16	5
06-01	400	255.5	2.7	259.6	20.1	13.4	26	6

*rejected

La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci A. Scherillo, P. Corradini, E. D'Argenio.

REAZIONI DI TRICHETONI CICLICI CON NUCLEOFILI BIFUNZIONALI - I

Nota di Patrizia MORRICA¹, Clotilde D'AMBROSIO², Isabella BEHAR¹
Presentata dal socio Lorenzo MANGONI

Adunanza del 23 luglio 1983

Riassunto - In questa nota è descritta la reazione tra la ninidrina e la solfamida in acido acetico glaciale. Il prodotto della reazione è un derivato idrossilato della porpora di Ruhemann.

Abstract - A reaction between ninhydrin and sulfamide is described to afford the hydroxylated derivative of the Ruhemann's Purple.

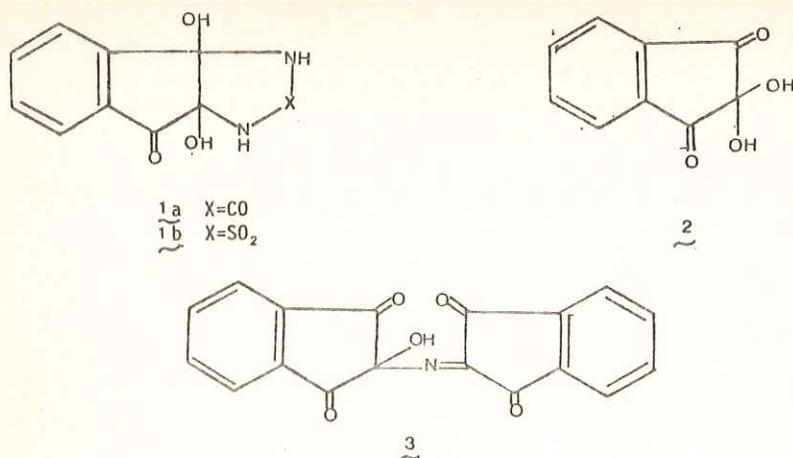
Recentemente Alexander e Chatterjee¹ hanno riportato un'ampia sperimentazione farmacologica condotta su vari imidazolidinoni anellati del tipo 1a, ottenuti per condensazione della ninidrina (2) con reagenti bifunzionali quali l'urea, la tiourea ed uree N-sostituite ed N-N'disostituite. Tali composti presentano una buona attività anticonvulsivante e ci è sembrato interessante prepararne degli analoghi contenenti zolfo per reazione della ninidrina, e di eventuali altri trichetoni ciclici, con la solfamida.

Tale reazione, condotta in ambiente acquoso neutro, nelle condizioni già riportate²⁻⁵ per la reazione della ninidrina con l'urea, non dava però alcun risultato apprezzabile. La reazione è stata allora condotta in acido acetico glaciale a ricadere e, in tali condizioni, dopo 30' si otteneva un precipitato di color rosso aranciato che, dopo cristallizzazione da acetone, aveva p.f. 288-295°C e all'analisi forniva dati in accordo con la composizione elementare C₁₈H₉NO₅. A tale prodotto è stato possibile attribuire la struttura 3, diversa dalla struttura 1b che poteva essere attesa in analogia con i risultati delle precedenti succitate reazioni della ninidrina con l'urea.

In effetti il prodotto mostra all'I.R. bande significative a 3330 cm⁻¹(OH) e a 1690 e 1730 cm⁻¹ (C=O). Nello spettro ¹H-NMR si evidenzia un complesso sistema di segnali nella zona compresa tra δ7,94 e δ8,30, corrispondente a protoni aromatici, e un solo altro segnale a δ6,5' che scompare per aggiunta di D₂O ed è quindi attribuibile al protone di un ossidrile.

¹Istituto di Biorganica - Facoltà di Farmacia - Università di Napoli - Via L. Rodinò

²Istituto di Chimica Organica e Biologica - Facoltà di Scienze Nat., Fis. e Mat. -
Università di Napoli - Via Mezzocannone, 16



Lo spettro di massa mostra un picco molecolare $M^+ = 319m/e$ e picchi a $291m/e$ ($M^+ - CO$) e a $263m/e$ ($M^+ - 2CO$) oltre ai picchi caratteristici della frammentazione della ninidrina^{6,7} a m/e 132, 104, 76. Tutte queste caratteristiche erano in accordo con la struttura 3 corrispondente ad una dichetoidrindilidendichetoidrindammina (DYDA)⁶ ossidrilata.

Tale sostanza era alquanto interessante per la stretta somiglianza della sua struttura con quella della ben nota porpora di Ruhemann ma era altresì difficilmente giustificabile quale prodotto della reazione della ninidrina con solfammine, in quanto essa conteneva un solo atomo di azoto e non conteneva zolfo.

Considerando che in 3 lo scheletro idrindanico della ninidrina si conserva, era abbastanza plausibile ipotizzare che il nostro prodotto si potesse formare non più per reazione della ninidrina con la solfammine bensì con un suo derivato, ottenuto nell'ambiente di reazione ad opera dell'acido acetico.

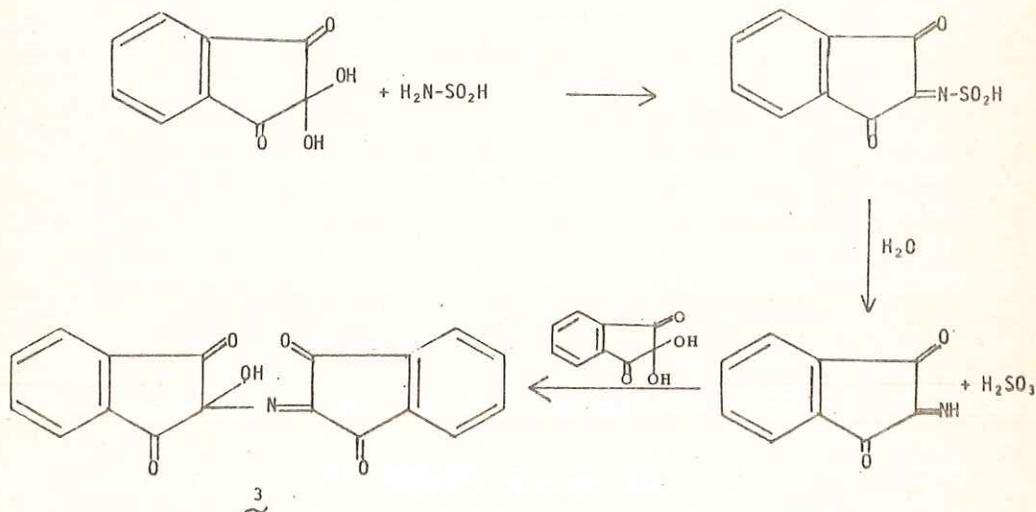
A tale scopo la solfammine è stata messa a ricadere con solo acido acetico glaciale e, come ipotizzato, dopo soli 10', si otteneva un precipitato al quale è stato possibile, anche se solo in via tentativa, attribuire la struttura di acido ammidosolfonico $NH_3^+ - SO_2^-$ (Nota 1).

Nota 1 - Tale prodotto è noto⁸, ma le notizie riguardanti la struttura e le caratteristiche fisiche che si possono evincere dalla letteratura appaiono vaghe e confuse. Esso si presenta come un solido bianco, cristallino, p.f. 210°C con dec., insolubile nei solventi organici, solubile in acqua e contenente azoto e zolfo. Un elemento abbastanza diagnostico per questa specie è la presenza all'¹H-NMR di tre picchi distinti a δ 7,34, δ 7,15 e δ 6,95 che sono caratteristici dello ione ammonio⁹. Nessuna ipotesi si è potuta formulare a riguardo del meccanismo di formazione di questa specie, in quanto in letteratura non è riportato alcuno studio di eventuali reazioni della solfammine con acido acetico, mentre è riportato¹⁰ che essa con gli altri acidi organici fornisce esclusivamente le ammidi corrispondenti.

La ninidrina messa a reagire con tale specie forniva lo stesso prodotto 3 isolato precedentemente. Va inoltre sottolineato che la reazione avviene anche in ambiente neutro a differenza della reazione diretta della ninidrina con solfammine. L'acido acetico quindi sarebbe soltanto responsabile della formazione dell'acido ammidosolfonico.

Una plausibile ipotesi che giustifichi la formazione del composto 3 è riportata nello schema I.

SCHEMA I



Accanto all'estensione di questa reazione ad altri trichetoni ciclici è in programma una indagine tesa a chiarire il comportamento della solfammine in acido acetico ed a precisare la natura della specie che in tale reazione viene a formarsi.

Parte Sperimentale

I p.f. sono stati determinati su blocco di Kofler e non sono corretti. Gli spettri I.R. sono stati registrati con uno spettrofotometro Perkin-Elmer 339 in soluzione di CHCl_3 al 2%. Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati registrati su spettrometro Bruker 270 Mhz in soluzione di $\text{d}_6\text{-DMSO}$ usando TMS come standard interno. Gli spettri di massa sono stati registrati su spettrometro Data System DS-55. Le analisi elementari sono state eseguite da "Mikroanalytisches Laboratorium" E. Thommen, Bettingen (Svizzera).

Dichetoidrindilidenedichetoidrindammina (DYDA) ossidrilata (3) - Quantità equimolecolari di ninidrina e solfammine vengono tenuti a riflusso in acido acetico glaciale. La soluzione si colora immediatamente in rosso e dopo circa 30' si nota la comparsa di un precipitato. Si lascia raffreddare a t.a. e si separa il precipitato per filtrazione. Il prodotto cristallizza da acetone sotto forma di aghi rossi-aranciati, p.f. 288-295°C, resa 90%.

I.R. (CHCl₃): 3330 cm⁻¹ (OH), 1695 cm⁻¹ (C=O), 1730 cm⁻¹ (C=O).

¹H-NMR (d₆-DMSO): δ 7,94-8,30 (m, H aromatici), δ 6,52 (s, OH).

MS: 319m/e (M⁺), 291m/e (M⁺-CO), 263m/e (M⁺-2CO), 132m/e, 104m/e, 76m/e.

Analisi: C₁₀H₉NO₅ (PM 319)

	C	H	N	O
trov.%	67,58	2,76	4,39	25,27
calc.%	67,71	2,84	4,39	25,06

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Alexander, G.J. & Chatterjje, N., *Res. Commun. Pathol., Pharmacol.*, 27(1), 45 (1980).
- 2 - Polonovski, M. & Moreno-Martin, F., *C.R. Soc. Biol.*, 119, 583 (1935).
- 3 - Polonovski, M., Gonnard, P. & Glotz, G., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 6, 1557 (1939).
- 4 - Shapiro, R. & Chatterjje, N., *J. Org. Chem.*, 35, 447 (1970).
- 5 - Crooks, P.A. & Deeks, T., *Chem. & Ind.*, 793 (1975).
- 6 - Wigfield, D.C., Buchanan, G.W. & Creteau, S.M., *Can. J. Chem.*, 58, 201 (1980).
- 7 - Mordecai B. Rubin, *Chem. Rev.* 75(2), 177 (1974).
- 8 - Divers, E. & Ogawa, M., *J. Chem. Soc.*, 77, 327 (1900).
- 9 - Gates e Cullin, *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 4495 (1956).
- 10- Kirsanov, A.V., Egorova; N.L., *Zhur. Obshchei Khim. (J. Gen. Chem.)*, 22, 1612 (1952) - *C.A.* 47, 8041 (1952).

La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci L. Mangoni, R' Nicolaus, V. Leone.

REAZIONI DI TRICHETONI CICLICI CON NUCLEOFILI BIFUNZIONALI - II

Nota di Patrizia MORRICA¹ e Carla FERRERI²

Presentata dal socio Lorenzo MANGONI

Adunanza del 23 luglio 1983

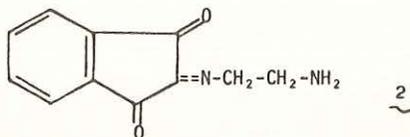
Riassunto - In questa nota sono descritte le reazioni della ninidrina e del fenalene-1,2,3-trione con etilendiammina. I prodotti delle reazioni risultano essere dei derivati pirazinici anellati.

Abstract - This paper describes the reactions of ninhydrin and phenalene-1,2,3-trione with ethylenediamine to give annelated pyrazinic derivatives.

A proseguimento di una precedente indagine sulle reazioni dei trichetoni ciclici con composti bifunzionali, riportiamo in questa nota della reazione della ninidrina e del fenalene-1,2,3-trione con etilendiammina. In effetti reazioni di diammine N sostituite ed N,N-disostituite con la ninidrina sono state già descritte in letteratura^{1,2}, e nella generalità dei casi portano a prodotti spiranici derivanti dall'addizione del reattivo al solo carbonile "centrale" della ninidrina. Scarsa attenzione era invece stata riservata alla reazione con l'etilendiammina non sostituita^(nota 1) e noi abbiamo voluto esaminarne il decorso per esplorare la possibilità di ottenimento di derivati pirazinici anellati quali omologhi di imidazolinoni dei quali è stata di recente riportata un'ampia sperimentazione come farmaci dotati di attività anticonvulsivante³.

La reazione è stata condotta in condizioni neutre, in acqua a ricadere, e cioè nelle condizioni descritte per la reazione della ninidrina con urea⁴. La reazione, praticamente immediata, porta essenzialmente ad un composto (TLC) anche se accompagnato da quantità sensibili di altri prodotti, tutti presenti in piccole quantità.

Nota 1 - Esiste in letteratura un riferimento³ alla reazione della ninidrina con etilendiammina. Gli autori assegnano al prodotto di reazione la struttura 2, ma le condizioni sperimentali nelle quali essi operano non sono note, nè sono note le caratteristiche spettrali del prodotto.



¹ Istituto di Biorganica dell'Università - Via L. Rodinò, 22 - Napoli

² Istituto di Chimica Organica e Biologica dell'Università - Via Mezzocannone, 16 - Napoli

Un primo tentativo di migliorare la resa ci ha portato a condurre la reazione a t.a.; in queste condizioni la reazione è ancora molto veloce e porta allo stesso composto, questa volta non accompagnato visibilmente da molti altri prodotti che, probabilmente, si erano formati per decomposizione a causa della temperatura elevata alla quale era stata condotta in un primo tempo la reazione. La lavorazione della miscela di reazione e la successiva cromatografia del grezzo su colonna di silice, ci ha permesso l'isolamento del prodotto 1, con rese soddisfacenti del 70-80%.

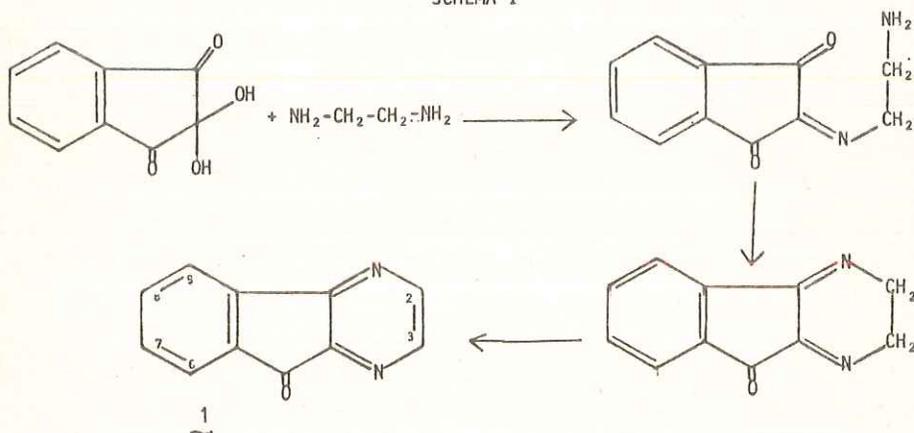
Tale prodotto è un solido che cristallizza da benzene sotto forma di aghi gialli, p.f. 170-173°C e che fornisce all'analisi dati in accordo con la composizione elementare $C_{11}H_6N_2O$. All'I.R. sono presenti bande a 1730 cm^{-1} (C=O), a 1615 cm^{-1} (C=C) e a 1540 cm^{-1} (C=N). Lo spettro di massa mostra un picco molecolare a 182 m/e (M^+) e picchi significativi a 154 m/e ($M^+ - CO$) e a 128 m/e ($M^+ - 2HCN$)⁶. Non è presente nello spettro di massa un picco attribuibile alla perdita di un secondo C=O né i picchi corrispondenti alla frammentazione classica del sistema della ninidrina^{7,8}.

Da questi risultati è stato possibile ipotizzare che l'etilendiammina avesse reagito con due dei gruppi carbonilici presenti nella molecola della ninidrina, formando eventualmente un terzo anello non spiranico, a differenza di quanto riportato per la reazione con ammine N sostituite e N,N-disostituite^{1,2}.

Lo spettro ¹H-NMR è stato notevolmente diagnostico e ci ha permesso di assegnare al prodotto della reazione la struttura 1. Infatti lo spettro ¹H-NMR presenta un doppio doppietto, pari a 2 H, centrato a δ 8,51, attribuibile ai due protoni dell'anello pirazinico e un ulteriore sistema aromatico costituito da due doppietti centrati rispettivamente a δ 7,90 e δ 7,82 e due tripletti a δ 7,68 e a δ 7,53 e non presenta nessun altro segnale di protone.

La reazione dovrebbe plausibilmente decorrere come mostrato nello schema I.

SCHEMA I



Allo scopo di generalizzare questa reazione è stato poi esaminato il comportamento nella reazione con etilendiammina di un secondo trichetone ciclico, il fenalene-1,2,3, trione⁹.

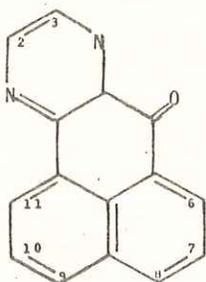
La reazione è stata condotta come descritto precedentemente e l'unica variazione apportata è rappresentata dall'uso del metanolo come solvente per motivi di solubilità del substrato.

Anche in questo caso, dopo lavorazione della miscela di reazione e suo frazionamento mediante cromatografia su colonna di silice, si è ottenuto essenzialmente un prodotto, cui è stata at-

tribuita la struttura 3, che dopo cristallizzazione da metanolo si presenta sotto forma di aghi giallo-arancio, p.f. 225-228°C., e che fornisce all'analisi dati in accordo con la composizione elementare $C_{15}H_8N_2O$. Esso presenta inoltre all'I.R. una banda a 1660 cm^{-1} (C=O) ed uno spettro di massa con picco molecolare a 232 m/e (M^+) e picchi a 204 m/e ($M^+ - CO$) e a 178 m/e ($M^+ - 2HCN$)⁶.

Lo spettro 1H -NMR presenta, come atteso, soltanto segnali di protoni aromatici.

Esperimenti preliminari condotti facendo reagire l'etilendiammina con il difeniltrichetone in metanolo a t.a., mostrano la formazione di un prodotto nella cui struttura non appare l'anello pirazinico. Tale diversità di comportamento rispetto ai trichetoni ciclici può essere dovuta a problemi conformazionali e/o alla minore reattività del difeniltrichetone.



3

Parte Sperimentale

Le notizie generali su materiali e metodi sono state già riportate¹⁰.

Pirazino[2,3b]indan-5-one (1): Ad una soluzione di ninidrina in acqua, agitata magneticamente, a t.a. si aggiunge etilendiammina in quantità equimolecolare e la miscela di reazione si colora immediatamente in rosso cupo. Dopo 30' viene raffreddata a t.a. ed estratta con $CHCl_3$. La fase organica viene svaporata sotto vuoto e il residuo oleoso ottenuto viene cromatografato su colonna di gel di silice. L'eluizione con C_6H_6/Et_2O 95:5 v/v dà un prodotto semicristallino giallo che viene cristallizzato da benzene (p.f. 170-173°C., resa 71%).

I.R. ($CHCl_3$): 1730 cm^{-1} (C=O), 1615 cm^{-1} (C=C), 1540 cm^{-1} (C=N).

1H -NMR (d_6 -DMSO): $\delta 8,51$ (dd, 2H, H_3 e H_2), $\delta 7,90$ (d, 1H, H_6), $\delta 7,82$ (d, 1H, H_8), $\delta 7,68$ (t, 1H, H_7), $\delta 7,53$ (t, 1H, H_9).

MS: 182 m/e (M^+), 154 m/e ($M^+ - CO$), 128 m/e ($M^+ - 2HCN$).

Analisi: $C_{15}H_8N_2O$ (PM 182)

	C	H	N	O
Trov. %	72,43	3,39	8,65	15,53
Calc. %	72,52	3,32	8,78	15,38

Pirazino[2,3b]fenalene-5-one (3): Ad una soluzione di fenalene-1,2,3trione in MeOH, agitata magneticamente, a t.a. si aggiunge una quantità equimolecolare di etilendiammina. La soluzione di reazione si colora immediatamente in viola e dopo 1h il solvente viene allontanato sotto vuoto a t.a.; il prodotto grezzo viene cromatografato su colonna di silice, l'eluizione C_6H_6/Et_2O 8:2

v/v dà un prodotto che cristallizzato da metanolo si presenta sotto forma di aghi giallo-arancio (p.f. 225-228°C, resa 75%).

I.R. (CHCl₃): 1660 cm⁻¹ (C=O).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 9,03 (d, 1H, H₆), δ 8,90 (d, 2H, H₃ e H₂), δ 8,83 (d, 1H, H₁₁), δ 8,30 (d, 1H, H₅), δ 8,14 (d, 1H, H₈), δ 7,79 (m, 2H, H₁₀ e H₇).

MS: 232 m/e (M⁺), 204 m/e (M⁺-CO), 178 m/e (M⁺-2HCN).

Analisi: C₁₅H₈N₂O (PM 232)

Trov.%	77,32	3,51	12,16	7,01
Calc.%	77,57	3,47	12,06	6,89

Bibliografia

- 1 - Schonberg, A., Singer, E., Osch, M., *Tetrahedron Letters*, 57, 3217 (1975).
- 2 - Schonberg, A., Singer, E., Eschenhof, B., *Chem. Ber.*, 111, 3058 (1978).
- 3 - Ahamed, M.G., Ahamed, S.A., Ronman, U.R., Alan, M.K., *J. Bangladesh acad. Sc.*, 5, 13 (1981).
C.A., 95, 115100 (1981).
- 4 - Alexander, G.J., Chatterjje, M., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 27(1), 45 (1980).
- 5 - Crooks, P.A., Deeks T., *Chem. & Ind.*, 793 (1975).
- 6 - Schonberg, A., Singer, E., Hoyer, G.A., Rosenberg, D., *Chem. Ber.*, 110, 3954 (1977)
- 7 - Wigfield, D.C., Buchanan, G.W., Croteau, S.M., *Can. J. Chem.*, 58, 201 (1980).
- 8 - Mordecai B. Rubin, *Chem. Rev.*, 75(2), 177 (1974).
- 9 - Errera, G., *Gazz. Chim. It.*, 43(1), 583 (1910).
- 10- Morrica, P., D'Ambrosio, C., Behar, I., *Rend. Accad. Sci. Fis. Mat. Napoli*, submitted (1983).

La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci L. Mangoni, R. Nicolaus, V. Leone.

REAZIONI DI TRICHETONI CICLICI CON NUCLEOFILI BIFUNZIONALI - III

Nota di Patrizia MORRICA¹ e Carla FERRERI²

Presentata dal socio Lorenzo MANGONI

Adunanza del 23 luglio 1983

Riassunto - La reazione tra la ninidrina e l'etanditiolo è una reazione nota; i risultati ottenuti portano ad una revisione della struttura proposta dalla letteratura per il prodotto isolato.

Abstract - The reaction between ninhydrin and ethandithiol was a known reaction; the results we obtained lead to the revision of the structure which had been proposed for the product in the literature.

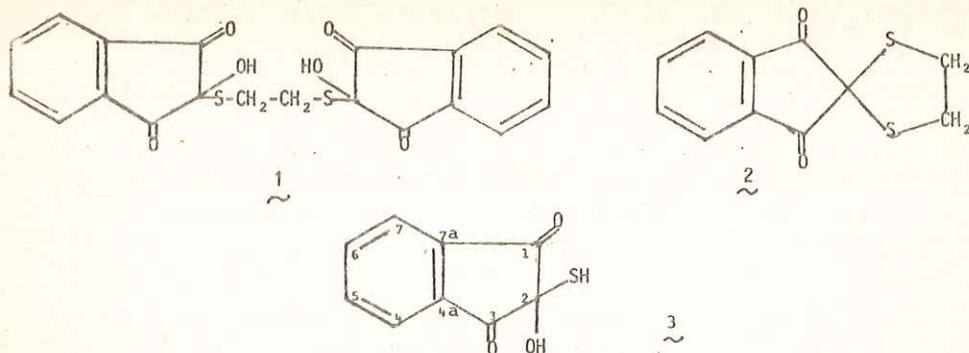
E' stato riportato da Schonberg e al.¹ che la ninidrina reagisce con l'etanditiolo per dare il composto 1. In base alla nostra esperienza nelle reazioni di trichetoni ciclici con nucleofili bifunzionali l'ottenimento di tale prodotto anziché del ditiolano 2 appariva peculiare. Abbiamo perciò voluto ripetere la reazione nelle condizioni descritte dai citati autori¹.

Il prodotto che si ottiene in tali condizioni di reazione, con resa di circa il 75 %, cristallizza da etanolo sotto forma di aghi bianco-rosati, p.f. 208-210°C. (lett. ³208°C). Lo spettro I.R. presentava bande significative a 3330 e 1705 cm⁻¹ (lett.¹ 1750, 1705 e 3360 cm⁻¹). L'analisi forniva dati in accordo con la composizione elementare C₂₀H₁₄O₆S₂¹. Lo spettro ¹H-NMR mostrava però solo due singoletti a δ 7,98 e δ 6,49 rispettivamente. L'assenza dallo spettro ¹H-NMR di un segnale, come descritto da Schonberg e al.¹, a δ 3,38 (s, 4H, -S-CH₂-CH₂-S-) ci ha indotto ad effettuare uno spettro ¹³C-NMR. Da tale spettro (vedi parte sperimentale) nonché dalle caratteristiche spettrali precedentemente descritte la struttura da noi assegnata al composto in questione e quella del 2-idrossi,2-mercapto-1,3-indandione (3).

Tale struttura è in accordo anche con lo spettro di massa che mostra un picco molecolare a 194 m/e (M⁺) e picchi significativi a 176 m/e (M⁺-H₂O) e a 160 m/e (M⁺-H₂S), oltre ai caratteristici picchi della ninidrina a 76, 104 e 132 m/e^{2,3}.

¹ Istituto di Biorganica - Facoltà di Farmacia - Università di Napoli - Via L. Rodinò, 22.

² Istituto di Chimica Organica e Biologica - Facoltà di Scienze Nat., Fis. e Mat. - Università di Napoli - Via Mezzocannone, 16.



Va inoltre notato che l'analisi elementare, nei limiti dell'errore sperimentale, risulta accettabile sia per la formulazione di Schonberg e al. sia per la nostra formulazione, $C_9H_6O_3S$.

A questo punto sembra evidente che nello spettro 1H -NMR degli autori citati una qualche impurezza sia stata interpretata per il segnale dei CH_2 fra i due atomi di zolfo. Per confermare ciò la reazione è stata effettuata ripetutamente, anche apportando piccole modifiche alla metodica (temperatura, tempi di reazione e solvente) ed ha condotto sempre allo stesso prodotto 3.

Ad ulteriore conferma della nostra attribuzione strutturale, corrispondente ad una forma tioidrata dell'indantrione, abbiamo fatto reagire il composto 3 con la solfammina e con l'acido amidosolfonico nelle condizioni descritte per la ninidrina⁴. Il prodotto ottenuto, come atteso, anche se con rese più basse, in quanto accompagnato da altri prodotti, è risultato essere la DYDA ossidrilata⁴.

Inoltre, come atteso, il prodotto 3 è relativamente poco stabile e si trasforma nella ninidrina per trattamento con acqua o per semplice azione dell'umidità atmosferica quando è lasciato a riposo senza precauzioni.

Attualmente è in corso un esame più approfondito della reazione per comprendere il meccanismo di formazione del composto 3 nonché per confrontarne la reattività con quella della ninidrina.

Parte Sperimentale

Le notizie generali su materiali e metodi sono state già riportate⁴.

2-iridossio,2-mercapto-1,3 indandione(3) - Ad una soluzione di ninidrina in EtOH, agitata magneticamente, viene aggiunto etanditiolo in quantità equimolecolari. Dopo circa 10' si forma un precipitato che, separato per filtrazione e cristallizzato da etanolo, si presenta sotto forma di aghi bianco-rosati, p.f. 208-210°C (resa 76%).

I.R. (nujol): 1705 cm^{-1} (C=O), 3330 cm^{-1} (OH).

1H -NMR (d_6 -DMSO): δ 7,98 (4H, C_6H_4) e δ 6,49 (1H, OH).

^{13}C -NMR (d_7 -DMF): δ = 81 (C-2), δ = 124 (C-4 e C-7), δ = 137 (C-5 e C-6), δ = 138 (C-4a e C-7a),
 δ = 194 (C-1 e C-3)

MS: 194 m/e (M^+), 176 m/e (M^+-H_2O), 160 m/e (M^+-H_2S), 132, 104 e 76 m/e.

Analisi: C ₉ H ₆ O ₃ S (PM 194)	C	H	O	S
Calc.%	55,68	3,12	27,20	14,01
Trov.%	56,18	3,40	26,58	13,84

Bibliografia

- 1 - Schonberg, A., Singer, E., Eschenhof, B., Hoyer, G.A., *Chem. Ber.*, 111, 3058 (1978).
- 2 - Wigfield, D.C., Buchanan, G.W., Croteau, S.M., *Can. J. Chem.*, 58, 201 (1980).
- 3 - Mordecai B. Rubin, *Chem. Rev.*, 75(2), 177 (1974).
- 4 - Morrica, P., D'Ambrosio, C., Behar, I., *Rend. Accad. Sci. Fis. Mat. Napoli*, (1983)

La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci L. Mangoni, R. Nicolaus, V. Leone.

PALEOMAGNETIC EVIDENCES OF EARLY DIAGENETIC FORMATION OF THE AMMONITICO ROSSO OF
WESTERN SICILY

Nota di Giuseppe NARDI

presentata dal socio ordinario

Bruno D'ARGENIO

Adunanza del 23.7.1983

RIASSUNTO

L'origine dell'"Ammonitico Rosso" con la sua caratteristica struttura nodulare è stata dibattuta per lungo tempo. Due ipotesi conflittuali, formazione in un ambiente profondo per un processo di sub-soluzione e formazione per diagenesi precoce si confrontano da lungo tempo. Lo studio paleomagnetico della "Source of Remanence" in queste rocce, caratterizzate dalla presenza sia di magnetite che di ematite, ha evidenziato che la remanence è dovuta ad un minerale della famiglia delle magnetiti di origine detritica o biogenica, che, l'ematite non esercita nessuna influenza.

Questi risultati paleomagnetici sono stati interpretati, geochimicamente, in accordo con un'origine di diagenesi precoce dell'Ammonitico Rosso.

ABSTRACT

The mode of origin of a formation such as the Ammonitico Rosso with its nodular structure has been debated for a long time. There are two conflicting hypotheses, one in which sub-solution plays an important role and another one characterized as the early diagenetic hypotheses. Palaeomagnetic investigations of the source of remanence in these rocks, characterized by the presence of both hematite and magnetite, has showed. That hematite not appear to play a significant role in the remanence and it is carried by a detrital or organic titanomagnetite, and so assume it to be of primary origin.

This paleomagnetic results have been explained geochemically according to a early diagenetic hypotheses of Ammonitico Rosso formation.

INTRODUCTION

In the predominantly calcareous Mesozoic sequence of the Mediterranean two horizons stand out because of their colours and distinctive lithologies, the ammonitico rosso and the scaglia rossa. The red colour with its implications of an appreciable iron oxide content made them automatic targets for palaeomagnetic research.

In reviewing the extensive literature on the Ammonitico Rosso to understand the conditions under which it formed as a background to the origin of magnetization it was realized that a considerable degree of confusion existed concerning the origin of this condensed deposit. In general magnetic data concerning the iron minerals is generally unknown. We have attempted therefore to review the sedimentological data and geochemical and magnetic investigations to produce a coherent interpretation.

The ammonitico rosso, or knollenkalk in German terminology is a red nodular or pseudonodular limestone or marly limestone usually rich in ammonites. It consists of centimetre sized micritic nodules commonly a lighter red color than the darker red marly matrix (Jenkyns 1978). Aubouin (1965) distinguishes two varieties of ammonitico rosso, an ammonitico rosso calcaire which is always coherent and shows no sign of soft sediment deformation (the calcaire noduleux pure of Elmi (1980) and the ammonitico rosso marneux which does exhibit evidence of soft sediment deformation (the calcaire noduleux marneux or pseudo-noduleux of Elmi, 1980). The two varieties may grade vertically from one to the other.

The fauna contained in the ammonitico rosso in addition to the fossil from which the name derives, contains belemnites, gastropods, brachiopods, globigerinids, radiolaria, ostracodes, sponge spicules and pelagic and benthonic echinoderm fragments (Jenkyns 1978). Calcareous nanofossils are rare. The ammonites are usually present as moulds and characteristically of small size.

On occasion, continental or volcanic detritus may be found in the ammonitico rosso (Birkenmajer et al., 1960; Jenkyns and Torrens, 1971). Ferromanganese nodules (Jenkyns and Torrens, 1971) and hard grounds occur.

Characteristically the ammonitico rosso is perhaps the extreme variety of condensed red limestone sequence found in the Mediterranean region. Whenever found it is of Jurassic age. Similar limestone lithologies are recognized in the Devonian of Bohemia and in the Montagne Noire south of the Massif Central in France and it is similar to the Triassic Hallstatt facies of the Alps. Recent and Quaternary nodular sediments in the Ionian Sea from the Mediterranean Sea were compared to ammonitico rosso by Muller and Fabricius (1974).

The presence of hematite, to which the red color is due, make the ammonitico rosso an obvious target for paleomagnetic research. In the following, the detailed paleomagnetic study of four sections of Western Sicily in the extensive condensed limestone sequences will be described.

ORIGIN OF THE AMMONITICO ROSSO

The mode of origin of a formation such as the ammonitico rosso with its nodular structure has been debated for a long time (Hollmann, 1962 and 1964; Grundel and Rosler, 1963; Presley and Kaplan, 1968; Garrison and Fischer, 1969; Berner et al., 1970; Jenkyns, 1974). Some of the difficulty lies in the variability of the ammonitico rosso when examined in detail, and in the apparent contradictory evidence. For example in order to explain the red color deep water conditions were evoked by some authors (Garrison and Fischer, 1969), this fitted the condensed nature of the sequence and the earlier presumed nature of the radiolarites but seemed to contradict the faunal evidence of shallow water and the required rapid vertical motion implied. However as Aubouin (1965) pointed out, two types of ammonitico rosso can be distinguished each of which has its own depositional environment. Of more particular concern here is the calcaire rouge nodulex which fits the classic description of the ammonitico rosso s.s. The resolution of the mode of origin of the ammonitico rosso is important from the paleomagnetic standpoint because of the presence of both hematite and magnetite.

There are two conflicting hypotheses, that of Hollmann (1964) in which subsolution plays an important role and that of Jenkyns (1974), Hudson and Coleman (1978), Elmi (1980) which may be characterized as the early diagenetic hypotheses. In its essential the Hollmann (1964) hypotheses suggests that the nodules are isolated "solution remnants" in a insoluble marly residue formed in a deep water marine environment. The process was regarded as cyclical with periods of carbonate deposition alternating with periods of solution. For this to be true is necessary that depth at which deposition occurred be close to the C.C.D. so that the hypotheses can be reduced to search for a mechanism to allow periodic fluctuations in the depth of the C.C.D. According to Garrison and Fischer (1969) the depth of which the ammonitico rosso formed was in excess of a few thousand meters.

The early diagenetic process model as developed by Jenkyns (1974) suggests that the subsurface solution of both aragonite and fine-grained calcite from a homogeneous mixture of clays, containing calcareous nannofossils and aragonite, due to their differential solubility resulted in a precipitation of high magnesian calcite. The latter formed as nodules within the original marly sediment. The upward migration of the sediment interface resulted in a drop in the concentration gradient of the magnesian calcite inhibiting further growth of the nodules and is used to explain the alternation of nodular layers with marls.

Stable isotopic data from nodules in the Western Sicilian ammonitico rosso (Marshall, 1981) show a narrow range of $d^{18}O$ (-0.9 to 0.38) and $d^{13}C$ (0.5 to 2.75) values implying that all cementation took place at, or immediately below the seafloor. The contacts between nodules and matrix of the ammonitico rosso may be either distinct and well cut or diffuse and transitional, irregular or filamentous (Elmi, 1980). These contact-features are typical of those related to diagenesis supporting the "early diagenetic" hypotheses of Jenkyns (1974).

The model does not require any specific depth for the process to operate. However the presence of algal stromatolites (Jenkyns, 1974; Elmi, 1980), an association sometime found with the ammonitico rosso, indicates by implication that

certain these sediment was deposited also in the photic zone.

PALEOMAGNETIC INVESTIGATION

Suites of samples were collected from four localities in Western Sicily, spread over a distance of 140 km.

For all the four suites of samples oriented cores were taken directly in the field employing a hand held gasoline powered drill with a 1" I.D. water cooled diamond coring tool.

Samples were sliced into cores of standard length and remanence measurements were made using the Digico Complete Results Rock magnetometer interfaced with a Minc Computer.

Magnetic cleaning was carried out using both thermal and alternating field techniques. Alternating field demagnetization of the samples was done with a Schonstedt G.S.D.I. Geophysical Specimen Demagnetizer and thermal demagnetization was carried out in with a Schonsted thermal demagnetizing unit.

The intensity of N.R.M. varied considerably but for all suites was very weak, ranging from 8×10^{-6} to 0.2×10^{-6} emu c.c., with the commonest value 1×10^{-6} emu c.c.

Normalized demagnetization curves are figured (Fig. 1). Figure 1a illustrates alternating field demagnetization and figure 1b shows a normalized thermal demagnetization curve.

Standard end point curves (Fig. 2) seem to indicate that a stable, single magnetic component has been isolated.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Although hematite is present in the samples, indeed it is part of the source of the name, it does not appear to play a significant role in the remanence.

The remanence is carried by a relatively low coercitivity mineral, whose response to alternating fields is in the range of that characteristic of the titanomagnetites. Thermal treatment too, seems to indicate that most samples are essentially demagnetized by 500° (Fig. 1b). The limestones presumably carry organic matter for during thermal demagnetization the samples are progressively bleached.

We suppose that the hematites may be in a finely divided, perhaps supra-paramagnetic state. The distribution of the hematite suggests that it is of secondary origin. However as the hematite is not the agent responsible for the remanence, we believe we may attribute the remanence to a detrital or biogenic titanomagnetite, and so assume it to be of primary origin.

The ammonitico rosso formed during an early diagenetic process in the upper few centimeters of the sediments (Jenkyns, 1974; Hudson and Coleman, 1978; Elmi, 1980). The interstitial water of this sediment rich in calcite and aragonite sh-

ould have a pH ranging between 7.5 and 8.0 according to I.A.P. (Ion Activity Product) of these substances (Bathurst, 1976). The high initial Eh value decreased rapidly as the quantity of oxygen below the interface was rapidly reduced:

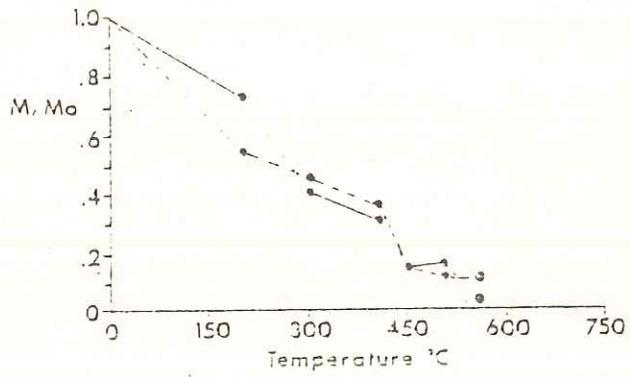
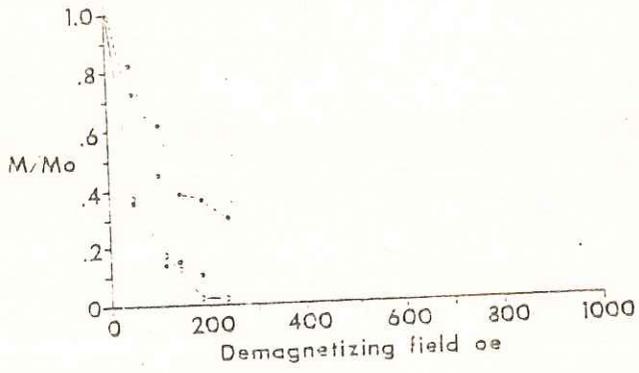
- a) by the abundant Fe presumably coming from the tuff present in the area;
- b) by the bacterial activity which destroyed most of the organic matter present in the sediment forming CO_2 and decreasing O_2 .

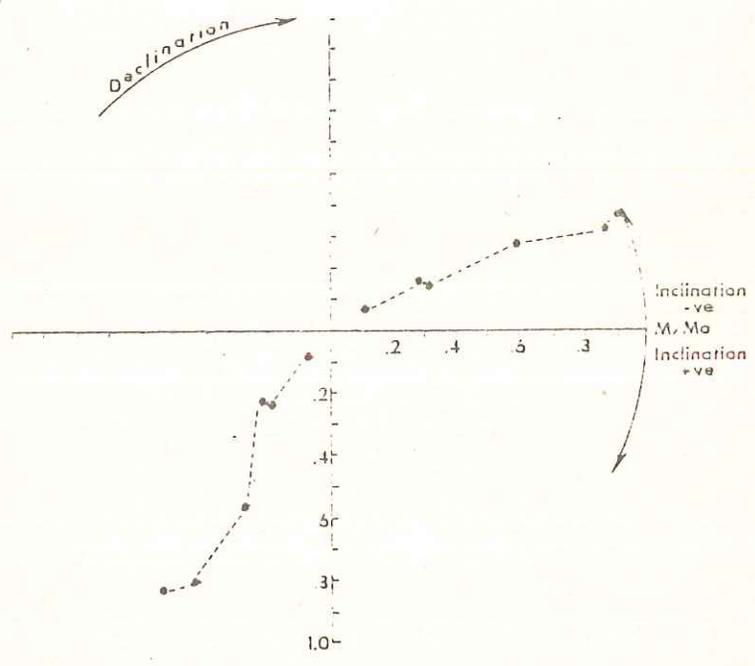
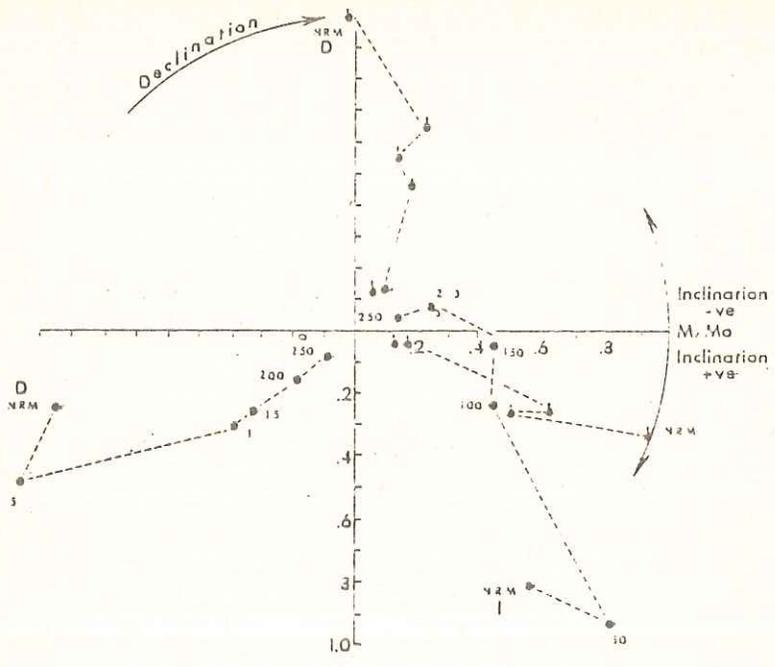
The above processes can also explain the color variation of the ammonitico rosso ranging from red to green, sometimes in the same nodule (Aubouin, 1966). The value of the pH (7.5 to 8.0) and the rapid decrease of the Eh in the interstitial water of these sediments can explain the preservation of the detrital or biogenic magnetite (very slow rate of solubility) with the contemporaneous formation of the hematite. Figure 3 shows the stability field of hematite in water.

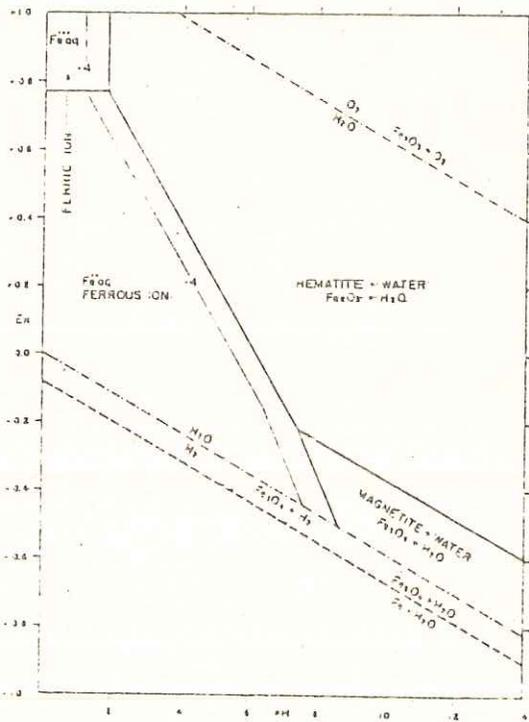
BIBLIOGRAPHY

- Aubouin J. (1965) - Reflection sur la facies "Ammonitico Rosso". Bull. Soc. Geol. Fr. v. 6, 475-501.
- Bathurst R.G. (1976) - Carbonate sediments and their diagenesis. Pub. Elsevier, Amsterdam, 247.
- Berner R.A., Scott M.R. and Thomlinson C. (1970) - Carbonate alkalinity in the pore waters of anoxic marine sediments. Limnol. Oceanogr., v. 15, 544-549.
- Birkenmayer K., Gasiorowski S.M. and Wieser T. (1960) - Fragments of exotic rocks in the pelagic deposits of the Bathonian of the Niedzica series (Pieniny klippen-belt, Carpathians). Ann. Soc. Geol. Pol. v. 30, 29-57.
- Elmi S. (1980) - Genetic and typological classification of Rosso Ammonitico and nodular-lumpy facies: An attemptative survey. Rosso Ammonitico Symp. Abst. Roma 6.21.1980.
- Garrison R.E. and Fischer A.G. (1969) - Deep water limestones and radiolarites of the Alpine Jurassic. In: Depositional environments in carbonate rocks. (Ed. G.H. Friedman) Soc. Econ. Min. Pal., Sp. Pub. n. 14, 20-56.
- Grundel J. and Rosler H.J. (1963) - Zur Entstehung der oberdevonischen kalkknollengesteine Thuringens. Geologie, v. 12, 433-459.
- Hollmann R. (1962) - Über subsolution und der Knollenkalke des Calcarea Ammonitico Rosso Superiore in Monte Baldo (Norditalien) N. Jb. Geol. Palaont. Mh. 163-179.
- Hollmann R. (1964) - Subsolution fragment zur Biostratonomie der Ammonoidea in Malm des Monte Baldo (Norditalien), N. Jb. Geol. Palaont., Mh. 119, 22-82.
- Hudson J.D. and Colxman M.L. (1978) - Submarine cementation of the Scheck Limestone conglomerate (Jurassic, Austria): isotopic evidence. N. Jb. Geol. Palaont. Mh. v. 9, 534-544.
- Jenkyns H.C. and Torrens H.S. (1971) - Palaeogeographic evolution of the Jurassic seamonts in Western Sicily. In: Colloque du Jurassique Mediterranean. (Ed. by E. Vegh-Heubrandt). Ann. Inst. Geol. Publ. Hung. v. 54/2, 91-104.
- Jenkyns H.C. (1974) - Origin of red nodular limestones (Ammonitico Rosso, Knollenkalk) in the Mediterranean Jurassic: a diagenetic model, in Pelagic Sedim-

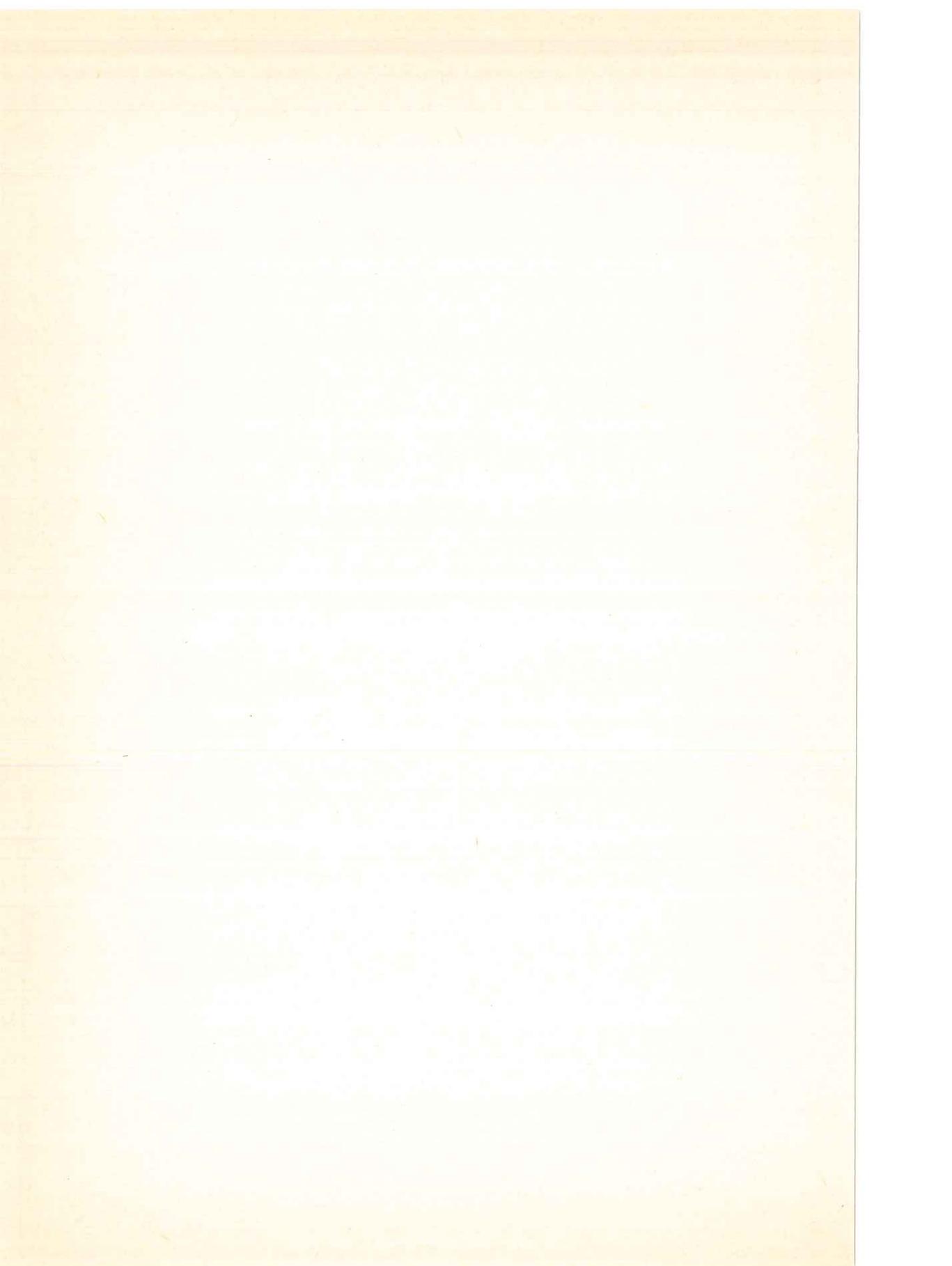
- ent: on land and under the sea (ed. K.J. Hsu and H.C. Jenkyns) Spec. Publ. Int. Ass. sediment, 1, 249-271.
- Jenkyns H.C. (1978) - Pelagic Environments. In: Sedimentary environments and facies. (Ed. H.G. Reading): 314-371. (Blackwell) Oxford:
- Marshall, J.D. (1981): Stable isotope evidence for the environment of lithification of some Tethyan limestones. N. Jb. Geol. Palaont. Mh. v. 4, 211-224.
- Muller J. and Fabricius F. (1974) - Magnesian-calcite nodules in the Ionian deep sea an actualistic model for the formation of some nodular limestones. In: Pelagic Sediment: on Land and under the Sea. (Ed. K.J. Hsu and H.C. Jenkyns). Spec. Publ. Int. Ass. Sediment. V. 1, 235-247.
- Presley B.J. and Kaplan I.R. (1968) - Changes in dissolved sulfate, calcium and carbonate from interstitial water of near shore sediments. Geochim. cosmochim. Acta, v. 32, 1037-1048.







La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci A. Scherillo, P. Corradini, B. D'Argenio.



I VALORI EMATOLOGICI E LE CELLULE DEL SANGUE DI
SCYLIORHYNUS STELLARIS L.: VARIETA' DI FORME
E PRIME OSSERVAZIONI CITOCHIMICHE

Nota di Alessandra Pica, Maria Consiglio,
Grimaldi, Silvana D'Ippolito e Francesco
Della Corte; presentata dal Socio Ordinario

Prof. Mario De Vincentiis

Adunanza del 23-7-1983

Riassunto

Sul sangue prelevato dall'aorta di otto Scyliorhynchus stellaris vengono de-
terminati: emoglobina (3,57 g/100 ml); ematocrito (21,57%); globuli rossi
(128500/mm³); globuli bianchi (28687/mm³); MCV (1405 µm³); MCH (310,33 pg); MCHC
(18,35%). Gli strisci di sangue non eparinizzato sono stati colorati con il May
Grünwald-Giemsa e con i metodi citochimici: perossidasi-benzidina sec. Lepehne
per l'emoglobina; sudan nero B; PAS; alcian blu; safranina O; blu di toluidina;
mercurio bromofenolo blu e fast green per le proteine ricche in arginina e
lisina; adenosinatrifosfatasi; fosfatasi alcalina; fosfatasi acida; aliesterasi;
perossidasi sec. Graham-Knoil.

Per la serie rossa vengono descritti: eritroblasti basofili (3,14%; Ø 16,08 µm),
eritroblasti acidofili (9,99%; Ø 22,74 x 15,18 µm), eritrociti maturi (Ø 28,46 x
18,04 µm).

Per la serie bianca si descrivono: linfociti (46,39%; Ø 11,20 µm); plasmoci-
ti (2,64%; Ø 15,7 x 14,05 µm); monociti (3,17%; Ø 18,40 µm); granulociti neutrofili
tipo I (10,91%; Ø 18,71 µm) e tipo II (1,96%; Ø 18,98 µm); granulociti eosinofili
tipo I (33,11%; Ø 15,96 x 10,19 µm) e tipo II (1,82%; Ø 16,83 µm) e trombociti
(7165/mm³; Ø 15,77 x 9,92 µm). Sono presenti inoltre poche cellule probabilmente
blastiche, tipo emocitoblasto, linfoblasto e mielocita.

Abstract

On the blood taken from the conus arteriosus of eight specimens of Scyliorhy-
nus stellaris L., the following hematological values have been determined:
hemoglobin (3.57g/100 ml); hematocrite (21.57%); red cells (128500/mm³); leukocy-
tes (28687/mm³); MCV (1405 µm³); MCH (310.33 pg); MCHC (18.35%). The smears have
been stained with May Grünwald-Giemsa and with the following cytochemical me-
thods: benzidine-peroxidase after Lepehne, for Hgb; sudan black B; PAS; alcian blue;
safranin O; toluidine blue; Hg-bromophenol blue; fast green for protein rich in

Istituto di Istologia ed Embriologia, Fac. di Scienze, Università di Napoli,
via Mezzocannone 8, 80134 Napoli, Italy.

Lavoro eseguito presso la Stazione Zoologica di Napoli, diretta dal Prof.
Sebastiano Genovese.

arginine and lysine; adenosinetriphosphatase; alkaline phosphatase; acid phosphatase; aliesterase; peroxidase after Graham-Knoll. The following types of red cells have been described: basophilic erythroblasts (3.14%; \varnothing 16.08 μ m), acidophilic erythroblasts (9.99%; \varnothing 22.74 x 15.8 μ m) and mature erythrocytes (28.46 x 18.04 μ m). The following types of leukocytes have been described: lymphocytes (46.39%; \varnothing 11.20 μ m); plasmocytes (2.64%; 15.7 x 14.05 μ m); monocytes (3.17%; 18.40 μ m); neutrophilic granulocytes type I (10.91%; \varnothing 18.71 μ m) and type II (1.96%; \varnothing 18.98 μ m); eosinophilic granulocytes type I (33.11%; \varnothing 15.96 x 10.19 μ m) and type II (1.82%; \varnothing 16.83 μ m) and thrombocytes (7165/mm³; 15.77 x 9.92 μ m). Some blast cells like the hemocytoblasts, lymphoblasts and myelocytes have been described.

Introduzione e bibliografia

E' ben noto che, molte, se non tutte le cellule dei Vertebrati non-Mammiferi e dei Pesci in particolare, sia rosse che bianche, completano la loro maturazione nel sangue stesso, staccandosi dagli organi emolinfopoietici già ai primi stadi maturativi ed andando anche in mitosi. Con tale studio si cerca di identificare i vari tipi di cellule circolanti sia rosse che bianche, con i metodi citochimici oggi più in uso soprattutto nell'ematologia umana. Tale studio segue ad altri sulle torpedini e sulle razze (Pica et al., 1983; Grimaldi et al., 1983; D'Ippolito et al., 1983). La maggior parte della bibliografia sulle cellule del sangue degli Elasmobranchi è stata riportata nei lavori succitati; per tale motivo vengono riportati qui solo i lavori più significativi sui Galeomorphi e sugli Squalomorphi, ma nulla è stato trovato su *Scyliorhynchus stellaris*. DRZEWINA (1911) in *Scyllium canaliculatum*, descrive i granulociti con fini e numerose granulazioni di colore arancio con il metodo di Erlich ed altri con granuli meno acidofili dei precedenti. GERZELI (1954) trova granuli PAS positivi nei trombociti, nei neutrofili e negli eosinofili di *Scyllium canaliculatum* che vengono digeriti completamente dall'amilasi salivare nei primi due tipi cellulari. FEY (1965), in *Scyllium canaliculatum*, chiama eterofilo il tipo più abbondante di granulocita che contiene fini granuli e sembra corrispondere al neutrofilo umano. FÄNGE et al. (1968, 1980, 1983), in *Etmopterus spinax*, *Squalus acanthias* e *Scyllium canaliculatum* studiano la leucocitopoiesi e l'attività glucosidasi degli organi linfomielioidi e descrivono due tipi di eosinofili, uno con granuli tondi ed uno con granuli sottili a bastoncino e tutte le forme intermedie, oltre a linfociti in vari stadi maturativi; i granulociti entrano in circolo a maturazione completa e nell'organo linfomieloide se ne trovano in quantità cento volte maggiore che nel sangue circolante; secondo gli AA., una gran parte di essi perde il contenuto dei granuli che forse riversa nel sangue circolante. JOHANSSON-SJÖBECK et al. (1976), in *Prionace glauca*, trovano i seguenti valori ematologici e tipi cellulari: Ht 22,3%; Hb 5,7g/100 ml; MCHC 25,7%; eritrociti

ti maturi e cellule blastiche, linfociti, trombociti, granulociti neutrofili, eosinofili. Non riscontrano basofili. MORROW e PULSFORD (1980), in Scyllium canicula descrivono al m.e.: linfociti, plasmociti, monociti, trombociti e quattro tipi di granulociti. PULSFORD et al (1982), in Scyllium canicula, nella milza al m.e., trovano pochi granulociti di tutti e quattro i tipi descritti da MORROW e PULSFORD (1980) e linfociti, plasmociti, eritrociti in vari stadi di sviluppo, trombociti e macrofagi con residui di eritrociti nel citoplasma. MATTISSON et al. (1982) in Etmopterus spinax, nel tessuto linfomieloide descrivono: linfociti, plasmociti, tre tipi di granulociti eterofili e granulociti eosinofili; questi ultimi hanno granuli sferici che non contengono core cristallino al m.e.. La presenza di monociti viene ritenuta dubbia. Tutti gli esemplari adulti sono infestati da un nematode Proleptus obtusus.

Materiale e metodi

Sono stati utilizzati otto esemplari di Scyliorhynchus stellaris L. dei quali: 3 adulti (800-1000g), 2 ♂♂ e 1 ♀; 3 giovani (300-600 g) 2 ♀♀ ed 1 ♂ e 2 ♂♂ piccoli (50-60 g); questi ultimi due sono stati trattati rispettivamente con 1.22 ml e 0.72 ml di fitoemoagglutinina (PHA) per un totale di tre giorni e quindi sono stati colchicinizzati con 0,22 mg di colchicina allo scopo di stimolare la presenza in circolo delle forme immature. Questi due esemplari non sono stati utilizzati per la determinazione dei valori ematologici né delle formule leucocitarie. Il sangue è stato prelevato dal cono arterioso degli animali anestetizzati (MS222 Sandoz) e diluito con eparina per la determinazione dei valori ematologici e senza eparina per gli strisci. Sono stati eseguiti: la conta dei globuli rossi e bianchi in camera di Bürker, l'emoglobina (Hb) al fotometro col metodo alla cianmetaemoglobina, l'ematocrito (Ht). Gli strisci sono stati colorati con il May Grünwald-Giemsa (M.G.G.) e con perossidasi-benzidina sec. Lepehne (PEO-Hb) (cfr. Undritz, 1972), per l'Hb; sudan nero B sec. Lison (cfr. undritz, 1972) per i lipidi; PAS sec. McManus (1946) e Merker (1963) (cfr. undritz, 1972), per i polisaccaridi neutri, anche con precedente trattamento con amilasi salivare; alcian blu a pH 1 e pH 2,5 (cfr. Pearse, 1968), per i polisaccaridi acidi; safranina O (1:1000) (cfr. Lillie, 1965) e blu di toluidina 1% (cfr. Undritz, 1972), per la metacromasia; mercurio-bromofenolo blu 0.1% (cfr. Pearse, 1968) ed il fast green (cfr. Pearse, 1968) per le proteine ricche in arginina e lisina ed i seguenti metodi enzimatici: adenosina trifosfatasi (ATPasi) sec. Vachstein (cfr. Heller, 1972); fosfatasi alcalina (ALP) sec. Löffler (cfr. Undritz, 1972); perossidasi sec. Graham-Knoll (PEO) (cfr. undritz, 1972).

Risultati

Il valore medio di Hb è risultato di 3.57 g/100 ml \pm 0,12; l'Ht medio 21,57% \pm

1,65; il numero medio di globuli rossi $128500/\text{mm}^3 \pm 17270$; il numero medio di globuli bianchi $28687/\text{mm}^3 \pm 1850$. La conta dei trombociti è stata eseguita come per le piastrine umane (metodo di Fonio) ed il loro numero medio è risultato di $7165/\text{mm}^3 \pm 132.05$. Il volume corpuscolare medio (MCV), la concentrazione emoglobinica media (MCH) e la concentrazione emoglobinica corpuscolare media (MCHC) sono risultate rispettivamente di $1405 \mu\text{m}^3 \pm 310,65$, $310,33\text{pg} \pm 21,92$ e $18,35 \pm 1,83$.

Cellule della serie rossa

Si riuniscono in questa categoria tutte le cellule positive alla reazione per l'Hb, la cui intensità di colorazione varia dal verde al giallo. Si distinguono in progressione maturativa: eritroblasti basofili (Fig. 1) ($3,14\% \pm 0,5$; $\varnothing 16,08 \mu\text{m}$), di forma arrotondata, con citoplasma blu al M.G.G. e verde con la reazione per l'Hb; il nucleo è grande ($19,15 \mu\text{m}$), rotondo, con cromatina a maglie strette, nucleolo spesso visibile e frequentemente in mitosi, soprattutto in profase (il 20% circa). Questi elementi presentano scarsa quantità di Hb ed abbondanti ribonucleoproteine. Gli eritroblasti acidofili, costituiscono la successiva tappa di maturazione: la forma è ellissoidale quasi come l'eritrocita maturo, ma più piccolo ($9,99\% \pm 0,93$; $\varnothing 22,74 \times 15,18 \mu\text{m}$), il citoplasma è rosa pallido col M.G.G. e giallo-verde con la reazione per l'Hb; il nucleo è rotondo o lievemente allungato ($\varnothing 12,1 \times 9,9 \mu\text{m}$), la cromatina è disposta in grossi blocchi come nell'eritrocita maturo ed il nucleolo è raramente visibile; l'8% di essi si presenta in profase mitotica. Gli eritrociti maturi (Fig. 1), di forma ellissoidale ($\varnothing 28,46 \times 18,4 \mu\text{m}$) si colorano in rosa pallido con il M.G.G. ed in giallo con la reazione per l'Hb. In molti di essi, il citoplasma presenta dei piccoli vacuoli lipidici perchè positivi solo al sudan nero B; il nucleo è allungato con cromatina a densi blocchi ed il nucleolo non è osservabile. I metodi citochimici hanno dato risultati negativi, eccetto quello di Brachet per le ribonucleoproteine, che ha dato esito positivo negli eritroblasti, di più nei basofili e meno negli acidofili.

Cellule della serie bianca

I linfociti (Fig. 2) ($36,39\% \pm 0,41$ nella formula), sono rotondi ($\varnothing 11,20 \mu\text{m}$) con scarso citoplasma a contorno irregolare con vari microvilli, lievemente basofilo con il M.G.G., si colora in azzurro. Alcuni linfociti contengono piccole granulazioni viollette nel loro citoplasma. Il nucleo è grosso, rotondeggiante con cromatina a densi blocchi e nucleolo non visibile. Lo scarso citoplasma appare lievemente positivo al PAS e le granulazioni, quando presenti, sono lievemente positive all'aliesterasi ed alla fosfatasi acida.

I monociti ($3,17\% \pm 1,0$) hanno forma rotonda o lievemente allungata ($18,32 \times 18,48 \mu\text{m}$) con nucleo reniforme o incurvato. Il citoplasma, più esteso che nei linfociti, risulta azzurro col M.G.G. e presenta spesso una finissima granulosità del fondo, debolmente violetta. Il nucleo ha cromatina a maglie larghe e non è

LE CELLULE DEL SANGUE DI SCYLITORHYNUS STELLARIS L.

Colorabilità e comportamento ai metodi citochimici.

METODI	Er.bas. citopl.	Er.ac. citopl.	Er.mat. citopl.	Linfociti f. gr.	Plasmociti f.	Mnrociti f. gr.	Gr.neutr.I f. gr.	Gr.neutr.II f. gr.	Gr.eosin.I f. gr.	Gr.eosin.II f. gr.	Trombociti f. gr.	
M.G.G. (colore)	blu	rosa pallido	rosa	blu	blu	blu	grigio rosa	grigio rosa	blu rosa	blu rosa	blu rosa	blu rosa
PEO - Hb	+++	+++	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Sudan nero B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
PAS	---	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+++
PAS dopo amilasi	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Alcian-blu	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Blu-toluidina	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Safranina	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bromofenolo-blu	++	+	+	---	---	---	+++	---	---	---	---	---
Fast-green	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ATPasi	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
NCP	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ALP	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ALE	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
PEO sec. Graham	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Pironina sec. Brachet	++	+	+	---	---	---	---	---	---	---	---	---

LEGENDA

Er.bas.: eritroblasti basofili; Er.ac.: eritroblasti acidofili; Er.mat.: eritrociti maturi; Gr.: granulociti; f.: fondo citoplasmatico; gr.: granuli;
M.G.G.: May Grünwald-Giemsa; PEO-Hb, perossidasi sec. Lepehne; ATPasi: adenosintrifosfatasi; NCP: fosfatasi acida; ALP: fosfatasi alcalina; ALE: alie
sterasi; PEO: perossidasi.

visibile il nucleolo. Le finissime granulazioni sono debolmente positive al PAS ed alla fosfatasi acida.

I plasmociti (Fig. 6) ($2,64\% \pm 0,59$) hanno forma rotonda o un poco allungata ($15,7 \times 14,05 \mu\text{m}$) con citoplasma azzurro scuro al M.G.G. e con nucleo rotondeggiante, un pò eccentrico con la tipica struttura cromatinica azolle regolari.

I granulociti sono di due tipi, neutrofili ed eosinofili.

Chiamiamo granulociti neutrofili tutti quelli che non sono colorabili col M.G.G. e che risultano intensamente positivi alla aliesterasi. Di questo tipo se ne riconoscono due forme principali: la prima, (Fig. 2 e 3), la più abbondante ($10,91\% \pm 1,93$ nella formula) è caratterizzata dalla presenza di granuli allungati o a forma di chicco di riso che si colorano lievemente in rosa con il M.G.G.. Essi hanno forma rotonda ($18,71 \mu\text{m} \varnothing$) ed il nucleo generalmente intero o lievemente inciso, eccentrico. I granuli presentano positività non marcata al mercurio bromofenolo blu ed all'ATPasi; il citoplasma è invece debolmente positivo al PAS ed alla fosfatasi acida ed ha intensa positività all'aliesterasi.

Il secondo tipo di neutrofilo (Fig. 2), presente in tutti gli animali anche se in piccola quantità ($1,96\% \pm 0,87$), si presenta arrotondato con dimensioni simili al tipo I ma con citoplasma privo dei granuli allungati di colore grigio-celeste con il M.G.G. e con pochi piccoli granuli puntiformi blu-violetto. Il comportamento citochimico è sovrapponibile al tipo I.

I granulociti eosinofili si presentano anch'essi con due aspetti principali: il primo (Fig. 2), il più abbondante ($33,11\% \pm 2,39$) ha forma allungata ($15,96 \times 10,19 \mu\text{m}$), citoplasma scarso, è completamente occupato da piccoli granuli tondi rifrangenti, rosa col M.G.G.; il nucleo è grande, allungato ($11,80 \times 8,80 \mu\text{m}$) con cromatina a piccoli cromocentri e talvolta il nucleolo visibile. Questo tipo di eosinofilo si riscontra in quantità relativamente abbondante in tutti gli animali. I granuli sono positivi al fast green il che rivela la presenza di proteine ricche in arginina (cfr. Zucker-franklin et al. 1981) ed inoltre presentano una debole positività al bromofenolo blu ed una intensa positività all'ATPasi ed il fondo citoplasmatico è debolmente PAS positivo. Il secondo tipo di eosinofili (Fig. 4), è raro ($1,82\% \pm 0,71$), è di forma arrotondata ($\varnothing 16,83 \mu\text{m}$) e presenta il citoplasma ricco di grossi granuli a bastoncino fortemente eosinofili col M.G.G. (giallo-arancio) e rifrangenti; il nucleo è per la maggioranza lobato, talvolta solo con una profonda incisura; non si osserva il nucleolo. Il comportamento citochimico è sovrapponibile a quello del primo tipo con una maggiore positività dei granuli all'ATPasi. Oltre queste due forme principali di eosinofili, sono state osservate in tutti gli animali delle forme intermedie tra le due succitate con nucleo polimorfo, citoplasma abbondante e pieno di piccoli granuli tondi ca

rosa con il M.G.G., come nel primo tipo; queste forme presentano lo stesso comportamento citochimico dei primi due. Non sono state osservate mitosi di alcuno dei tipi di granulociti e perciò si suppone che la varietà di forme riscontrata sia ascrivibile ad un diverso stadio maturativo.

I trombociti (Fig.5) ($7165/\text{mm}^3$), presentano forma allungata ($15,77 \times 9,92 \mu\text{m}$), raramente a fuso; il citoplasma di colore azzurro con il M.G.G., non è molto abbondante e raccolto ai poli della cellula; in esso sono visibili piccole granulazioni PAS positive e lievemente positive all'ATPasi e talvolta con un granulo più grande positivo all'aliesterasi. Il nucleo è allungato ($12,32 \times 7,61 \mu\text{m}$) con grossi cromocentri irregolari per forma e dimensioni e con nucleolo non visibile.

Probabili cellule blastiche

In tutti gli animali e, prevalentemente nei due animali trattati con PHA, sono state riscontrate cellule di tipo blastico riconducibili prevalentemente a tre tipi: Il tipo primo, somigliante all'emocitoblasto umano (Fig.7) è una grossa cellula ($25-30 \mu\text{m}$, circa) con citoplasma intensamente basofilo, blu con il M.G.G. e pironinofilo e con grosso nucleo in cui sono evidenti più nucleoli. Il secondo tipo di cellula blastica somiglia al linfoblasto umano: è piccolo con citoplasma intensamente basofilo, blu con il M.G.G. e grosso nucleo che occupa quasi tutta la cellula, a struttura cromatinica non a reticolo. Il terzo tipo di cellula blastica, più raro, non è facilmente classificabile: presenta citoplasma intensamente basofilo e piccole granulazioni rotonde talvolta di colore rosa col M.G.G.; per il suo aspetto sarebbe omologabile al mielocita dei Mammiferi pur essendo improprio tale termine in animali privi di midollo.

Discussione e conclusioni

Per la serie rossa si può ritenere abbastanza sicuro il riconoscimento degli eritroblasti basofili e di quelli acidofili, anche in base al maggior contenuto in ribonucleoproteine dei basofili, nonché per le mitosi presenti tra loro; per cui si può concludere che gli eritrociti diventano completamente maturi in circolo.

Per quanto riguarda i linfociti, plasmociti, monociti e trombociti non vi sono diversità né di aspetto né di comportamento citochimico rispetto a quelli delle torpedini (Pica et al. 1983; Grimaldi et al. 1983) né delle razze (D'Ippolito et al. 1983) ed i dati numerici concordano anche con le altre specie di *Scyllium* (Morrow e Pulsford 1980).

Per quanto riguarda i granulociti, l'osservazione di più aspetti sia per i neutrofili che per gli eosinofili è nuova rispetto alle due specie di Elasmobranchi ora citate, ma concorda con quanto osservato da Fänge et al. (1983) negli organi linfomioidi di *Scyllium caniculain* in cui sono presenti due tipi principali di eosinofili e numerose forme immature. Questa osservazione porta a ritenere che la maturazione di tali granulociti avviene in circolo, mentre Fänge et al. (1983) so

stengono che i granulociti passano nel sangue a maturazione completa. La presenza del secondo tipo di neutrofilo con citoplasma groglio, contenente piccoli granuli azzurrofilo potrebbe essere dovuta ad uno svuotamento dei granuli a chicco di riso del tipo I. Granulociti neutrofilo degranulati sono stati descritti, infatti, anche da Fänge et al. (1983) e tali AA. ipotizzano il loro svuotamento in circolo.

In conclusione si ritiene che altre indagini citochimiche siano necessarie per meglio caratterizzare sia le forme immature blastiche sia le forme immature dei granulociti del sangue circolante e degli organi emolinfopoietici per meglio comprendere il ciclo vitale di tali cellule. Resta molto probabile la netta separazione tra neutrofilo ed eosinofilo, non solo per i caratteri morfologici e tinctoriali ma soprattutto per i risultati con il metodo all'ATPasi e con quello al Fast green entrambi positivi soltanto negli eosinofili come nelle torpedini (cfr. Grimaldi et al., 1983) e per lontana omologia anche nell'uomo (cfr. Heller, 1972).

BIBLIOGRAFIA

- D'IPPOLITO S., PICA A., GRIMALDI M.C., DELLA CORTE F.: I valori ematologici e le cellule del sangue delle razze. Arch. Ital. di Anat. ed Embr., in stampa, 1983.
- DREZWINA A.: Contribution a l'étude des leucocytes granuleux du sang des poissons. Arch. Anat. Micr., 13, 319-376, 1911.
- FANGE R.: The formation of eosinophilic granulocytes in the oesophageal lymphomyeloid tissue of the elasmobranchs. Acta Zool (Stokolm), 49, 156-161, 1968.
- FANGE R., LUNDBLAD G., SLETTENGREN K. and LIND J.: Glycosidases in lymphomyeloid (hematopoietic) tissues of elasmobranchs fish. Comp. Biochem. Physiol., 67B, 527-532, 1980.
- FANGE R., PULSFORD A.: Structural studies on lymphomyeloid tissues of the dogfish, Scyliorhinus canicula L.. Cell. Tissue Res., 230, 337-351, 1983.
- FEY F.: Hämatologische Untersuchungen der blutbildenden Gewebe niederer Wirbeltiere. Folia Haematol., 84, 122-146, 1965.
- GERZELI G.: Osservazioni d'istochimica comparata: i polissaccaridi negli elementi ematici circolanti dei Vertebrati inferiori. Arch. Zool. Ital., 39, 1-16, 1954.
- GRIMALDI M.C., D'IPPOLITO S., PICA A., DELLA CORTE F.: Cytochemical identification of the leukocytes of torpedoes (Torpedo marmorata Risso and Torpedo ocellata Rafinesque). Basic and applied Histochemistry, in stampa, 1983.
- HELLER A.: Zytochemische Diagnostik in der Klinischen Hämатologie., Thieme Verlag Stuttgart, 1979.
- JOHANSSON - SJÖBECK M.L., STEVENS J.D.: Haematological studies on the blue shark Prionace glauca L.. J. Mar. Biol. Ass. U. K., 56, 237-240, 1976.
- LILLIE R. D.: Histopathologic technique and Practical Histochemistry. Mc Graw Hill book Company, New York, Toronto, Sydney, London, 1965.
- MATTISSON A., FANGE R.: The cellular structure of the Leydig organ in the shark, Etmopterus spinax (L). Biol. Bull., 162, 182-194, 1982.
- MORROW W.J.W., PULSFORD A.: Identification of peripheral blood leucocytes of the dogfish (Scyliorhinus canicula L.) by electron microscopy. J. Fish Biol., 17, 461-475, 1980.
- PEARSE A.C.E.: Histochemistry theoretical and applied. Vol. I°, Churchill, Edinburg and London, 1968.
- PICA A., GRIMALDI M.C., DELLA CORTE F.: The circulating blood cells of Torpedoes (Torpedo marmorata Risso and Torpedo ocellata Rafinesque). Mon. Zool., 17(4), in stampa, 1983.
- UNDRITZ E.: Planches d'Hématologie. Sandoz Ltd Basel, 1980.
- ZUCKER - FRANKLIN, GRAVES M.F., GROSS C.E., MARMONT A.M.: Le cellule del sangue funzioni e patologia. Atlante. Ermes, Milano, 1981.

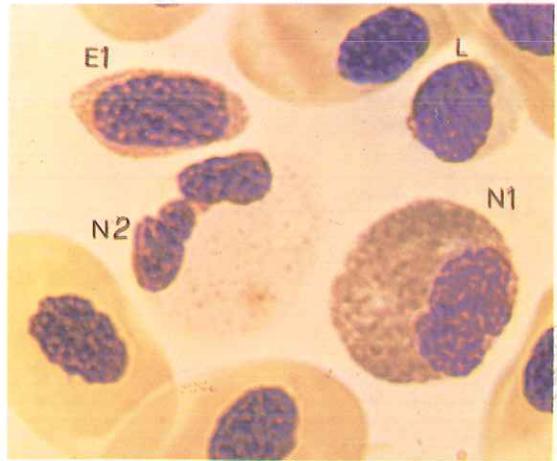
La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci G. Ghiara, M. De Vincentis, G. Chieffi.

28 CELLULE DEL SANGUE DI SCYLIORHYNUS STELLARIS L.

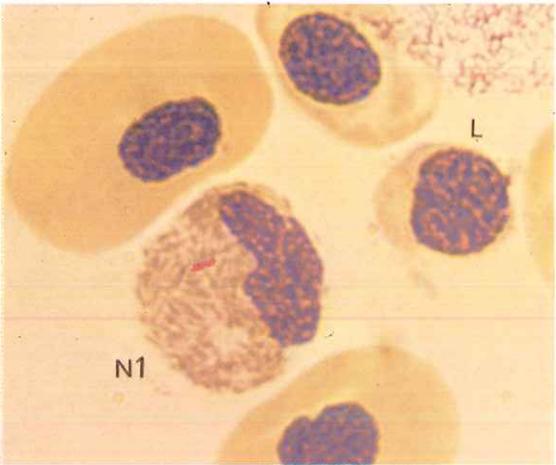
- FIG.1 : Metodo per l'emoglobina. Eb : eritroblasto basofilo; Ea : eritroblasto acidofilo ed eritrociti maturi.
- FIG.2 : Metodo M.G.G..N1 : granulocita neutrofilo tipo 1; N2 : granulocita neutrofilo tipo 2; E1 : granulocita eosinofilo tipo 1; L : linfocita.
- FIG.3 : Metodo M.G.G.. N1 : granulocita neutrofilo tipo 1. L : linfocita.
- FIG.4 : Metodo per l'ATPasi.N1 : granulocita neutrofilo tipo 1 positivo; E2 : granulocita eosinofilo tipo 2 negativo.
- FIG.5 : Metodo M.G.G.. Granulocita eosinofilo tipo 2.
- FIG.6 : Metodo per l'ATPasi.Granulocita eosinofilo tipo 1 positivo.
- FIG.7 : Metodo M.G.G.. Linfocita.
- FIG.8 : Metodo per l'emoglobina. Plasmocita.



1



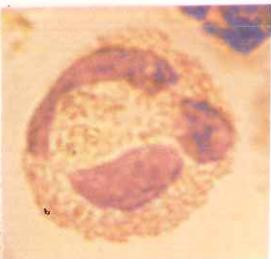
2



3



4



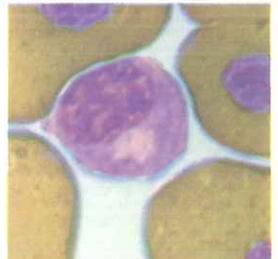
5



6



7



8

COMPARATIVE ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF ESTERASE MOLECULAR FORMS
IN THE DIGESTIVE GLAND OF SOME VENERIDS (MOLLUSCA: BIVALVIA).

Nota di ORFEO PICARIELLO e MARINA PAOLUCCI (*)

Presentata dal Socio Ordinario Giovanni Chieffi.

Adunanza del 23 luglio 1983

RIASSUNTO

Sono state esaminate le forme multiple molecolari dell'enzima α -naftilesterasi nella ghiandola digestiva dei seguenti Bivalvi: Venus verrucosa, Callista chione, Tapes decussatus, Venerupis aurea e Chamaelea gallina, mediante isoelettrofocusing su strato sottile. Si ritiene che in queste specie siano presenti forme multiple molecolari di tipo carbossilesterasico, arilesterasico e colinesterasico in base alla loro sensibilità differenziale nei confronti dei diversi inibitori. Solo in V. aurea non sono state evidenziate arilesterasi.

Da un'analisi comparativa dei patterns elettroforetici delle singole specie si evince che alcune forme molecolari esterasiche hanno punti isoelettrici simili, altre possiedono anche un comportamento simile nei confronti degli inibitori. Da questo punto di vista vengono discusse le possibili affinità filogenetiche tra dette specie.

ABSTRACT

The esterase molecular forms in the digestive gland of the Bivalves Venus verrucosa, Callista chione, Tapes decussatus, Venerupis aurea and Chamaelea gallina were examined by thin-layer electrofocusing. The sensibility to various inhibitors allows the hypothesis that in these species there are carboxylesterase, arylesterase-, and cholinesterase-like molecular forms, except for V. aurea, where arylesterases are lacking.

A comparative analysis of the species patterns shows that some esterase molecular forms have similar isoelectric points, while some have also similar sensibility to inhibitors. On this base, both possible phylogenetic affinities among these species are discussed.

INTRODUCTION

Among the Bivalvia, Venerids represent an important and species rich family of worldwide distribution. They are generally found in sandy bottoms of the infralittoral zone (Purchon, 1978). The systematic affinities among the various subfamilies are not completely clear, though they began to diverge simultaneously in the late mesozoic (Moore, 1969). So far the characters considered for taxonomic purposes are exclusively morphological, mainly the shape and structure of the shell (Malatesta, 1974).

To our knowledge, enzymological studies on the internal organs are not available, while, in other groups, they have significantly contributed to the know-

(*) Istituto e Museo di Zoologia, Facoltà di Scienze Università di Napoli,
Via Mezzocannone, 8, 80134 Napoli, Italia.

ledge of phylogenetic affinities in many animal and plant phyla.

The scope of this paper is to study the electrophoretic pattern of the esterases extracted from various tissues of several species belonging to different subfamilies of Venerids. In fact, investigations carried out both on invertebrates and vertebrates, show that the molecular forms of this complex enzyme have, within certain limits, a similar pattern in related species. These affinities allowed some authors to suggest possible phylogenetic trees (Moss, 1979; Markert and Moller, 1959; Masters and Holmes, 1974).

MATERIALS AND METHODS

Animals: Adult, sexually mature specimens of the Venerids Venus (Venus) verrucosa L., Callista (Callista) chione L., Tapes (Ruditapes) decussatus L., Venerupis (Venerupis) aurea Gmelin, Chamaelea (Chamaelea) gallina L., were collected in the gulf of Naples and kept for 72 h in aquaria with running sea water at about 15°C. The foot, the mantle, the digestive gland and the gonads were separated from groups of 15 specimens for each species. Each organ was individually homogenized in distilled water (100 mg fresh tissue/ml). The homogenates were then centrifuged at 4°C and 100.000 g for 1h. The supernatants were then diluted in order to obtain an identical final concentration of proteins (5mg/ml) previously determined according to Lowry et al. (1951). Aliquots of supernatants thus obtained were utilized for esterase separation by means of isoelectrofocusing.

Thin-layer electrofocusing: Isoelectrofocusing was carried out according to Bours (1971) on thin-layer plates (16x23 cm; 1.5mm in thickness). The gel of 5% acrylamide contained 2% ampholine carrier (LKB, Sweden). Three ampholine having respectively 3.5-5, 5-7, 7-9 pH ranges, were mixed in equal proportions to get the 3.5-9.0 pH range.

Samples (20 ul of supernatants) were adsorbed on fiberglass paper rectangles (3x10 mm, Whatman GF/A) and applied on the gels. The distance between the electrodes was 8 cm. Isoelectric focusing was run for 16h at 4°C, with a constant potential difference of 100 V and an initial current of 6 mA decreasing to 0.9 mA at the end of each run. After each experiment the pH gradient was measured on the plates using a Beckman flat membrane electrode (cod. N. 39507). In any case, a solution containing 12 proteins with known isoelectric point (pI) and in the range of 3-10 was run in parallel with the samples (Isoelectric focusing calibration kit, Pharmacia, Sweden). Sample migration on the plates resulted congruent with the pH values determined (by means of the electrode) and with the pI of these proteins. Before incubation, the plates were dipped for 10 min at 37°C in 8 mM Tris-HCl buffer pH 7.4, to eliminate the ampholines and then incubated for 30 min. at 37°C in a medium formed by 8 mM Tris-HCl contain-

ning 0.003% fast blue RR salt and 0.002% substratum (o-naphtylacetate) predissolved in a small amount of acetone. After incubation the gels were rinsed in running tap water and then fixed in 5% methanol in water. When inhibitors were used, they were dissolved both in the rinsing and incubation media. The inhibitors utilized were the following organophosphoric compounds: diisopropylfluorophosphate (DFP) $10^{-4}M$, diethyl p-nitrophenylphosphate (E 600) $10^{-4}M$, as well as eserine $10^{-5}M$.

RESULTS

Among the various tested tissues, the enzyme is present mainly in the digestive gland and, in a limited amount, in the gonads. The digestive gland is a good source of esterases which, by electrofocusing, gives a pattern composed of a discrete number of molecular forms. The results obtained from the digestive gland of the different species are summarized in Tab. 1.

Chamaelea gallina. Esterases resolved always into five molecular forms with the following pI: 5.8, 6.0, 6.2, 6.6, 7.0 respectively. Three of them are inhibited by DFP and by E 600 (pI: 5.8, 6.0, 7.0), but not by eserine, and hence, according to the classification of Masters and Holmes (1974), they should be considered as carboxylesterases. The molecular form with 6.2 pI is inhibited by DFP, but not by the other two inhibitors, therefore it can be considered as arylesterase. Finally, the molecular form with 6.6 pI, resistant to the three inhibitors, is to be considered as a cholinesterase.

Venus verrucosa. Esterases have a typical pattern composed by seven molecular forms with the following pI: 5.4, 6.0, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.8. Among them, only the molecular form with 5.4 pI corresponds to a carboxylesterase. The molecular forms with 6.4 and 7.0 pI appear as arylesterases, whereas the remaining four (pI: 6.0, 6.6, 6.8, 7.8) could be cholinesterases.

Callista chione. There are eight molecular forms with the following pI: 5.8, 6.0, 6.2, 6.4, 7.0, 7.2, 7.6, 7.9 respectively. Four appear as carboxylesterases (pI: 6.4, 7.2, 7.6, 7.9); two as arylesterases (pI: 5.8, 6.0) and two as cholinesterases (pI: 6.2, 7.0).

Tapes decussatus. Eight molecular forms are present with the following pI: 5.8, 6.0, 6.2, 6.4, 6.8, 7.6, 7.8, 7.9. One would be an arylesterase (5.8 pI), two cholinesterases (pI: 6.4, 6.8), the others being carboxylesterases.

Venerupis aurea. The typical electrophoretic pattern shows eight molecular forms with the following pI: 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.6, 7.8. Four (pI: 6.2, 6.6, 7.2, 7.6) are carboxylesterases, while the other four (pI: 6.4, 6.8, 7.0, 7.8) are cholinesterases. In this species no arylesterases were observed.

DISCUSSION

The investigation on the esterases of some Venerids from the gulf of Naples shows that this enzyme is present mostly in the digestive gland and re-soleves, by electrofocusing, into several molecular forms differing both in pI and in their possible physiological characteristics according to species (Tab. 1). A comparative analysis of the data is hampered by the fact that molecular forms with similar pI in the different species very often have a different sensibility to the tested inhibitors and, therefore, differ from each other in their possible physiological role. As a first instance, if one takes into account only the pI of the various molecular forms, a greater similarity can be observed between the patterns of C. chione and T. decussatus. V. aurea, in turn, shows several molecular forms (five) with a pI similar to that of T. decussatus, C. chione and V. verrucosa. The similarities between the patterns of C. gallina and of the remaining species are, on the contrary, less marked. It must be pointed out that the systematic implications of our results are only indicative, since more enzyme forms should be investigated to get enough informations of a phylogenetic tree.

Keeping in mind these limitations some observations can be drawn. Our data do not completely agree with what is reported in literature about the affinities established among the different species on the basis of shell morphology. In fact, according to our results there is an affinity between T. decussatus and C. chione, despite morphological considerations have placed them in different subfamilies. The same is true for the remarkable biochemical affinities among V. aurea, C. chione, and V. verrucosa. This can be explained by the consideration that the esterases of the digestive apparatus have different patterns according to the animal dietary habits, which probably influences the various molecular forms and, particularly, their catalitical functions (Oxford and Fish, 1979; Bunting and van Embden, 1981). This could also explain the observations that, in unrelated species, enzymatic molecular forms with similar pI seem to have different functions.

Correlating the pI of esterases with their sensibility to different inhibitors, it is possible to suggest other affinity patterns. In fact according to our data V. aurea and T. decussatus (subfamily Tapetinae) have four common molecular forms (carboxylesterases with pI: 6.2, 6.4, 7.4, 7.6). V. aurea and C. chione have also three common molecular forms of carboxylesterases (pI: 7.0, 7.2, 7.6), whereas C. chione and T. decussatus possess three other common molecular forms of carboxylesterases (pI: 5.8, 7.6, 7.8). Unfortunately, on the base of available information, although the species investigated live in very similar environments, very little is known about their feeding habits and digestive mechanisms. Therefore, conclusions on the functional role of the esterases

present in the digestive apparatus are extremely difficult to draw.

V. aurea and T. decussatus, both belonging to the subfamily of the Tapetinae, show stricter affinities. They also form mixed populations in the same environment (Ansell, 1961). In fact, up to recently, Tapes and Venerupis were considered congeneric.

As far as phylogenetic affinities among Venerids are concerned, Ansell (1961), on the basis of physiological and morphological considerations, regards Callista as a less specialized genus, and Venus and Venerupis as more specialized ones and of more recent origin. According to our observations, there is a strict affinity, from the biochemical point of view, between the two subfamilies of Pitarinae and Tapetinae.

Moreover, our observations agree with present views about the phylogenesis of Venerids, i.e. that the subfamily of the Pitarinae and that of the Tapetinae diverged rather early from the family of Venerids in the lower Cretaceous (Moore, 1969).

Our results do not entirely fit with the views of Ansell (1961), as V. verrucosa shows a pattern rather different from those of V. aurea and T. decussatus. Nevertheless, this biochemical difference between V. verrucosa on one side and V. aurea and T. decussatus on the other, might not reflect true phylogenetic affinities between Venerinae and Tapetinae.

According to Purchon (1978), there are among Lamellibranchs different mechanisms of ciliary sorting and of rejection of certain types of food particles. If this variety of feeding mechanisms applies also to our material, then it might contribute to explain the observed different patterns of esterase enzymes.

Acknowledgements. We thank Prof. V. Botte and the colleague G.C. Carrada for helpful discussion, and Dr. A.M. Cirillo for English translation of the manuscript.

REFERENCES

- Ansell, A.D., 1961. The functional morphology of the British species of Veneracea (Eulamellibranchia). J. Mar. Biol. Ass. U.K. 41: 489-515.
- Bours, J., 1971. Isoelectric focusing of lens crystallins in thin-layer polyacrylamide gels. A method for detection of soluble proteins in eye lens extracts. J. Chromatogr. 60: 225-233.
- Bounting, S. and van Embden, H.F., 1981. The effect of conventional and artificial diet on esterase band pattern in Myzus persicae (Sulzer). Experientia 37: 220-221.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Malatesta, A., 1974. Malacofauna pliocenica umbra. Memorie carta geologica d'I

- talia, Pinto Ed., Roma, Vol. 13, 498 pp. + 32 tavv.
- Markert, C.L. and Moller, F., 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic and species specific patterns. Proc. Natn. Acad. Sci. USA 45:753-763.
- Masters, C.J. and Holmes, R.S., 1974. Isoenzymes, multiple enzyme forms and phylogeny. In: Advances in comparative physiology, Vol. 5, pp.140-153. Editor: O. Lowenstein, Academic press, New York.
- Moore, R.C., 1969. Treatise on invertebrate paleontology. Part N, Mollusca, Vol. 6, Bivalvia, N.2. The geological society of America Inc., and University of Kansas, 952 pp.
- Moss, D.W., 1979. Isoenzyme analysis. Analitical science monographs. The chemical society, London, 163 pp.
- Oxford, G.S. and Fish, L.J., 1979. Ultrastructural localization of esterase and acid phosphatase in digestive gland cells of fed and starved Cepaea nemoralis (L.) (Mollusca: Helicidae). Protoplasma 101:181-196.
- Purchon, R.D., 1978. The biology of the Mollusca. Pergamon press, Oxford, 560pp.

La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci V. Leone, M. De Vincentis, G. Chieffi

Species examined

Electrofocusing pH gradient	Venerupis aurea			Tapes decussatus			Callista chione			Venus verrucosa			Chamelea gallina		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
7.9				+	+	o									
7.8	+	+	+	+	+	o									
7.6	+	+	o	+	+	o									
7.4															
7.2	+	+	o				+	+	o						
7.0	+	+	+				+	+	+						
6.8	+	+	+	+	+	+									
6.6	+	+	o												
6.4	+	+	+	+	+	+									
6.2	+	+	o	+	+	o									
6.0				+	+	o									
5.8				+	+	o									
5.6				+	+	o									
5.4															

Table 1 . Sensitivity of the esterase molecular forms of the digestive gland to three inhibitors in some Venerids. The resolution of the molecular forms was obtained by means of electrofocusing. a: DPP; b: E 600; c: eserine. Molecular forms are: + = inhibited; o = present.

STUDIES ON RIBONUCLEASES FROM HeLa CELLS NUCLEI

Nota di Piera Quesada¹, Gianfranco Pontarelli²,
Antonio Meduri³, Marcello Merola¹ e Benedetta Farina¹

Presentata dal Socio Ordinario Vincenzo Leone

Adunanza del 23 Luglio 1983

RIASSUNTO

E' stato elaborato un metodo di purificazione che consente di isolare RNAasi e poli(ADPR) sintetasi da nuclei di cellule HeLa. E' stato dimostrato che la poli(ADPR)sintetasi così purificata è in grado di ADP-ribosilare RNAasi in vitro. Dopo incubazione di nuclei con ¹⁴C-NAD si osserva una inattivazione della RNAasi endogena e questa, dopo purificazione del miscuglio di incubazione, risulta ADP-ribosilata.

SUMMARY

A procedure has been worked out for the purification of RNAase and poly(ADPR)synthetase from HeLa cells nuclei. It has been shown that the purified poly(ADPR)synthetase is able to effect in vitro ADP-ribosylation of RNAases. Following incubation of nuclei with ¹⁴C-NAD an inactivation of endogenous RNAase is observed, and after purification from the incubation mixture the RNAase is shown to be ADP-ribosylated.

INTRODUCTION

Among the mechanisms of covalent modification of proteins, such as methylation and phosphorylation, is included the ADP-ribosylation reaction (1), catalysed by poly(ADPR)synthetase, an enzyme which adds ADPR units, removed from NAD⁺, to a variety of acceptor proteins, with formation of a homopolymer (2-4). Its activity has been correlated with a number of cellular functions, such as DNA synthesis (5), DNA repair (6), gene expression (7).

It has been shown that the major acceptors of ADPR residues are nuclear chromosomal proteins, both histone (8) and non-histone (9) proteins. A special interest is presented when the ADPR acceptor protein is an enzyme molecule, given the possibility of implications of a regulation of activity following its chemical modifications. An example of such a situation is Elongation Factor 2 (EF-2) which is inhibited following ADP-ribosylation by fragment A of diphtheria toxin, which is endowed with poly(ADPR)synthetase activity; as a result, protein synthesis is blocked (10). Recent reports on activation of DNA ligase II by ADP-ribosylation, in L 1210

¹Istituto di Chimica Organica e Biologica, Via Mezzocannone 16 - 80134 Napoli

²Istituto di Biochimica Cellulare e Molecolare, Via Pansini 5 - 80131 Napoli

³Cattedra di Biochimica della Facoltà di Medicina Veterinaria, Via Delpino 1 - 80137 Napoli.

mouse cells (11), appear to give more favour to the hypothesis of ADP-ribosylation being implicated in DNA repair. A Ca^{2+} , Mg^{2+} -dependent endonuclease from rat liver nuclei has also been reported to be inhibited, *in vitro*, by ADP-ribosylation; this mechanism could be connected with a possible control of DNA synthesis (12).

Research in our laboratory has shown that incubation of some RNAases (bovine pancreatic RNAase A, seminal RNAase, etc.) with poly(ADPR)synthetase and NAD^+ leads to ADP-ribosylation of the nucleases and to their partial inactivation (13). Similar results have been obtained on incubation of intact nuclei of bull seminal vesicles (where an appreciable level of both RNAase and poly(ADPR)synthetase exists) with $^{14}\text{C-NAD}^+$; ADP-ribosylated RNAase was isolated and characterised.

A number of authors have linked, both in prokaryotes and in eukaryotes, the activity of some RNAases to the phenomenon of maturation, inside the nucleus, of cytoplasmic RNA's precursors (14-16). Saha and Schlessinger have described an RNAase from HeLa cells nuclei which is preferentially active on double stranded RNA, and could be connected with RNA's maturation (17).

Given the observations on the possible modulation of activity of enzymes, nucleases among them, by ADP-ribosylation, we have been led to investigate on the ribonuclease(s) of HeLa cells nuclei. The results of our studies are the object of this communication.

MATERIALS AND METHODS

Nicotinamide ($\text{U-}^{14}\text{C}$)-adenine dinucleotide (280 mCi/mMole) was obtained from the Radiochemical Center, Amersham. UTP-agarose, pancreatic RNAase A, dithiothreitol (DTT), phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF), cytidine 2',3'-cyclic monophosphate, adenosine 5'-diphospho-ribose (ADPR), were products of Sigma. Hydroxyapatite was from Biorad and polyA-polyU from Miles Laboratory. Silica gel plates, cm 20x20, were purchased from Merck, Darmstadt.

HeLa S-3 cells were grown asynchronously at 37°C using as a culture medium Eagle Media plus newborn calf serum of Flow laboratories.

Purification of the native nuclear RNAase was effected starting from 315×10^6 cells. Nuclei were prepared according to Saha and Schlessinger (17); RNAase and poly(ADPR)synthetase were extracted, starting from homogenisation (Potter) for 30 sec at top speed in the presence of 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 containing 10 mM EDTA, 14 mM β -mercaptoethanol, 5 mM NaF, 0.2 mM PMSF, 10% glycerol (Buffer A) plus 0.5 M KCl. After centrifugation at 18,000 rpm for 60 min, the supernatant was taken to a column of hydroxyapatite; elution was effected first by Buffer A which was followed by a solution (Buffer B) composed of 0.5 M K phosphate pH 7.5 containing 14 mM β -mercaptoethanol, 5 mM NaF, 0.2 mM PMSF, 10% glycerol, with addition of 0.5 M HCl. RNAase elution from the affinity chromatography column of UTP-agarose was effected, after a first elution with 0.025 M piperazine-HCl buffer pH 5.3, by 0.25 M Na phosphate buffer pH 5.25.

RNAase activity was determined by the procedure of Shortman (18) or Kunitz (19) with yeast RNA as a substrate, by the procedure of Richards (20) with cyclic CMP, and by the procedure of Floridi (21) with polyA-polyU. In the course of purification RNAase was assayed by the method of Shortman (18). Protein content was estimated according to Bensodoun (22). Poly(ADPR)synthetase was determined in a reaction mixture containing 80 mM Tris-HCl buffer pH 8.0, 8 mM DTT,

16 mM $MgCl_2$, 1.5 μ l ^{14}C -NAD and a given amount of enzyme (5-10 μ l) in a total volume of 125 μ l. Incubation was effected at 25°C for 5 min and was terminated by precipitation with 25% TCA (v/v). Enzymatic activity was measured on the basis of radioactivity incorporated into the TCA-precipitable fraction, measured with a Beckman LS 8100 liquid scintillation spectrometer. One unit of enzyme is taken as the incorporation of 1 nmole NAD^+ into the TCA-insoluble fraction in one min at 25°C. For convenience, activity is expressed as mU.

When incubation was effected with varying concentrations of RNAase A, the same conditions as above were followed, with addition of a constant amount (0.47 mU) of poly(ADPR)synthetase partially purified on hydroxyapatite.

When poly(ADPR)synthetase and RNAase activities were studied as a function of time, intact nuclei from 220×10^6 cells were utilised. The incubation mixture was effected following the conditions described for determination of poly(ADPR)synthetase activity, in the presence of 4.18 nmoles ^{14}C -NAD⁺ and in a final volume of 11 ml. At the chosen times definite samples were withdrawn from the incubation mixture and after a quick homogenization (Potter), an aliquot (20 μ l) was utilised for determination of radioactivity into the TCA-precipitable fraction; on another aliquot (300 μ l) RNAase activity was measured according to Shortman (18) with yeast RNA as a substrate.

For isolation and purification of ADP-ribosylated RNAase, 146×10^6 cells were utilised. The isolated nuclei were incubated with ^{14}C -NAD in the same conditions as above, and purification was performed according to the procedure followed for the native enzyme.

Thin-layer chromatography on silica-gel of ADP-ribosylated RNAase was performed analysing an aliquot (4000 cpm) eluted from UTP-agarose after incubation in 0.1 N KOH for 2 hrs at 0°C, utilising a solvent composed of isobutyric acid, NH_4OH : H_2O (66:1:33).

RESULTS

1. RNAase purification from HeLa cells nuclei.

Extraction of nuclei from 315×10^6 cells by 0.5 M KCl has afforded an almost quantitative recovery both of RNAase (0.37 U; 6.10^{-3} U/mg) and poly(ADPR)synthetase (386 mU; 6.43 mU/mg) activities of nuclei. Application of the 0.5 M KCl extract on a column of hydroxyapatite followed elution by buffer A (see under Materials and Methods) resulted in an RNAase peak (0.37 U; 7.10^{-3} U/mg) excluded at the V_0 value, while on elution with buffer B another peak was obtained, containing poly(ADPR)synthetase (283 mU, 52 mU/mg) in a partially purified state (Fig. 1).

The RNAase peak was further purified by affinity chromatography on UTP-agarose; elution with phosphate buffer yielded a peak which contained more than 90% of enzyme originally present in the nuclei (Fig. 2), more than 100 times purified.

2. Substrate specificity of RNAase

The Table shows the results obtained when the RNAase fraction eluted from UTP-agarose is assayed with yeast RNA, cyclic cytidylic acid or polyA-polyU as substrates in separate experiments. From these results the enzyme appears to exhibit a preferential activity on the cyclic nucleotide and the double-stranded substrate, which are followed, at a much lower level, by yeast RNA.

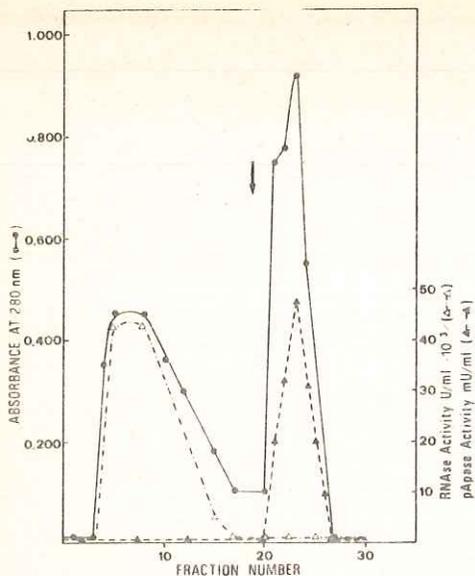


Fig. 1. Hydroxyapatite chromatography on column (cm 2x3) of a 0.5 M KCl extract (60 mg) from HeLa cells nuclei. See under Materials and Methods for the elution procedure. At the arrow, buffer B is substituted for buffer A. Flow rate, 80 ml/hr; 1 ml/fraction; pApase: poly(ADPR)synthetase.

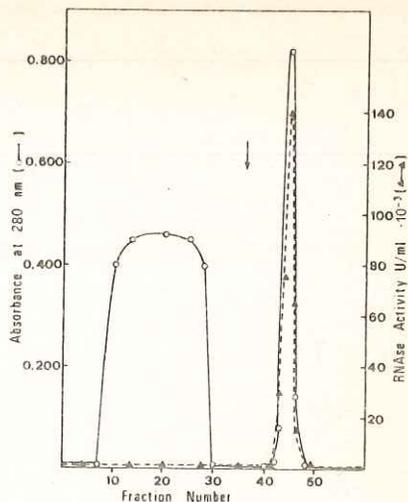


Fig. 2. UTP-agarose affinity chromatography on column (cm 1.0x5) of first peak obtained from hydroxyapatite (mg 54; 0.37 U). See under Materials and Methods for the elution procedure. Change of buffers is indicated by arrow. Flow rate 20 ml/hr; 1 ml/fraction.

Flow diagram of HeLa cells nuclei RNAase and pApase purification.

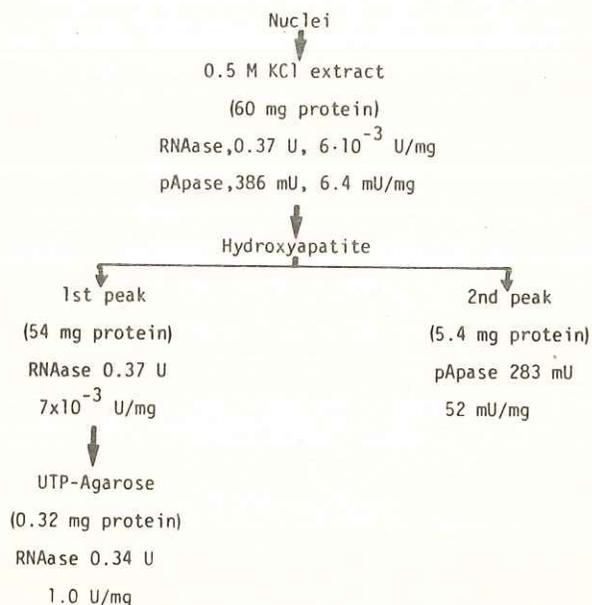


Table - Specific Activity of RNAase from HeLa cells nuclei on different substrates.

Substrate	Specific Activity*
Yeast RNA	0.84
Cyclic 2',3'CMP	3.30
PolyA-polyU	4.16

*For each substrate, activity values are expressed on the basis of specific activity of RNAase A = 100.

3. In vitro ADP-ribosylation of RNAases

For these experiments the poly(ADPR)synthetase partially purified from HeLa cells nuclei (see under Materials and Methods) was utilised, with bovine pancreatic RNAase A which has shown to be, in vitro, a good acceptor of ADPR.

Fig. 3 shows the results obtained with incubation mixtures containing fixed amounts both of poly(ADPR)synthetase and of ^{14}C -NAD, and increasing amounts of RNAase. It can be seen that at low RNAase concentrations no significant increase of ^{14}C -NAD incorporation is observed

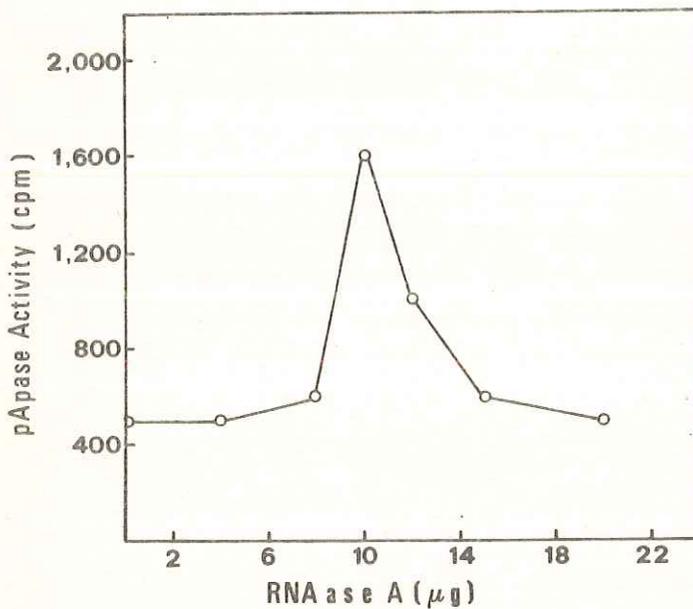


Fig. 3. Poly(ADPR)synthetase activity as a function of increasing concentrations of bovine pancreatic RNAase A.

into the TCA-precipitable fraction, due to ADP-ribosylation; with increasing RNAase A concentrations incorporation results, which reaches a maximum with 10 μ gr RNAase A. On further increase of RNAase concentration, a decline of incorporation results until the starting values are reached. This last phenomenon is probably to explain as an inhibition, by the RNAase itself, of poly(ADPR)synthetase.

4. ADP-ribosylation of endogenous RNAase.

The finding of the presence both of poly(ADPR)synthetase and of RNAase in HeLa cells nuclei has made it possible to make a study on ADP-ribosylation of the endogenous RNAase of such nuclei. Experiments of incubation of isolated, whole nuclei with 14 C-NAD⁺ have been performed, in which labeling of the TCA-precipitable fraction was determined, as well as RNAase activity, as a function of time. Fig.4 shows how a progressive increase of 14 C-NAD⁺ incorporation into the TCA-precipitable is observed with the passing of time, which is accompanied by inhibition of RNAase activity, that is maximal at 10 min incubation (60% inhibition). On further increase of incubation time, while radioactivity incorporation remains almost unchanged, RNAase activity rises to reach again the original values.

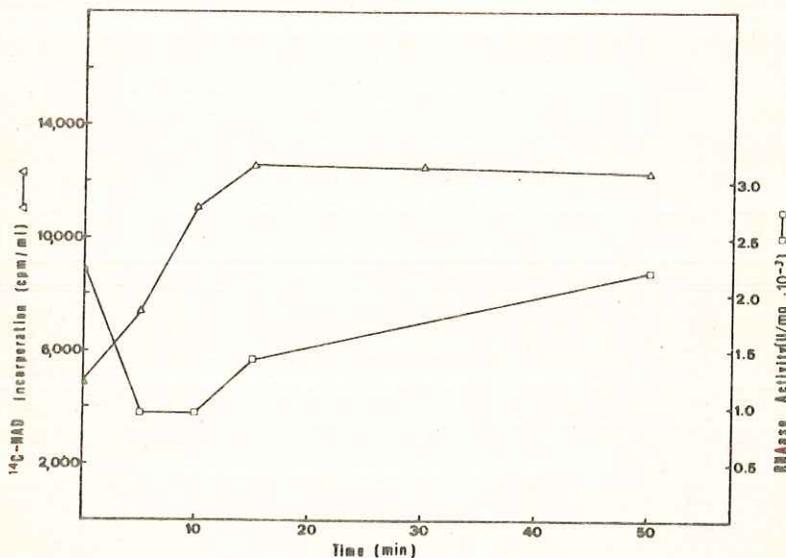


Fig. 4. Time course of RNAase and poly(ADPR)synthetase. Experimental conditions as described under Materials and Methods.

5. Purification and characterization of ADP-ribosylated RNAase.

After incubation of whole, intact nuclei with 14 C-NAD and extraction by 0.5 M KCl (the TCA-precipitable fraction counts 260,000 cpm) the modified RNAase was purified according to the procedure described for the native enzyme.

Affinity chromatography on UTP-agarose yields, at the void volume, a peak to which a high level of radioactivity is bound (204,000 cpm) with no RNAase activity; this is easily explained as given by several nuclear proteins which are known to be ADPR acceptors (e.g., histones). The second peak (0.9 mg protein), which contains RNAase, has a significant radioactivity, 30,800 cpm (Fig. 5).

An aliquot (4,000 cpm) of the RNAase peak was hydrolysed by alkali (see under Materials and Methods); after deproteinisation it was analysed by thin-layer chromatography on silica gel. In this way it was seen that the original radioactivity was localised in correspondence of free ADPR, as shown by the position of standard ADPR, analysed alone and in mixture with the experimental sample. This furnished further evidence that radioactivity of the RNAase peak was due to ADPR, and that the original substance was in fact ADP-ribosylated RNAase.

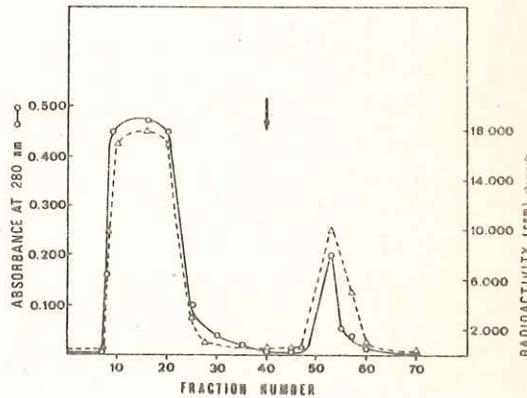


Fig.5. UTP-agarose affinity chromatography on column (cm 1.0 x 5) of the RNAase fraction eluted from hydroxyapatite, from an incubation mixture of nuclei and $^{14}\text{C-NAD}^+$. See under Materials and Methods for the elution procedure. Flow rate, 20 ml/hr - 1 ml/fraction.

CONCLUSIONS

By the purification procedure worked out for RNAase starting from HeLa cells nuclei it has been possible to obtain by hydroxyapatite chromatography, a partially purified preparation of poly(ADPR)synthetase, which was utilised in the ADP-ribosylation experiments.

The RNAase isolated by UTP-agarose affinity chromatography shows a greater affinity for the double-stranded substrate (polyA-polyU) and for the cyclic nucleotide, cCPM, as compared to yeast RNA. On the other hand, the observed inhibition of endogenous RNAase of HeLa cells nuclei by ADP-ribosylation following incubation with NAD^+ , makes it possible to advance the hypothesis that such a mechanism could represent an effective regulatory system for the RNAase activity of nuclei. There are, as already quoted, a number of observations which relate RNAase activities in the eukaryotic nuclei with the process of maturation of the different nuclear RNA precursors, prior to dislocation to the cytoplasm (14,15,16). In particular, much relevance has been given to the existence of RNAases, characterised by a specific affinity for double stranded regions of RNA, such as those occurring in the RNA precursors of nuclei (23).

Saha and Schlessinger have described an RNAase of HeLa cells nuclei, active on double stranded RNA (17), a result which is in line with the properties of the enzyme we obtain from UTP-agarose affinity chromatography. The same authors have furthermore found two different RNAases

in HeLa cells nuclei. Our procedure of purification has not allowed such a differentiation; it is therefore possible that the RNAase we obtain from the affinity chromatography is in fact a mixture of the two RNAases of Saha and Schlessinger. Should such a possibility be verified, it will be interesting to assess whether one or both RNAases are modified by ADP-ribosylation. At any rate, in the present state of our research it appears in our opinion, as already stated, that isolation of an ADP-ribosylated RNAase from HeLa cells nuclei makes it possible to envisage a close correlation between this kind of enzyme modification and relevant nuclear functions, such as RNA maturation.

REFERENCES

- 1 HAYAISHI, O. and UEDA, K., Ann. Rev. Biochem., **46**, 95 (1977).
- 2 CHAMBON, P., WEILL, J.D. and MANDEL, P., Biochem. Biophys. Res. Commun., **11**, 39 (1963).
- 3 NISHIZUKA, Y., UEDA, K., HONJO, T. and HAYAISHI, O., J. Biol. Chem., **243**, 3765 (1968).
- 4 OTAKE, H., MIWA, M., FIJIMURA, S. and SUGIMURA, T., J. Biochem., **65**, 145 (1969).
- 5 BURZIO, L. and KOIDE, S.S., Biochem. Biophys. Res. Commun., **53**, 572 (1973).
- 6 DURKACZ, B.W., OMIDIJI, O. GRAY, D.A. and SHALL, S., Nature, **283**, 593 (1980).
- 7 MULLER, W.E.C. and ZAHN, R.K., Mol. Cell. Biochem., **12**, 147 (1976).
- 8 UEDA, K., OMACHI, A., KAWAICHI, M. and HAYAISHI, O., Proc. Natl. Acad. Sci., **72**, 205 (1975).
- 9 MINAGA, T., ROMASCHIN, A.D., KIRSTEN, E. and KUN, E., J. Biol. Chem., **254**, 9663 (1979).
- 10 HONJO, T., NISHIZUKA, Y., KATO, I. and HAYAISHI, O., J. Biol. Chem., **246**, 4251 (1971).
- 11 CREISSEN, D. and SHALL, S., Nature, **296**, 271 (1982).
- 12 YOSHIHARA, K., TANIGAWA, Y., BURZIO, L. and KOIDE, S.S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 289 (1975).
- 13 LEONE, E., FARINA, B., FARAONE MENNELLA, M.R. and MAURO, A., in "Metabolic Interconversion of Enzymes", H. Holzer ed., Springer-Verlag, Berlin, 294-302 (1981).
- 14 ALTMAN, S., Cell, **23**, 3 (1981).
- 15 KOLE, R., and ALTMAN, S., The Enzymes, **XV**, 469 (1982).
- 16 PERRY, R.P., Ann. Rev. Biochem., **45**, 605 (1976).
- 17 SAHA, B.K. and SCHLESSINGER, D., J. Biol. Chem., **253**, 4537 (1978).
- 18 SHORTMAN, K., Biochem. Biophys. Acta, **51**, 37 (1961).
- 19 KUNITZ, M., J. Biol. Chem., **164**, 563 (1946).
- 20 RICHARDS, F.M., C.R. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim., **29**, 315 (1955).
- 21 FLORIDI, A., D'ALESSIO, G. and LEONE, E., Eur. J. Biochem., **26**, 162 (1972).
- 22 BENSADOUN, A. and WEINSTEIN, D., Anal. Biochem., **70**, 241 (1976).
- 23 PAOLETTI, J., BRUNEL, J.R.C. and JEANTEUR, P., Biochemistry, **19**, 5223 (1980).

La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci G. Chieffi, M. De Vincentis, V. Leone.

MECHANISM OF ADP-RIBOSYLATION OF SEMINAL RIBONUCLEASE

Nota di Piera Quesada, Hisanori Suzuki e Benedetta Farina

Presentata dal Socio Ordinario Vincenzo Leone

Adunanza del 23 Luglio 1983

RIASSUNTO

In presenza di poli(ADPR)sintetasi, è stata osservata in vitro l'ADP-ribosilazione di ribonucleasi di varie specie di mammiferi. Lo spettro u.v. della ADPR-RNAasi seminale bovina, isolata allo stato purificato, mostra caratteristiche nell'assorbimento tipiche della forma modificata dell'enzima. La stabilità del legame ADPR-RNAasi seminale è stata determinata in varie condizioni sperimentali.

SUMMARY

ADP-ribosylation of various mammalian RNAases has been observed in vitro. The u.v. spectrum of ADP-ribosylated seminal RNAase, after extensive purification, shows absorbance characteristics which are typical of the enzyme modified derivative. Stability of the covalent bond between ADP-ribose and seminal RNAase has been determined in a number of experimental conditions.

INTRODUCTION

The importance of ADP-ribosylation reactions, catalysed by poly(ADPR)synthetase, an enzyme with nuclear localization, is widely acknowledged (1). It has been shown that the major ADPR acceptors are nuclear proteins, mainly histones (2-4) and non-histone chromosomal proteins (5,6). Instances are also known, in which the acceptors are represented by enzyme proteins (7,8); these modifications can be the basis of an interesting regulation mechanism of enzyme activity. This has been shown for a Ca^{2+} , Mg^{2+} -dependent endonuclease from rat liver (9) which is inactivated by ADP-ribosylation, an effect which can be connected to a control of DNA synthesis. In the present work ADP-ribosylation of a number of RNAases has been investigated, after incubation of the enzymes with poly(ADPR)synthetase and NAD^+ . An appreciable level of ADP-ribosylation has been found in bull seminal RNAase, an enzyme quite similar to the homologous pancreas RNAase, and which has been subjected to intensive study in this laboratory (10),

Istituto di Chimica Organica e Biologica, Via Mezzocannone 16 -80134 Napoli.

including the determination of amino acid sequence (11). This investigation is part of a research program, aimed at the identification of the amino acid residue(s) directly modified by ADP-ribosylation in seminal RNAase.

MATERIALS AND METHODS

Nicotinamide ($U-^{14}C$)adenine dinucleotide, 280 mCi/mMole, was a product from the Radiochemical Center, Amersham (England). Bovine pancreatic RNAase A (type XII), UTP-Agarose, NAD^+ , calf thymus histones were purchased from Sigma. Sheep and pig pancreatic RNAases were kindly provided, as pure proteins, by Prof. J.J.Beintema, Laboratory of Biochemistry, University of Groningen (The Netherlands). Bull seminal RNAase was generously purified and provided by Dr. R. De Prisco of our laboratory, according to a described procedure (12). The aminoethylated derivative of the monomer from seminal RNAase was prepared according to (13).

Poly(ADPR)synthetase, partially purified from bull testis (fraction from hydroxyapatite), was prepared following the procedure utilised for the same enzyme from HeLa cells nuclei (14). Assay of the enzyme activity was effected in an incubation mixture containing in a final volume of 125 μ l, 80 mM Tris-HCl buffer pH 8.0, 8 mM DTT, 4 mM NaF, 6 μ g calf thymus DNA, 10 μ g calf thymus histones, a mixture of 90 pmoles $^{14}C-NAD^+$ and 12.5 nmoles cold NAD^+ , and a determined amount of enzyme (10-20 μ g protein, in 5-10 μ l). After 5 min at 25°C the reaction is stopped by addition of 125 μ l 25% TCA. Radioactivity of the TCA-precipitated fraction is determined by a liquid scintillation counter Beckman LS 8100. Units of enzyme activity are according to Tsopanakis *et al.* (15); for convenience activity is expressed as milliunits (mU).

Poly(ADP-ribose)synthetase assay in the presence of the various RNAases tested (see Table 1) were performed in the conditions just described, with the addition of 0.4 nmoles RNAase and the omission of histones; incubation was at 25°C for 15 min. The same conditions were also followed for the experiments in which $^{14}C-NAD^+$ incorporation into TCA-insoluble fractions was studied as a function of increasing concentrations (up to 1.8 nmoles) of the various RNAases.

Affinity chromatography on UTP-Agarose was effected using 0.025 M piperazine-HCl buffer pH 7.0 as eluant at the start, with successive substitution for 0.25 M K phosphate buffer pH 7.0. A Cary 118 spectrophotometer was utilised for determination of u.v. spectra of seminal RNAase (1 μ g/ml) and its ADP-ribosylated derivative (1 mg/ml).

For tests on linkages' stability, aliquots of ADPR-RNAase were utilised, previously dialysed and lyophilised, corresponding to 1,000 cpm; the experimental conditions described in the legend to Fig. 3 were followed.

RESULTS

1. *In vitro* ADP-ribosylation of RNAases.

After incubation with poly(ADPR)synthetase partially purified from bull testis (16) and with $^{14}C-NAD^+$, a number of pancreatic RNAases, tested along with bull semen RNAase, have shown to be ADP-ribosylated (Table 1). While for the pancreatic RNAases and for the aminoethylated monomer of seminal RNAase an average value of incorporation corresponding to 0.1 mole ADPR/mole of RNAase is found, for the native, dimeric form of seminal RNAase the same value was

TABLE I
ADP-RIBOSYLATION OF VARIOUS RNAases

	moles ADPR/mole RNAase
<u>Mammalian RNAases</u>	
Bull seminal RNAase	0.38
Bull seminal RNAase monomer	0.10
Bovine pancreatic RNAase(RNAaseA)	0.09
Pig pancreatic RNAase	0.10
Sheep pancreatic RNAase	0.12
<u>Prokaryotic RNAases</u>	
Penicillium brevicompactum, guanyl-specific(pb1)	0
Penicillium brevicompactum, non-specific(pb2)	0
Bacillus intermedius(7P)	0

found to correspond to 0.38 ADP-ribose moles per mole protein. On the contrary, RNAases isolated from some prokaryotes were found inactive as ADP-ribose acceptors in the reaction catalysed by poly(ADP-ribose)synthetase. All of the RNAases investigated were assayed at a concentration of 0.4 nmoles, a value for which maximal incorporation of radioactivity into the TCA-insoluble fraction was found (except for seminal RNAase). Experiments of $^{14}\text{C-NAD}^+$ incorporation as a function of increasing concentrations both of pancreatic RNAase A and seminal RNAase, up to 1.0 nmoles, have confirmed that while pancreatic RNAase reaches maximal ADP-ribosylation at a concentration of about 0.4 nmoles, for seminal RNAase maximal ADP-ribosylation is obtained with about 0.8 nmoles; this was the concentration utilised in the successive experiments.

2. Purification of ADP-ribosylated seminal RNAase.

Following incubation of seminal RNAase, 175 nmoles, with 8 mU of bull testis partially purified poly(ADPR)synthetase and a mixture of $^{14}\text{C-NAD}^+$, 18 nmoles, with cold NAD^+ , 2.5 μmoles , ADP-ribosylated RNAase was isolated by affinity chromatography on UTP-Agarose (Fig. 1). The first peak, eluted from the column at V_0 value, is composed of nuclear proteins (histones and non-histone proteins) present in the poly(ADPR)synthetase preparation, and shows a definite radioactivity, which is distinguished from that associated to the second peak, which is eluted by phosphate buffer, and which is composed by RNAase. It has been calculated that the radioactivity associated to RNAase (40,000 cpm/mg) corresponds to a content of 0.2 moles ADP-ribose per mole RNAase. Some loss of radioactivity was found during the different steps of purification (see Scheme of purification) which is probably due to partial detachment of ADPR from the protein,

notwithstanding the experimental conditions were such as to assure good stability of the ADP-ribose-protein bond.

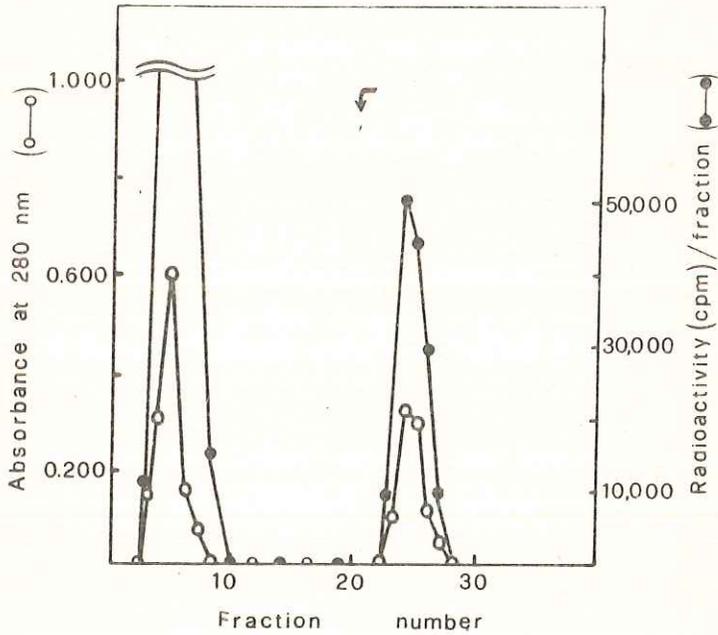


Fig. 1. Affinity chromatography on a column of UTP-Agarose (cm 1 x 5) of ADP-ribosylated seminal RNAase. Where indicated by the arrow, 0.25 M phosphate buffer pH 7.0 was substituted for the starting 0.025 M piperazine-HCl buffer pH 7.0. Flow rate 10 ml/hr; fraction volume, 1 ml.

SCHEME OF PURIFICATION OF ADP-RIBOSYLATED SEMINAL RNAase

SEMINAL RNAase, 5 mg (178 nmoles)

ADP-RIBOSYLATION WITH PADPRS, 8 mU, AND 2.52 μ moles 14 C-NAD⁺ IN 80 mM TRIS-HCl BUFFER pH 7.5, 8 mM DTT AND 4 mM NaF; 30 MIN INCUBATION AT ROOM TEMPERATURE, FOLLOWED BY ADDITION OF 0.75 M NaCl, AND CENTRIFUGATION AT 5,000 g, 15 min.

SUPERNATANT (280,000 cpm)

DIALYSED OVERNIGHT AGAINST 0.025 M PIPERAZINE BUFFER, pH 7.0

AFFINITY CHROMATOGRAPHY ON UTP-AGAROSE COLUMN. AFTER 10 VOLUMES OF PIPERAZINE BUFFER, ELUANT IS CHANGED FOR 250 mM PHOSPHATE BUFFER pH 7.0.

ADP-RIBOSYLATED SEMINAL RNAase, 4 mg (160,000 cpm)

PADPRS: poly(ADPR)synthetase.

3. U.V. spectrum of ADP-ribosylated seminal RNAase.

The presence of ADP-ribose linked to seminal RNAase carries out significant differences in the spectral properties of the modified enzyme in respect to the native protein (Fig. 2).

In fact an increase of absorption is seen between 250 and 270 nm for the ADP-ribosylated enzyme, due to specific contribution by ADPR.

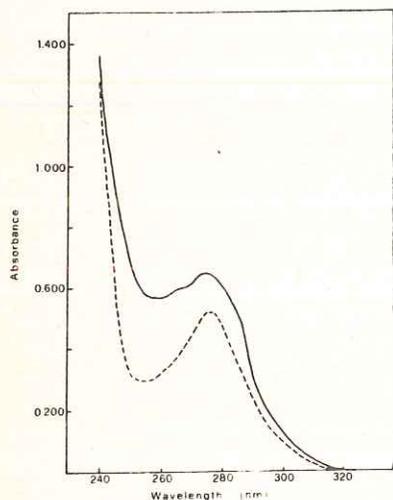


Fig. 2. U.V. absorption spectrum of seminal RNAase (----) and ADP-ribosylated seminal RNAase (—)

4. Stability of the bond between ADP-ribose and seminal RNAase.

The stability was measured in different experimental conditions, as a function of time. As it appears from Fig. 3, while no difference is found in the presence of 0.1 N HCl for the radioactivity associated to TCA-insoluble fractions, at alkaline pH (0.1 N NaOH) such value shows a definite decrease, reaching at 30 min a value which is 50% of the starting value. In the presence of 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.5, after 60 min radioactivity is still

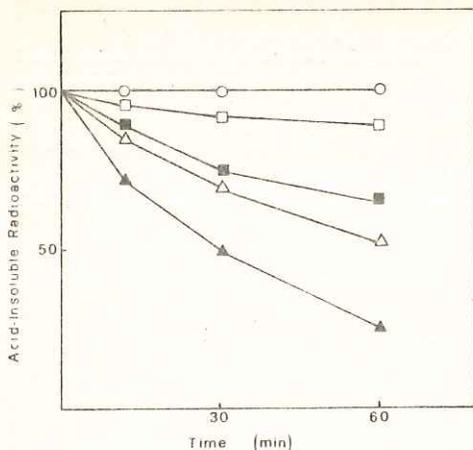


Fig. 3. Stability of the bond ADP-ribose/seminal RNAase, in the presence of 0.1 M HCl (o—o), 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.5 (□—□), 0.1 M Tris-HCl buffer pH 9.6 (■—■), 1.0 M NH₄OH (△—△), 0.1 M NaOH (▲—▲). Incubation at 25°.

merase from T-4 phage infected *E. coli* is so modified, with subsequent inactivation, by covalent linking of ADP-ribose to an arginine residue of the α subunit (8). By the same mechanism diphtheria toxin and *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin modify an histidine derivative, diftamide, present in the elongation factor, EF 2, with resulting inhibition of protein synthesis (17,18). In the field of histones, it has been seen that in rat liver glutamic acid, at its free carboxylic group, is the site of ADP-ribosylation (19,20). The ADP-ribose-glutamate bond is hydroxylamine-labile; since in rat liver both hydroxylamine-labile and -stable bonds have been shown to be present, the hypothesis has been put forward that different kinds of bonds are formed, depending on the different aminoacids (21).

In our laboratory much evidence has accumulated for the inhibition of various pancreatic RNAases and of seminal RNAase, following ADP-ribosylation. At the present state of research, the identification has not been yet reached of the aminoacid residue(s) directly modified by ADP-ribosylation. Since both in seminal RNAase and in pancreatic RNAase A two histidine (12 and 119), one aspartic (14) and one lysine (41) residues are either directly involved in or in a close position to the active site of the enzyme, it is possible that the observed enzyme inhibition be due to ADP-ribosylation of one or more of such aminoacid residues.

ACKNOWLEDGMENT

We wish to express our thanks to Prof. M.Ya. Karpeisky, Institute of Molecular Biology, USSR Academy of Sciences, Moscow, who has made available pure samples of the prokaryotes RNAases listed in Table 1.

90% of the starting value; lower levels are obtained when a Tris-HCl buffer pH 9.6 is utilised. Also hydroxylamine pH 7.0 appears to decrease the stability of the bond between ADP-ribose and seminal RNAase.

CONCLUSIONS

The covalent modification of proteins following the transfer of ADP-ribose units from NAD⁺ to proteins has been shown to represent an interesting mechanism of regulation for cellular activities (1). Although different aminoacids can be specifically responsible of the ADP-ribosylation reaction, it has been seen that poly(ADPR)synthetase frequently catalyses modification of a single type of aminoacid residue. RNA poly-

REFERENCES

- 1 HAYAISHI, O. and UEDA, K., Ann.Rev.Biochem., 46, 95 (1977).
- 2 SMITH, J.A. and STOCKEN, L.A., Biochem. J., 147, 523 (1975).
- 3 UEDA, K., OMACHI, A., KAWAICHI, M. and HAYAISHI, O., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 205 (1975).
- 4 WONG, N.C.W., POIRIER, G.G. and DIXON, G.H., Eur. J. Biochem., 77, 11 (1977).
- 5 LEVY-WILSON, B., Arch. Biochem. Biophys., 208, 528 (1981).
- 6 TANUMA, S. and JOHNSON, G.S., J. Biol. Chem., 258, 4067 (1983).
- 7 COLLIER, R.J. and KANDEL, J., J. Biol. Chem., 246, 1496 (1971).
- 8 GOFF, C.G., J. Biol. Chem., 249, 6181 (1974).
- 9 YOSHIHARA, K., TANIGAWA, Y., BURZIO, L. and KOIDE, S.S., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 289 (1975).
- 10 LEONE, E. and D'ALESSIO, G., Biochem. Soc. Trans., 5, 466 (1977).
- 11 SUZUKI, H., GRECO, L., PARENTE, A., FARINA, B., LA MONTAGNA, R., and LEONE, E., in "Atlas of Protein Sequence and Structure", M.D. Dayoff ed., N.B.R. Foundation, Washington, Vol.5, Suppl.2, p. 93 (1976).
- 12 D'ALESSIO, G., FLORIDI, A., DE PRISCO, R., PIGNERO, A. and LEONE, E., Eur. J. Biochem. 26, 153 (1972).
- 13 PARENTE, A., ALBANESI, D., GARZILLO, A.M. and D'ALESSIO, G., Ital. J. Biochem., 26, 451 (1977).
- 14 QUESADA, P., PONTARELLI, G., MEDURI, A., MEROLA, M. and FARINA, B., Rendic. Accad. Sci. Fis.Nat. Napoli, 51, in press (1984).
- 15 TSOAPANAKIS, C., McLAREN, E.A. and SHALL, S., Biochem. Soc. Trans., 4, 774 (1976).
- 16 FARINA, B., FARAONE MENNELLA, M.R. and LEONE, E., in "Macromolecules in the Functioning Cell", F. Salvatore, G. Marino, P. Volpe eds., Plenum Press, New York, p. 283 (1979).
- 17 PAPPENHEIMER, A.M. Jr., Ann. Rev. Biochem., 46, 69 (1977).
- 18 BODLEY, J.W., VAN NESS, B.G. and HOWARD, J.B., Dev. Cell Biol., 6, 413 (1980).
- 19 RIQUELME, P.T., BURZIO, L. and KOIDE, S.S., J. Biol. Chem., 254, 3018 (1979).
- 20 OGATA, N., UEDA, K., KAGAMIYAMA, H. and HAYAISHI, O., J. Biol. Chem., 255, 7616 (1980).
- 21 BREDEHORST, R., WIELCKENS, K., GARTEMANN, A., LENGYEL, H., KLAPPROTH, K. and HILZ, H., Eur. J. Biochem., 92, 129 (1978).

La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci G. Chieffi, M. De Vincentis, V. Leone.

FORMAZIONE DEGLI N-OSSIDI DELLA TRIFENODIOSSAZINA PER AZIONE DEI PERACIDI:

ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE.

Nota di Adele Bolognese* e Raffaele Maglione,

Presentata dal Socio ordinario Rodolfo Alessandro Nicolaus

Adunanza del 5/10/1983

Riassunto. Per azione dei peracidi sulla trifenodiossazina si ottengono due N-ossidi intensamente colorati. Le loro soluzioni cloroformiche, con massimi di assorbimento nel visibile rispettivamente a 527 e 535 nm, sono estremamente sensibili alla luce.

Abstract. N-oxides have been prepared by treating triphenodioxazine with an excess of m-chloroperbenzoic and peracetic acids. They are highly coloured compounds, whose solutions in aprotic organic solvents are very sensitive to light.

I sistemi ossidoriduttivi associati a strutture chinoniche e chinon-diiminiche sono di grande interesse in campo biologico e nello studio di reazioni fotochimiche indotte dalla luce visibile. In un precedente lavoro¹ abbiamo riportato che alcune diidrotifenodiossazine sostituite si ossidano, per azione della luce visibile, a trifenodiossazine. Durante lo studio del meccanismo attraverso il quale procede questa ossidazione, abbiamo notato che trattando la trifenodiossazina con peracidi in soluzione cloroformica, si osserva un'intensa variazione cromatica dal rosso al blu, che regredisce nel tempo.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Allo scopo di chiarire quali specie fossero responsabili della variazione cromatica della soluzione di trifenodiossazina e peracido abbiamo trattato, per una notte, una soluzione cloroformica di trifenodiossazina I (1 mm) con acido m-cloroperbenzoico (3 mm) a 4°C.

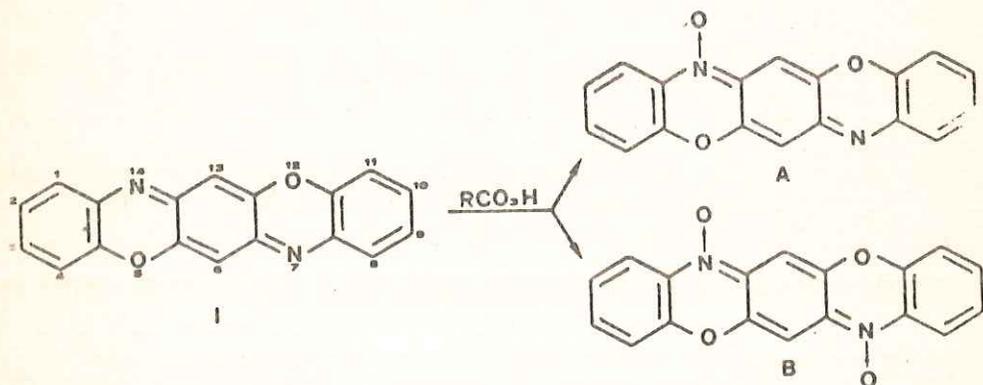
Si ottiene così una soluzione intensamente rosso-violacea, estremamente sensibile alla luce. Operando quasi al buio o ad una debole luce rossa, si lava la miscela di reazione con una soluzione satura di carbonato sodico, si essicca su solfato di magnesio anidro e si concentra a pressione ridotta e a bassa temperatura per evitare l'alterazione dei prodotti.

* Istituto di Chimica Organica e Biologica, Università di Napoli,
via Mezzocannone 16, I-80134 Napoli

Il prodotto roseo si purifica mediante cromatografia su strato sottile di silice (Merck F₂₅₄; eluente cloroformio-benzene-metanolo 45:45:10 vv). Si separano due bande colorate contenenti rispettivamente il prodotto rosa vivo A (Rf 0.4) e il prodotto blu B (Rf 0.3) che, trattati con acido ascorbico, forniscono il prodotto di partenza, la trifenodiossazina. Le soluzioni cloroformiche di A e B si decompongono rapidamente per esposizione alla luce solare.

Questo comportamento ci ha impedito di ottenere dati riproducibili circa le rese di questa reazione.

La struttura dei composti A e B è stata stabilita mediante analisi spettroscopica (UV, IR, ¹H NMR, Massa) e mediante identificazione del loro prodotto di degradazione, la trifenodiossazina², per confronto con un campione autentico.



Lo spettro di massa (eseguito su uno spettrometro VG ZAB 2F) del prodotto A mostra un picco molecolare a M^+ 302 m/e con la frammentazione caratteristica degli N-ossidi ($M-16$)³. Lo spettro di massa del prodotto B, M^+ 318 m/e, mostra due successive perdite ad ($M-16$) 302 m/e e ($H-32$) m/e, diagnostiche di due gruppi N-ossido.

Lo spettro IR in $CHCl_3$ (eseguito su un Perkin-Elmer 399) dei composti A e B mostra a 1270 cm^{-1} la caratteristica vibrazione del legame N-O.

Lo spettro ¹H NMR in $CDCl_3$ (eseguito su un Bruker 270 MHz) del prodotto B mostra una serie di segnali caratteristici di un composto simmetrico in cui il gruppo N=O agisce da accettore di elettroni. Infatti, i protoni sul C₁ e C₈ risuonano a δ 7.98 (2 H, d), sul C₃ e C₁₀ a δ 7.37 (2 H, t), sul C₂ e C₉ a δ 7.26 (2H, t), sul C₄ e C₁₁ a δ 7.14 (2H, d), sul C₆ e C₁₃ a δ 7.13 (2H, s). Dallo shift dei protoni in C₁ e C₈ risulta che alla struttura di risonanza di questa molecola contribuiscono strutture in cui la carica negativa è localizzata sull'ossigeno del gruppo N=O e quella positiva è delocalizzata sull'anello, piuttosto che localizzata sull'azoto eterociclico.

Mentre lo spettro di B è del tutto simmetrico, lo spettro di A è più

complesso ed è stato necessario operare in CD_2Cl_2 , il cui segnale non interferisce con quelli del prodotto. In C_1 il segnale risuona a $\delta 8.05$ (1 H, d), in C_2 e C_3 a $\delta 7.45$ (2 H, m), in C_9 e C_{10} a $\delta 7.35$ (2 H, m), in C_4 e C_8 a $\delta 7.23$ (2 H, dd), in C_{13} a $\delta 7.15$ (1 H, s), in C_{11} a $\delta 7.10$ (1 H, d) e in C_6 a $\delta 0.51$ (1 H, s).

Lo spettro elettronico in $CHCl_3$ (eseguito su un Perkin-Elmer 550 S) di A mostra un massimo a $\lambda 527$ ($\log \epsilon 3.80$), 458_s nm, quello di B un massimo a $\lambda 535$ nm ($\log \epsilon 3.92$). I valori dei massimi di assorbimento indicano una forte interazione tra il gruppo N-O e il sistema dell'anello, come avevamo già notato dallo spettro NMR. Questo comportamento è frequente negli N-ossidi aromatici nei quali spesso lo spettro dell'acido coniugato è molto simile a quello dell'acido coniugato della base di partenza⁵: infatti in acido solforico concentrato, la trifenodiossazina ha un massimo di assorbimento a $\lambda 642$, 592_s nm e quello del suo di-N-ossido B uno a $\lambda 634$, 590_s nm.

I dati e le osservazioni riportate suggeriscono per i prodotti A e B la struttura di mono- e di-N-ossido della trifenodiossazina.

È importante notare che i prodotti descritti si ottengono anche utilizzando l'acido peracetico o usando come solvente il tetracloruro.

Gli N-ossidi della trifenodiossazina sono instabili alla luce visibile e rientrano quindi nel numero dei derivati fotolabili di sistemi eterociclici che, come abbiamo di recente dimostrato, sono strettamente legati ai pigmenti ommocromici presenti nei fotoricettori degli invertebrati.

BIBLIOGRAFIA

- 1) A. Bolognese, C. Piscitelli and G. Scherillo, *J. Org. Chem.*, **48** 1019 (1983).
- 2) W. Schäfer, I. Geyer and H. Schulde, *Tetrahedron*, **28** 3811 (1972).
- 3) A. R. Katritzky and J. M. Lagowski, "Chemistry of the Heterocyclic N-Oxides", Academic Press, London 1971 e bibliografia ivi contenuta.
- 4) E. Ochrai, "Aromatic amine oxides", Elsevier Publishing Company, London 1967.
- 5) H. H. Jaffé and G. O. Doack, *J. Am. Chem. Soc.*, **77** 4441 (1955).

La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci L. Mangoni, G. Jannelli, R. Nicolaus.

Isolamento di un ommocromo fotolabile dagli occhi della "Musca domestica".

Trattamento con acidi di alcuni composti modello.^{1a}

Nota dei dottori Adele Bolognese, Carlo Piscitelli e Giulia Scherillo^{1b} **

presentata dal socio ordinario prof. Rodolfo Alessandro Nicolaus.

Adunanza del 12 novembre 1983

Summary. Extraction of house-fly heads with methanol-HCl 0,5N mixture yields a yellow, light-sensitive pigment. This pigment can probably be ascribed to the ommatin group. The 1,9-disuccinylmethylester-2-amino-3H-phenoxazin-3-one (4a) is synthesized. Isolation and characterization of 1,8,13-trisuccinylmethylester-7,14-dihydrotriphendioxazine (9a) and 1,9-disuccinylmethylester-2-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one (10a) from the treatment in methanol-H₂SO₄ are reported. The photochemistry of 4a, 9a and 10a is also reported.

Riassunto. L'estrazione con una miscela metanolo-HCl 0,5N delle teste della "Musca domestica" fornisce un pigmento fotolabile che appartiene alla classe delle ommatine. L'1,9-disuccinilmetilistere-2-ammino-3H-fenossazin-3-one (4a) viene sintetizzato come un possibile modello. Per trattamento con acidi di 4a si ottengono l'1,8,13-trisuccinilmetilistere-7,14-diidrotrifendiossazina (9a) e l'1,9-disuccinilmetilistere-2-idrossi-3H-fenossazin-3-one (10a). Viene riportato anche uno studio fotochimico su 4a, 9a e 10a.

Tempo fa^{2,3} abbiamo mostrato che gli estratti, ottenuti dalla pelle e dagli occhi di alcuni cefalopodi, contengono un ommocromo labile (λ_{\max} 430 e 450nm) che si trasforma rapidamente nella miscela di estrazione in un composto rosso (λ_{\max} 510nm), il quale, a sua volta, per esposizione all'aria, dà un nuovo pigmento giallo (λ_{\max} 440nm). Questi ultimi due pigmenti sono stati identificati, mediante confronto cromatografico e spettrale, come diidroxantommatina (1) e xantommatina (2), i pigmenti che si ottengono per ossidazione della 3-idrossichinurenina (3)⁴. Allo scopo di indagare su questo labile ommocromo, non ancora descritto in natura, abbiamo esteso il nostro studio ad altre fonti naturali come le api e le mosche⁵. Abbiamo osservato che il pigmento labile costituisce solo una piccola parte del materiale colorato estratto da que-

** Istituto di Chimica Organica e Biologica - Facoltà di Scienze
Via Mezzocannone 16 - 80134 Napoli

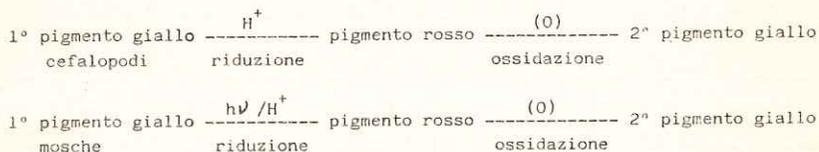
sti insetti, mentre è l'unica ommatina presente nei fotoricettori dei cefalopodi.

Per avere più approfondite informazioni sui pigmenti presenti negli insetti, abbiamo ora riesaminato l'estratto ottenuto dalle teste della "Musca domestica".

Le teste vengono separate mediante setacciamento dagli insetti congelati⁶ a -15°C e quindi estratte al buio a 5°C , con la miscela $\text{CH}_3\text{OH-HCl}$ 0,5N (80:20 v/v). Gli estratti riuniti vengono passati su di una colonna di carbossimetilcellulosa CM23, usando come unico eluente la miscela butanolo-acido acetico-acqua (60:15:25 v/v). Si ottiene così una banda gialla che contiene un pigmento fotolabile (λ_{max} 430nm). Per irraggiamento con una lampada a luce solare (Superhot 650W), il massimo di assorbimento a 430nm si abbassa e contemporaneamente si osserva una risalita a 510nm. Lo spettro elettronico finale (dopo circa un'ora di irraggiamento a 4°C) mostra un plateau tra 400 e 550nm. Purificando la soluzione fotoirraggiata su di una colonna di CM23 si ottiene un composto rosso che si trasforma in un pigmento giallo fotostabile.

Il comportamento del pigmento fotolabile da noi estratto è simile a quello osservato da altri autori⁷ per un pigmento fotolabile, di natura sconosciuta, estratto dalle teste della "Musca domestica" con tampone fosfato 0,1M, pH 6,8. Per confronto cromatografico e spettrale abbiamo che i pigmenti fotolabili estratti con $\text{CH}_3\text{OH-HCl}$ e tampone fosfato sono identici. In base alle proprietà ossido-riduttive ed al fatto che per blando trattamento alcalino (pH 8,5) si ottiene la 3-idrossichinurenina (3)⁸ abbiamo dimostrato la natura ommatinica del pigmento fotolabile estratto. La struttura dei pigmenti fotosensibili, presenti negli occhi delle mosche è di considerevole interesse biologico, in quanto nelle teste di questi insetti non è mai stato ritrovato il retinene e, quindi non è presente un complesso retinale-proteina del tipo di quelli responsabili della visione sia nei vertebrati che negli invertebrati.

Sulla base delle conoscenze del cromoforo delle fenossazine e dei fenossazinoni⁹ è possibile ipotizzare che, sia nel caso del pigmento labile nella miscela di estrazione, che in quello del pigmento fotolabile, si osservano le seguenti trasformazioni:



Nella letteratura sulla chimica degli ommocromi^{4,10} non è riportato nulla che possa spiegare il comportamento osservato e, pertanto, abbiamo intrapreso uno studio sul comporta-

mento in acidi e sulla fotochimica di alcuni composti modello della xantommatina (2).

Recentemente¹¹ abbiamo studiato il comportamento in ambiente acido dell' 1,9-diacetil-2-ammino-3H-fenossazin-3-one (4b). Dalla miscela di reazione abbiamo isolato i composti 9b e 10b. Poiché i composti esaminati avevano un comportamento diverso (schema 2) da quello dei pigmenti naturali, abbiamo esaminato un nuovo modello: l'1,9-disuccinilmetilestere-2-ammino-3H-fenossazin-3-one (4a). La scelta di questo modello si basa sulla possibilità che, per azione degli acidi o della luce due idrogeni possano trasferirsi dal gruppo $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOCH}_3$ al cromoforo fenossazinico riducendolo a fenossazinico.

Il composto 4a è stato sintetizzato secondo lo schema 1 a partire dal 2-nitro-3-idrossiacetofenone (5). Il composto 6 (M^+ 237m/e)¹² presenta all'¹HNMR¹³ un multipletto tra 7,8 e 7,4 δ (tre protoni aromatici) e due doppietti accoppiati a 7,5 e 6,6 δ , integrabili rispettivamente per un protone ($-\text{CH}=\text{CH}-$). Il composto 7 (M^+ 209m/e) all'¹HNMR presenta un sistema aromatico AMX (doppietto a 7,2, tripletto a 6,9 e doppietto a 6,5 δ , integrabili ciascuno per un protone) e due tripletti a 2,9 e 2 δ , integrabili rispettivamente per due protoni ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$). Per trattamento con metanolo saturo con HCl di 7 si ottiene il composto 8 (M^+ 223m/e). Il composto 4a, ottenuto per ossidazione di 8 secondo le modalità riportate in letteratura¹⁴ è un solido amorfo di color giallo-arancio. L'¹HNMR mostra un largo singoletto a 7,5 δ , integrabile per tre protoni aromatici, un singoletto chinonico a 6,5 δ (1H), due singoletti a 3,9 e a 3,8 δ ($2-\text{COOCH}_3$) e quattro tripletti a 3,1, 3, 2,2 e 2 δ integrabili ciascuno per due protoni ($2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$). Lo spettro UV mostra due massimi a 448 e 420nm, $\epsilon=3,98$. Lo spettro di massa presenta segnali a 440 (M^+) e 425, 409, 381 e 349m/e.

Per studiarne la reattività in acidi 4a viene tenuto a ricadere per un'ora nella miscela $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{SO}_4$ 0,5N (80:20 v/v). La miscela di reazione viene neutralizzata ed estratta con cloroformio. La fase organica, concentrata a piccolo volume viene smistata su lastre semipreparative di Gel di silice, usando come eluente la miscela benzene-cloroformio-metanolo (45:45:10). Si ottengono così tre bande principali che vengono eluite ed esaminate.

La banda superiore contiene un composto rosso viola (λ_{max} 510nm, $\epsilon=3,5$), identificato come l'1,8,13-trisuccinilmetilestere-7,14-diidrotirifendiossazina (9a). L'¹HNMR mostra due singoletti a 9,8 e 9,5 δ (2NH), un doppietto a 7,2 δ (2H), un doppietto a 6,7 δ (1H), un multipletto a 6,55 δ (4H), tre singoletti a 3,9 δ , 3,85 δ , 3,82 δ 3H ciascuno), due tripletti quasi sovrapposti

a 3,1 δ (4H), un tripletto a 2,9 δ (2H), un tripletto a 2,2 δ (2H) e un multipletto a 1,9 δ (4H).

La banda intermedia contiene 4a che non ha reagito, la banda inferiore contiene un composto giallo-arancio. λ_{\max} 440 e 420nm, $\epsilon=3,83 \cdot L^1$ HNMR presenta un sistema AMX aromatico: doppietti a 7,6 e 7,45 δ e un tripletto a 7,3 δ (integrabili ciascuno per un protone), un singoletto a 6,5 δ (1H chinonico) e i segnali di due catene $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOCH}_3$ quasi equivalenti. La massa mostra un intenso $M^+ + 2$ a 443m/e, tipico di strutture chinoniche. Al composto è stata attribuita la struttura di 1,9-disuccinilmetilestere-2-idrossi-3H-fenossazin-3-one (10a).

Per spiegare la formazione di 9a si deve ammettere che, per azione degli acidi, da 4a si libera una certa quantità di 8 che, per condensazione con altro 4a fornisce 9a. Il meccanismo non è ancora del tutto chiarito¹¹.

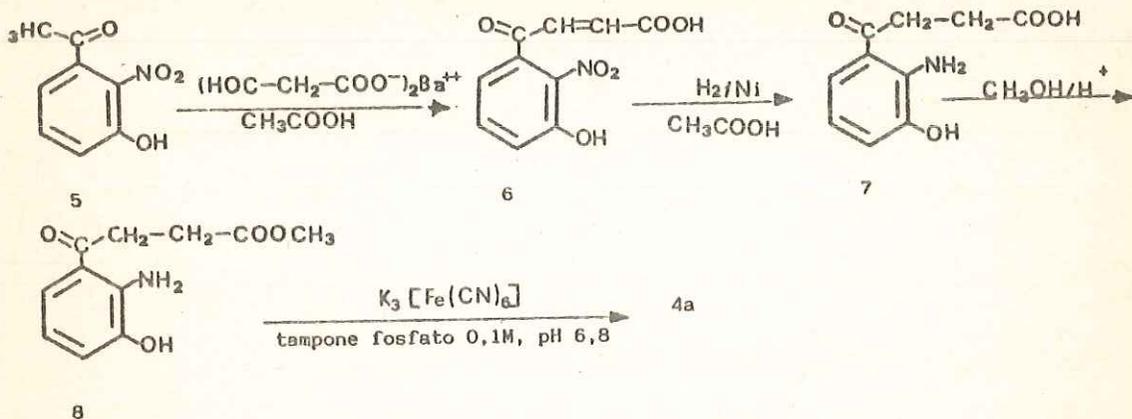
Per fotoirraggiamento di 9a in cloroformio si ottiene un composto fluorescente con λ_{\max} 490 ($\epsilon=4,3$) e 530nm ($\epsilon=4,45$). Il composto è stato identificato come 1',1,8,13-trisuccinilmetilesteretrefendiossazina (11a) con $M^+ 628$ m/e. L^1 HNMR presenta un doppietto a 7,6 δ (2H), un multipletto a 7,4 δ (4H), un singoletto a 6,5 δ (1H chinonico), tre singoletti a 4,1 δ , 3,9 δ , 3,75 δ integrabili per tre protoni ciascuno ($3 \cdot \text{OCH}_3$), sei tripletti a 3,1, 2,9, 2,82, 2,1, 2 e 1,9 δ integrabili per due protoni ciascuno ($3 \cdot \text{CH}_2-\text{CH}_2$).

In solventi protici acquosi 11a si idrolizza rapidamente con formazione di 10a e di 8, il quale riduce una parte di 11a a 9a che viene ritrovato nella miscela di idrolisi, 8 a sua volta si ossida a 4a. La fotoossidazione di 9a è completamente inibita dalla presenza di 8, mentre 11a, ottenuto per fotoossidazione di 9a in cloroformio, trasforma completamente 8 in 4a.

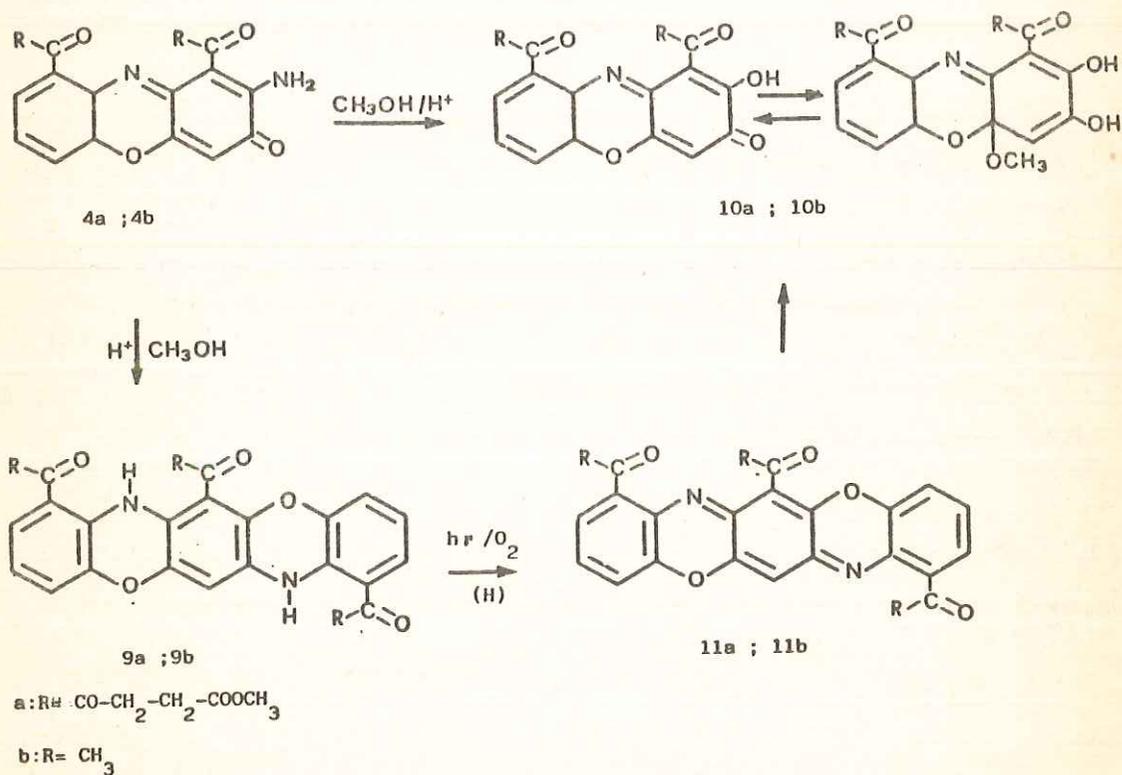
Il composto 10a addiziona reversibilmente acqua o metanolo con formazione di un addotto con λ_{\max} 340nm, che non è stato possibile isolare. Questa reazione non è influenzata dalla luce. Irraggiando una soluzione cloroformica di 10a si osserva una diminuzione della densità ottica tra 420 e 450nm, dovuta alla trasformazione di 4a nella sua forma o.chinonica con minore. 4a è completamente stabile al fotoirraggiamento in solventi polari ed apolari.

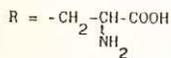
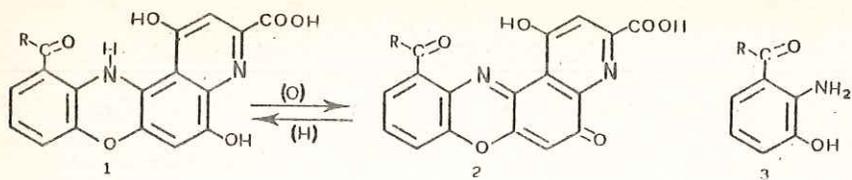
Come può ricavarsi da quanto esposto il raggruppamento $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOCH}_3$ rimane inalterato in tutte le trasformazioni osservate, così come restano libere le posizioni 4, 6, 7 e 8. Quest'ultimo dato indica chiaramente che le riduzioni osservate nei pigmenti naturali non dipendono dall'aggiunta di acqua, metanolo od acidi al cromoforo fenossazinonico.

SCHEMA 1



SCHEMA 2





Note

- (1) (a) Questo lavoro è stato finanziato da un contributo del CNR -Italia
 (b) Istituto di Chimica organica e biologica, Via Mezzocannone 8 80134 Napoli Italia
- (2) A. Bolognese e Giulia Scherillo, questo giornale 38, 17 (1971)
- (3) A. Bolognese e Giulia Scherillo, *Experientia* 30, 225 (1974)
- (4) A. Butenandt, U. Schiedt, E. Biekert, R. I. I. Cromartie, *Ann. Chem. Liebigs*, 590, 75 (1955)
- (5) A. Bolognese e Giulia Scherillo, questo giornale 38, 167 (1971)
- (6) Le mosche sono state fornite dal reparto di entomologia-Istituto superiore di Sanità, Italia
- (7) J. M. Bowness, J. J. Wolken, *J. Gen. Physiol.*, 42, 779 (1959)
- (8) A. Butenandt, E. Biekert, H. Kübler, B. Linzen, *Z. Physiol. Chem.*, 319, 328 (1960)
- (9) W. Schäfer, J. Geyer, *Tetrahedron*, 28, 5261 (1972)
- (10) B. Linzen, *Naturwissenschaften*, 46, 461 (1959)
- (11) A. Bolognese, Carlo Piscitelli, Giulia Scherillo, *J. Org. Chem.*, 48, 4019 (1983)
- (12) Gli spettri di massa sono stati eseguiti a Milano con un apparecchio VG ZAB 2F.
- (13) Gli spettri $^1\text{HNMR}$ sono stati eseguiti in CDCl_3 con uno spettrometro Bruker 270-MHz.
 Nel testo per $^1\text{HNMR}$ si deve intendere spettro $^1\text{HNMR}$.
- (14) J. Angyal, E. Bullock, W. G. Hanger, W. C. Howell, A. W. Johnson, *J. Chem. Soc.*, 1592 (1957)

La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci L. Mangoni, V. Leone, R. Nicolaus.

Nota dei dottori Adele Bolognese, Carlo Piscitelli e Giulia Scherillo ^{1b} **

presentata dal socio ordinario prof. Rodolfo Alessandro Nicolaus.

Adunanza del 12 novembre 1983

Summary. Reductive alkylation of substituted 3H-phenoxazin-3-ones is reported. A comparative study is made of ¹HNMR spectra of 3H-phenoxazin-3-ones and phenoxazines which are obtained on reduction.

Riassunto. Alcuni 3H-fenossazin-3-oni vengono ridotti ed alchilati allo scopo di confrontare i loro spettri ¹HNMR con quelli delle corrispondenti fenossazine alchilate che si ottengono per riduzione.

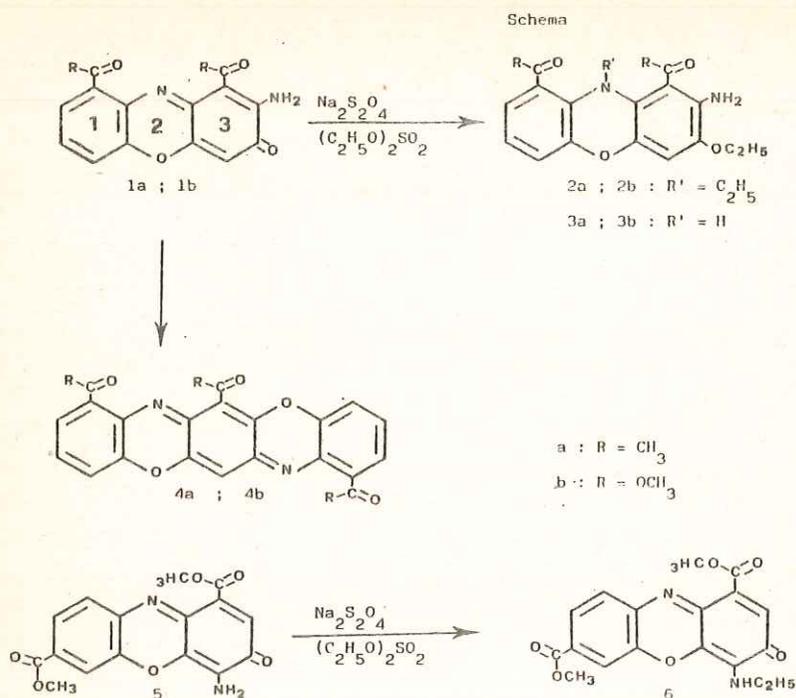
Gli ommocromi ² ed alcuni fenossazinoni mostrano un forte shift batocromico nello spettro visibile quando vengono ridotti. Questo fatto è stato attribuito alla presenza di un acetile in posizione 1 e di un gruppo amminico od ossidrilico in posizione 2 ³. In tal modo il color rosso-viola (λ_{\max} tra 490 e 550nm) di alcuni ommocromi è stato attribuito alla presenza di cromofori fenossazinici, mentre il colore giallo-arancio (λ_{\max} tra 420 e 450nm) è stato attribuito alla presenza di cromofori fenossazinonici.

Recentemente abbiamo mostrato che le 1,8,13-triacetil-7,14-diidrotrifendiossazine hanno un massimo di assorbimento, nel visibile, ad un λ_{\max} minore delle corrispondenti 1,8,13-triacetilfendiossazine ⁴. I composti ossidati non sono sempre facilmente riducibili e viceversa; inoltre, nel corso delle reazioni di ossido-riduzione, hanno luogo delle trasformazioni che alterano completamente le strutture. Anche gli spettri di massa sono spesso poco diagnostici sullo stato di ossidazione degli ommocromi e dei fenossazinoni perché spesso compaiono intensi $M^+ + 2$, sostitutivi a volte dello stesso ione molecolare ⁴.

Per avere dei dati più sicuri sullo stato di ossidazione abbiamo confrontato gli spettri ¹HNMR di alcuni fenossazinoni con quelli delle corrispondenti fenossazine che si ottengono per riduzione ed alchilazione.

Per riduzione con idrosolfito di sodio ed alchilazione con solfato dietilico dell'1,9-diacetil-2-ammino-3H-fenossazin-3-one (1a) ³ abbiamo ottenuto tre prodotti rossi che vengono separati su lastre semipreparative di Gel di silice, usando come eluente cloroformio.

Il composto con Rf. maggiore è stato identificato come l'1,9-diacetil-2-ammino-3-etossi-10-etilfenossazina. (2a). Lo spettro IR mostra segnali a 3420-3300 cm^{-1} (NH_2) e tra 1720-1680 cm^{-1} (carbonili associati e non). Lo spettro di massa ⁵ mostra un M^+ a 334m/e. Lo spettro ¹HNMR mostra un sistema AMX aromatico: due doppietti a 7,13 e 6,63 δ , tripletto a 6,48 δ , integrabili complessivamente per tre protoni, un singoletto a 6,32 δ attribuito al protone sul C₄, un quartetto a 4 δ (2H)



un tripetto a 1,40 (3H), accoppiati attribuiti al gruppo $-\text{OCH}_2+\text{CH}_3$, un quartetto a 2,96 (2H) ed un tripetto a 1,20 (3H), accoppiati, $=\text{NCH}_2-\text{CH}_3$. Lo spettro UV presenta un massimo a 480nm, $\epsilon = 3,9$; M^+ a 354m/e. Il composto con Rf. intermedio è stato identificato come 1,9-diacetil-2-ammino-3-etossifenosazina (3a)³. Lo spettro ¹HNMR presenta un sistema aromatico AMX identico a quello di 2a; un segnale a 6,30 δ (1H), i segnali attribuiti al gruppo $-\text{OCH}_2-\text{CH}_3$ (quartetto a 3,96 e tripetto a 1,40); i segnali dei due $-\text{COCH}_3$ compaiono a 2,5 e 2,7 δ nel composto 2a e a 2,8 e 2,5 δ nel composto 3a. Il composto con Rf. minore è stato identificato come l'1,8,13-triacetiltrifendiossazina (4a) con un confronto cromatografico e spettrale con un campione autentico⁴. Riducendo ed etilando in analoghe condizioni sperimentali l'1,9-dicarbometossi-2-ammino-3H-fenosazina-3-one (1b) si ottengono l'1,9-tricarbometossi-2-ammino-3-etossil-10-etilfenosazina (2b) (M^+ 386m/e), di colore giallo (λ_{max} 430nm, $\epsilon = 3,8$), l'1,9-dicarbometossi-2-ammino-3-etossilfenosazina (3b) (M^+ 358m/e) con λ_{max} 420nm, $\epsilon = 3,82$. Gli spettri ¹HNMR di 2b e di 3b mostrano un sistema AMX aromatico del tutto identico a quello di 2a e 3a ed un analogo segnale a 6,32 δ (protone sul C₄), gli altri segnali corrispondono ai raggruppamenti presenti. In piccole quantità si ottiene anche il composto 4b identificato come l'1,8,13-tricarbometossitrifendiossazina mediante confronto cromatografico e spettrale con un campione autentico⁴. Trattando l'1,7-dicarbometossi-4-ammino-3H-fenosazina-3-one (5) con questa procedura sperimentale si ottiene esclusivamente il composto 6 di color arancio (λ_{max} 440 e 420nm, $\epsilon = 4,10$), identificato come l'1,7-dicarbometossi-4-etilammino-3H-fenosazina-3-one (M^+ 356m/e). Lo spettro IR mostra un forte assorbimento a 3300 cm^{-1} (NH), Lo spettro ¹HNMR mostra un multiplet-

to a δ (2protoni aromatici) un doppietto a 7,7 δ (un protone aromatico), un singoletto a 6,45 δ (protone sul C₂) un multipletto a 6,4 δ (NH), due singoletti a 3,85 e 3,8 δ (2 OCH₃), un multipletto a 2,9 (NH-CH₂-CH_n) un tripletto a 1,2 (CH₂-CH₃). Evidentemente la fenossazina corrispondente al fenossazinone 5, non essendo sufficientemente stabilizzata da legami idrogeno richiede, per la sua formazione, condizioni sperimentali più drastiche di quelle da noi adoperate.

Confrontando gli spettri ¹HNMR dei fenossazinoni ⁴1a, 1b e 6 con quelli delle fenossazine 2a, 2b, 3a e 3b è possibile osservare che i protoni aromatici dell'anello 1 hanno un assorbimento compreso tra 7,9 e 7,5 nelle strutture fenossazinoniche e tra 7,1 e 6,4 δ nelle strutture fenossaziniche. Questo dato che integra quello precedentemente osservato ⁴ negli spettri ¹HNMR delle trifendiossazine e delle corrispondenti diidrotrofendiossazine può essere di considerevole aiuto per la comprensione della difficile chimica degli omocromi. Meno diagnostica è invece la posizione del protone sul C₄, che resta pressoché inalterato nelle strutture ossidate e ridotte (6,5 e 6,3 δ).

Note

Gli spettri di massa sono stati eseguiti a Milano con uno spettrometro VG ZAB 2F.

Gli spettri ¹HNMR sono stati eseguiti in CDCl₃ con uno spettrometro Bruker 270 MHz.

(1) (a) Il lavoro è stato parzialmente finanziato con un contributo CNR-Italia

(b) Istituto di Chimica organica e biologica. Via Mezzocannone 16 80134 Napoli Italia

(2) B. Linzen, *Naturwissenschaften*, **46**, 461 5fç(c)

(3) W. Schäfer, J. Geyer, *Tetrahedron*, **28**, 5261 (1972)

(4) A. Bolognese, C. Piscitelli, G. Scherillo, *J. Org. Chem.*, **48**, 4019 (1983)

La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci P. Corradini, L. Mangoni, R. Nicolaus.

UN SEMIGRUPPO GENERATO DA UN OPERATORE
DIFFERENZIALE QUASI-ELLITTICO DEGENERE

Nota di Gennaro Colaps (a Napoli)

presentata dal socio ordinario Carlo Ciliberto

(Adunanza del 12 novembre 1983)

SUMMARY - The Dirichlet problem on a singular bounded set for the quasi-elliptic degenerate operator $A + \lambda \sigma^{-\gamma}$ is solved. Moreover it is shown that the operator $-\sigma^{2N} A$ is an infinitesimal generator of a semi-group of class C_0 , $2N$ being the order of the operator A .

RIASSUNTO - In questa nota viene studiato il problema di Dirichlet in un dominio angoloso per l'operatore quasi-ellittico $A + \lambda \sigma^{-\gamma}$ e viene risolto col metodo dei semigruppì un problema al contorno relativo ad un operatore ellittico parabolico degenerare di ordine $2N$ non quasi-ellittico nè ipoellittico.

In questa nota si espongono alcuni risultati riguardanti problemi al contorno in un dominio angoloso per certe equazioni differenziali di tipo ellittico-parabolico.

Precisamente, nel n.1 viene studiato il problema di *DIRICHLET* in un aperto limitato $\Omega = X \times Y \subseteq \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}$ relativo all'equazione

$$Au + \lambda \sigma^{-\gamma} u = f$$

dove A è un tipo di operatore differenziale quasi-ellittico, non fortemente, di ordine $2N$, σ una funzione peso nulla sulla parte angolosa di Ω , $\gamma \in [0, 2N]$.

Vengono dati, per tale problema, teoremi di esi-

stenza e unicità in uno spazio di *SOBOLEV* con peso (teor.1 e 2). Questi teoremi costituiscono una generalizzazione dei teoremi contenuti nella prima parte del lavoro [3] di *L.CASTELLANO* nei quali è $\gamma = 0$. Essi costituiscono anche un'estensione ad un operatore quasi-ellittico di alcuni risultati ottenuti da *M. TROISI* nel lavoro [8] per un operatore fortemente quasi-ellittico.

Nel n.2, utilizzando i risultati ottenuti nel n.1, viene mostrato che l'operatore $-\sigma^{2N}A$ è generatore infinitesimale di un semigruppò di classe C_0 (teor.3); è così univocamente risolvibile un problema al contorno in $\Omega \times]0, T[$ per l'equazione

$$D_t u + \sigma^{2N} A u = f$$

di tipo *ellittico-parabolico degenero non quasi-ellittico*.

Per una più vasta bibliografia relativa ad equazioni di questo tipo si veda in *M. TROISI* [8] e *G. COLAPS* [4].

N.1 Siano X un aperto limitato di R^N con frontiera localmente lipschitziana, Y un intervallo aperto limitato di R , $\Omega = X \times Y$, N, M ed M_0 interi non negativi tali che $N > M_0 \geq M$.

Si considerino le $(n+1)$ -ple $m = (2N, \dots, 2N, 2M)$, $m_0 = (2N, \dots, 2N, 2M_0)$, $q = (1, \dots, 1, \frac{2N}{2M})$, $q_0 = (1, \dots, 1, \frac{2N}{2M_0+1})$ e per ogni $(n+1)$ -pla di interi non negativi $\alpha = (\alpha_1, \dots, \alpha_{n+1})$ si ponga

$$|\alpha| = \alpha_1 + \dots + \alpha_{n+1} ,$$

$$\langle \alpha, q \rangle = \begin{cases} \alpha_1 + \dots + \alpha_n + \alpha_{n+1} \frac{2N}{2M} & \text{se } M > 0 \\ |\alpha| & \text{se } M = 0 \text{ e } \alpha_{n+1} = 0, \end{cases}$$

$$\langle \alpha, q_0 \rangle = \alpha_1 + \dots + \alpha_n + \alpha_{n+1} \frac{2N}{2M_0 + 1},$$

e, per $x = (x_1, \dots, x_n) \in \mathbb{R}^M$ e $y \in \mathbb{R}$,

$$D^{|\alpha|} = \frac{\partial^{|\alpha|}}{\partial x_1^{\alpha_1} \dots \partial x_n^{\alpha_n} \partial y^{\alpha_{n+1}}},$$

$$D_x^\alpha = D^\alpha \quad \text{nel caso } \alpha_{n+1} = 0$$

$$D_y^\alpha = D^\alpha \quad \text{nel caso } \alpha_1 = \dots = \alpha_n = 0.$$

Si consideri quindi l'operatore

$$A(x, y; D) = \sum_{\substack{\langle \alpha, q \rangle \leq N \\ \langle \beta, q \rangle \leq N}} D^\beta (a_{\alpha\beta}(x, y) D^\alpha) + (-1)^{M_0} D_y^{M_0} (b(x, y) D_y^{M_0+1})$$

a coefficienti reali e verificanti in $\bar{\Omega}$ le condizioni:

$$(1) \quad b(x, y) \neq 0.$$

$$L) \quad \mathcal{R}_e \sum_{\substack{\langle \alpha, q \rangle = N \\ \langle \beta, q \rangle = N}} (i)^{|\alpha+\beta|} a_{\alpha\beta}(x,y) \xi^{\alpha+\beta} \geq \mu \sum_{k=1}^n |\xi_k|^{2N+\mu'} |\xi_{n+1}|^{2M}$$

$\forall \xi \in \mathbb{R}^{n+1} \quad \mu > 0, \quad \mu' \geq 0 \quad \text{se rispettivamente } M \geq 0.$

Si osservi che per tali condizioni l'operatore $A(x,y;D)$ è quasi-ellittico rispetto al multiindice m_0 e l'operatore $A(x,y;D) - (-1)^{M_0} D_y^{M_0} (b D_y^{M_0+1})$ se $M > 0$, è fortemente quasi-ellittico rispetto al multiindice m .

Sia ora S_X un sottoinsieme chiuso della frontiera ∂X di X , si ponga

$$\partial_X \Omega = (\partial X - S_X) \times Y$$

$$\partial_i \Omega = X \times \text{inf } Y$$

$$\partial_s \Omega = X \times \text{sup } Y$$

$$S = \partial \Omega - (\partial_X \Omega \cup \partial_i \Omega \cup \partial_s \Omega)$$

e si faccia l'ipotesi che esista un ricoprimento di $\partial X - S_X$ costituito da un numero finito di aperti di \mathbb{R}^n , I_1, \dots, I_k , disgiunti da S_X e tali che ad ogni I_i sia possibile associare un omeomorfismo α_i di classe C^∞ di \bar{I}_i sul cilindro $\{x \in \mathbb{R}^n: x_1^2 + \dots + x_{n-1}^2 \leq 1, |x_n| \leq 1\}$ il quale trasformi $I_i \cap X$ nell'insieme

$\{x \in \mathbb{R}^n : x_1^2 + \dots + x_{n-1}^2 < 1, x_n = 0\}$; inoltre, se $I_i \cap I_j \neq \emptyset$, esiste un omeomorfismo β_{ij} di classe C^∞ e a jacobiano positivo di $\alpha_i(I_i \cap I_j)$ su $\alpha_j(I_i \cap I_j)$ tale che $\alpha_j(x) = \beta_{ij}(\alpha_i(x)) \quad \forall x \in I_i \cap I_j$.

Posto

$$\rho(x, y) = \frac{1}{d\sqrt{2}} \text{dist}(x, y; S) \quad \forall (x, y) \in \bar{\Omega}$$

dove d è un numero reale > 1 e $\geq \frac{1}{\sqrt{2}} \sup_{\bar{\Omega}} \text{dist}(x, y; S)$,

si consideri una funzione $\sigma \in C^\infty(\bar{\Omega} - S) \cap C^{0,1}(\bar{\Omega})$ tale che $\forall (x, y) \in \bar{\Omega}$

$$c_1 \rho(x, y) \leq \sigma(x, y) \leq c_2 \rho(x, y) \quad (1)$$

e, per ogni numero reale s e per ogni intero positivo k , lo spazio $W_s^k(\Omega)$ delle funzioni reali u tali che

$$\sigma^{s + \langle \alpha, q_0 \rangle - k} D_u^\alpha \in L^2(\Omega) \quad \text{per } \langle \alpha, q_0 \rangle \leq 2N$$

munite della norma

 (1) L'esistenza di una tale funzione è garantita ad esempio se $\partial_X \Omega = \emptyset$ come si deduce dal *lemma* 3.1 del cap.6 di [7].

$$\|u\|_{W_S^k(\Omega)} = \sum_{\langle \alpha, q_0 \rangle \leq 2N} \left\| \sigma^{s + \langle \alpha, q_0 \rangle - k} D_u^\alpha \right\|_{L^2(\Omega)}.$$

Come facilmente si vede, l'operatore A è propriamente quasi-ellittico di tipo N su $\partial_X \Omega$, di tipo $M_0 + 1$ su $\partial_i \Omega$ e M_0 su $\partial_s \Omega$ se ivi $b(x, y) > 0$, viceversa se ivi $b(x, y) < 0$. (1)

Supposto allora $\forall (x, y) \in \bar{\Omega} \quad b(x, y) > 0$, si consideri il seguente problema di *DIRICHLET*, $\forall \gamma \in [0, 2N], \forall \lambda \in \mathbb{R}$, $u \in W_S^{2N}(\Omega)$

$$Au + \lambda \sigma^{-\gamma} u = f \quad f \in L_S^2(\Omega)$$

$$(I) \quad \frac{\partial^k u}{\partial \nu^k} = 0 \quad \begin{array}{l} \text{su } \partial_X \Omega \text{ per } k = 0, 1, \dots, N-1 \\ \text{su } \partial_i \Omega \text{ per } k = 0, 1, \dots, M_0 \\ \text{su } \partial_s \Omega \text{ per } k = 0, 1, \dots, M_0 - 1 \end{array}$$

dove ν è il vettore normale esterno nei punti di $\partial \Omega - S$.

Si considerino le seguenti ipotesi sui coefficienti di A

- i) $a_{\alpha\beta} \in C^0(\bar{\Omega})$ per $\langle \alpha, q \rangle = \langle \beta, q \rangle = N$, $a_{\alpha\beta} \in L^\infty(\Omega)$ per $\langle \alpha + \beta, q \rangle \geq \gamma$
 $\sigma^{\gamma - \langle \alpha + \beta, q \rangle} a_{\alpha\beta} \in L^\infty(\Omega)$ per $\langle \alpha + \beta, q \rangle < \gamma$,
 $b \in C^0(\bar{\Omega})$, $D_y b \in L^\infty(\Omega)$, $D_y b \leq 0$ se $M_0 > 0$.

 (1) Cfr. [8] n.8.

- ii) $\sigma^{2M-\langle\alpha+\delta, q_0\rangle} D^{\beta-\delta} a_{\alpha\beta} \in L^\infty(\Omega)$ per $\langle\alpha, q\rangle \leq N$, $\langle\beta, q\rangle \leq N$, $\delta < \beta$,
 $\sigma^{2N-\langle M_0+\alpha+1, q_0\rangle} D_y^\alpha b \in L^\infty(\Omega)$ per $|\alpha| = \alpha_n \leq M_0$.
- iii) $\forall \alpha \exists C_\alpha \in]0, +\infty[: \forall (x, y) \in \Omega \cdot |D^\alpha \sigma(x, y)| \leq C_\alpha \sigma^{-|\alpha|+1}(x, y)$ (1)

Valgono i teoremi:

TEOREMA 1

Nelle ipotesi i) e ii) esiste $\lambda_0 \in]0, +\infty[$ tale che per ogni $\lambda \geq \lambda_0$ e per ogni $\gamma \in [0, 2N]$ si ha:

$$(1) \quad \|u\|_{W_N^{2N}(\Omega)} \leq k \left\| Au + \lambda \sigma^{-\gamma} u \right\|_{L_N^2(\Omega)} \quad \forall u \in W_N^{2N}(\Omega, \partial/\partial v)$$

con k indipendente anche da λ e il problema (I) è univocamente risolubile per $s = N$.

TEOREMA 2

Se è $M_0 = 0$, nelle ipotesi i), ii) e iii), esistono $\lambda_0 \in]0, +\infty[$, $s_0 \in]0, 2^{-1}[$ tali che per ogni $\lambda \geq \lambda_0$, $\forall s \in [N-s_0, N+s_0]$ e $\forall \gamma \in [0, 2N]$ si ha:

$$(2) \quad \|u\|_{W_s^{2N}(\Omega)} \leq k \left\| Au + \lambda \sigma^{-\gamma} u \right\|_{L_s^2(\Omega)} \quad \forall u \in W_s^{2N}(\Omega, \partial/\partial v)$$

(1) Cfr. nota precedente.

con k indipendente anche da λ ed s , e il problema (I) è univocamente risolubile.

Alla dimostrazione dei suddetti teoremi conviene premettere alcuni lemmi.

Si considerino le seguenti forme bilineari:

per $u, v \in W_0^N(\Omega)$

$$a(u, v) = \sum_{\substack{\langle \alpha, q \rangle \leq N \\ \langle \beta, q \rangle \leq N}} (-1)^{|\beta|} (a_{\alpha\beta} D^\alpha u, D^\beta v) + (b D^{M_0+1} u, D_y^{M_0} v),$$

per $u, v \in W_s^N(\Omega)$

$$a_s(u, v) = \sum_{\substack{\langle \alpha, q \rangle \leq N \\ \langle \beta, q \rangle \leq N}} (-1)^{|\beta|} (a_{\alpha\beta} D^\alpha u, D^\beta (\sigma^{2s} v)) + (b D_y u, \sigma^{2s} v)$$

e si indichi con $C_0^\infty(\bar{\Omega}-S, \partial/\partial v)$ lo spazio delle funzioni $u \in C_0^\infty(\bar{\Omega}-S)$ e verificanti su $\partial\Omega-S$ le condizioni del problema (I).

Si ha:

LEMMA 1

Nell'ipotesi i) per ogni $u \in C_0^\infty(\bar{\Omega}-S, \partial/\partial v)$ vale la disuguaglianza

$$\sum_{\langle \alpha, q \rangle \leq N} |D^\alpha u|_{\langle \alpha, q \rangle = -N}^2 \leq k_1 a(u, v) + k_2 |u|_{-\frac{Y}{2}}^2$$

con k_1 e k_2 costanti positive.

Dim. Per il Lemma 12.5 di [8] basterà considerare funzioni $u \in C_0^\infty(\Omega)$; allora, se è $M > 0$, applicando il Teor. 6 II di [5] si ottiene

$$(3) \sum_{\langle \alpha, q \rangle \leq N} |D^\alpha u|_0^2 \leq k_1 \sum_{\langle \alpha + \beta, q \rangle \geq \gamma} (-1)^{|\beta|} (a_{\alpha\beta} D^\alpha u, D^\beta u) + k_2 |u|_0^2 \quad (1)$$

se è $M = 0$, fissato $y \in Y$, per il Teor. 7.6 di [2] si ottiene

$$\sum_{\langle \alpha, q \rangle \leq N} \int_X (D^\alpha u)^2 dx \leq k_1 \sum_{\langle \alpha + \beta, q \rangle \geq \gamma} (-1)^{|\beta|} \int_X a_{\alpha\beta} D^\alpha u D^\beta u dx + k_2 \int_X u^2 dx$$

con k_1 e k_2 indipendenti anche da y . Integrando quest'ultima su Y si ottiene ancora la (3) dalla quale, tenendo conto del fatto che per l'ipotesi risulta

$$(b \ D_y^{M_0+1} u, D_y^{M_0} u) \geq 0$$

si deduce

(1) Qui e nel seguito si indicheranno con la lettera k , con o senza indice, dei numeri positivi indipendenti da u .

$$(4) \sum_{\langle \alpha, q \rangle \leq N} |D^\alpha u|_0^2 \leq k_1 \left(a(u, u) - \sum_{\substack{\langle \alpha, q \rangle \leq N \\ \langle \beta, q \rangle \leq N \\ \langle \alpha + \beta, q \rangle < \gamma}} (-1)^{|\beta|} (a_{\alpha\beta} D^\alpha u, D^\beta u) \right) + k_2 |u|_0^2 .$$

Per ciascun termine della sommatoria a destra, se $\langle \alpha, q \rangle < N$ e $\langle \beta, q \rangle < N$, si ha, per ogni $\varepsilon > 0$:

$$(5) \quad |(a_{\alpha\beta} D^\alpha u, D^\beta u)| \leq k |(\sigma^{\langle \alpha + \beta, q \rangle - \gamma} D^\alpha u, D^\beta u)| \leq \\ \leq k |D^\alpha u|_{\langle \alpha, q \rangle - \frac{\gamma}{2}} \cdot |D^\beta u|_{\langle \beta, q \rangle - \frac{\gamma}{2}} \leq \\ \leq k \left(\varepsilon \sum_{\langle \alpha, q \rangle \leq N} |D^\alpha u|_{-\frac{\gamma}{2}} + N \cdot k_\varepsilon |u|_{-\frac{\gamma}{2}} \right)^2 \leq \\ \leq k \varepsilon^2 \sum_{\langle \alpha, q \rangle \leq N} |D^\alpha u|_0^2 + k_\varepsilon |u|_{-\frac{\gamma}{2}}^2 ,$$

avendo applicato il *Lemma* 7.5 di [8] e la disegualianza di *YOUNG* mentre se $\langle \alpha, q \rangle = N$ si ottiene

$$(6) \quad |(a_{\alpha\beta} D^\alpha u, D^\beta u)| \leq k |D^\alpha u|_{N - \frac{\gamma}{2}} |D^\beta u|_{\langle \beta, q \rangle - \frac{\gamma}{2}} \leq \\ \leq k \varepsilon |D^\alpha u|_0^2 + k_\varepsilon |D^\beta u|_{\langle \beta, q \rangle - \frac{\gamma}{2}}^2 .$$

Dalla (4) e dalle (5) e (6), scegliendo opportunamente ϵ , segue intanto la diseguaglianza:

$$(7) \quad \sum_{\langle \alpha, q \rangle \leq N} |D^\alpha u|_0^2 \leq k_1 a(u, u) + k_2 |u|_{-\frac{\gamma}{2}}^2.$$

Poichè risulta⁽¹⁾ per ogni $s \leq s_0 < \frac{1}{2}$ e per $\langle \alpha, q \rangle \leq N$

$$(8) \quad |D^\alpha u|_{s + \langle \alpha, q \rangle - N} \leq k \sum_{\langle \alpha, q \rangle = N} |D^\alpha u|_s,$$

da quest'ultima, per $s = 0$ e dalla (7) segue la tesi.

LEMMA 2

Nelle ipotesi i) e iii) esiste $s_0 \in]0, 2^{-1}[$ tale che per ogni $s \in [-s_0, s_0]$ e per ogni $u \in C_0^\infty(\bar{\Omega} - S, \partial/\partial v)$ risulta

$$\sum_{\langle \alpha, q \rangle \leq N} |D^\alpha u|_{s + \langle \alpha, q \rangle - N}^2 \leq k_1 a_s(u, u) + k_2 |u|_{s - \frac{\gamma}{2}}^2.$$

Dim. Posto per ogni s ,

$$a_s(u, u) = \sum_{\langle \alpha + \beta, q \rangle \geq \gamma} (a_{\alpha\beta} D^\alpha u D^\beta (\sigma^{2s} u)) + (b D_y u, \sigma^{2s} v),$$

(1) cfr. [3] pag. 186.

tenuto conto dell'ipotesi ii), si scriva la (7) per la funzione $\sigma^s u$ e la forma a'_0 :

$$(9) \quad \sum_{\langle \alpha, q \rangle \leq N} |D^\alpha(\sigma^s u)|_0^2 \leq k_1 a'_0(\sigma^s u, \sigma^s u) + k_2 |u|_{s-\frac{\gamma}{2}}^2.$$

Si osservi che l'ipotesi iii) implica le limitazioni

$$|D^\alpha \sigma^s| \leq k_\alpha \sigma^{s-|\alpha|} \quad \forall \alpha ;$$

tenuto conto che per $\langle \alpha, q \rangle \leq N$ e $\delta \leq \alpha$ risulta

$$|\alpha - \delta| \leq N - \langle \delta, q \rangle, \quad \text{si ha allora:}$$

$$(10) \quad |a'_s(u, u) - a'_0(\sigma^s u, \sigma^s u)| =$$

$$= \left| \sum_{\langle \alpha + \beta, q \rangle \geq \gamma} a_{\alpha\beta} D^\alpha u, \sum_{\delta < \beta} \sum_{\delta' \leq \delta} \binom{\beta}{\delta} \binom{\delta}{\delta'} D^{\beta-\delta} \sigma^s D^{\delta-\delta'} \sigma^s D^{\delta'} u \right|$$

$$- \sum_{\langle \alpha + \beta, q \rangle \geq \gamma} \left(a_{\alpha\beta} D^\beta(\sigma^s u), \sum_{\delta < \alpha} \binom{\alpha}{\delta} D^{\alpha-\delta} \sigma^s D^\delta u \right) + (bu^2, \sigma^s D_y \sigma^s) \leq$$

$$\leq k|s| \left(\sum_{\langle \alpha, q \rangle \leq N} |D^\alpha u|_s + \sum_{\langle \beta, q \rangle \leq N} |D^\beta(\sigma^s u)| \right) \cdot \sum_{\langle \alpha, q \rangle < N} |D^\alpha u|_{s+\langle \alpha, q \rangle - N}$$

e, per $\langle \beta, q \rangle \leq N$

$$(11) \quad |D^\beta(\sigma^s u) - \sigma^s D^\beta u| \leq k|s| \sum_{\langle \alpha, q \rangle < N} |D^\alpha u|_{s+\langle \alpha, q \rangle - N} .$$

Ancora, per il fatto che per $\delta \leq \beta$ risulta

$$\langle \alpha + \beta, q \rangle - |\beta - \delta| \geq \langle \alpha, q \rangle + \langle \delta, q \rangle ,$$

si ha

$$(12) \quad |a_s(u, u) - a'_s(u, u)| = \left| \sum_{\langle \alpha + \beta, q \rangle < \gamma} \left(a_{\alpha\beta} D^\alpha u, \sum_{\delta \leq \beta} \Pi^{\beta - \delta} \sigma^{2s} \Pi^\gamma u \right) \right| \leq \\ \leq k \sum_{\langle \alpha, q \rangle < N} |D^\alpha u|_{s+\langle \alpha, q \rangle - \frac{\gamma}{2}} \sum_{\langle \alpha, q \rangle < N} |D^\delta u|_{s+\langle \delta, q \rangle - \frac{\gamma}{2}} .$$

Dalle disequaglianze (9),, (12), applicando di nuovo il *Lemma 7.5* di [8] e la disequaglianza di *YOUNG*, si ottiene la seguente:

$$(13) \quad \sum_{\langle \alpha, q \rangle \leq N} |D^\alpha u|_s^2 \leq k_1 a_s(u, u) + k_2 |u|_s^2 - \frac{\gamma}{2} + \\ + k_3 s^2 \sum_{\langle \alpha, q \rangle < N} |D^\alpha u|_{s+\langle \delta, q \rangle - \frac{\gamma}{2}} .$$

Da quest'ultima e dalla (8) segue infine la tesi.

Si consideri ora l'operatore

$$\Lambda_1(x, y; D) = \sum_{\langle \alpha, q \rangle \leq 2N} a_\alpha(x, y) D^\alpha + \sum_{|\alpha| \leq 2M_0 + 1} b_\alpha(x, y) D_y^\alpha$$

a coefficienti reali e verificanti in $\bar{\Omega}$ la condizione

$$R_e \sum_{\langle \alpha, q \rangle = 2N} i^{|\alpha|} a_\alpha(x, y) \xi^\alpha \geq \mu_1 \sum_{k=1}^n |\xi_k|^{2N + \mu'_1} |\xi_{n+1}|^{2M} \quad \xi \in \mathbb{R}^{n+1}$$

con $\mu_1 > 0$, $\mu'_1 \geq 0$ secondo che sia $M \geq 0$.

Si indichi con $W_s^{2N}(\Omega, \partial/\partial v)$ lo spazio delle funzioni $u \in W_s^{2N}(\Omega)$ e verificanti su $\partial\Omega$ -S le condizioni del problema (I).

Vale il seguente

LEMMA 3

Se $a_\alpha \in C^0(\bar{\Omega})$ per $\langle \alpha, q \rangle = 2N$, $\sigma^{2N - \langle \alpha, q \rangle} a_\alpha \in L^\infty(\Omega)$
 per $\langle \alpha, q \rangle < 2N$, $b_\alpha \in C^0(\bar{\Omega})$ per $|\alpha| = 2M_0 + 1$,
 $\sigma^{2N - |\alpha|} b_\alpha \in L^\infty(\Omega)$ per $|\alpha| \leq 2M_0$, per ogni $s \in \mathbb{R}$,
 per ogni $\lambda \in]0, +\infty[$, per ogni $\gamma \in [0, 2N]$ e per ogni
 $u \in W_{s+2N}^{2N}(\Omega, \partial/\partial v)$ si ha

$$\sum_{\langle \alpha, q_0 \rangle \leq 2N} |D^\alpha u|_{s + \langle \alpha, q_0 \rangle} + \lambda^{\frac{1}{2}} \sum_{\langle \alpha, q \rangle = N} |D^\alpha u|_{s + \langle \alpha, q \rangle + N - \frac{\gamma}{2}}$$

$$+ \lambda \|u\|_{s+2N-\gamma} \leq k \left(\|A_1 u + \lambda \sigma^{-\gamma} u\|_{s+2N} + \|u\|_s \right),$$

con k indipendente anche da λ ed s .

Per la dimostrazione di questo lemma si osservi innanzitutto che si possono applicare all'operatore A_1 i lemmi 5 e 6 di [3] i quali forniscono le maggiori

$$(14) \sum_{\langle \alpha, q \rangle = 2N} \|D_x^\alpha u\|_{L^2(G_r)} + \|D_y^{2M_0+1} u\|_{L^2(G_r)} + \lambda^{\frac{1}{2}} \sum_{\langle \alpha, q \rangle = N} \|D^\alpha u\|_{L^2(G_r)} +$$

$$+ \lambda \|u\|_{L^2(G_r)} \leq k \left(\|A_1 u + \lambda u\|_{L^2(G_{r_0})} + \|u\|_{L^2(G_{r_0})} \right)$$

essendo G_r una sfera o una semisfera, $r < r_0$ e k indipendente da λ . Poggiando sulla (14) si perviene alla tesi utilizzando la tecnica usata nel Lemma 12.3. di [8]; in proposito si osservi che in questo caso la trasformazione utile è la seguente

$$(15) \quad \begin{aligned} x - x_0 &= \sigma(x_0, y_0) (x' - x_0) \\ y - y_0 &= \sigma^{\frac{2N}{2M_0+1}}(x_0, y_0) (y' - y_0), \end{aligned}$$

e l'operatore ausiliario, indicato con u^* la funzione trasformata di u mediante le (15), è

$$A_1^{(6)}(x', y'; D) = \left(\frac{\sigma^{**}(x', y')}{\sigma(x_0, y_0)} \right)^{\gamma} \sum_{\langle \alpha, q \rangle \leq 2N} \frac{\sigma^{2N - \langle \alpha, q \rangle}}{\sigma(x_0, y_0)} a_{\alpha}^{**}(x', y') D_{\alpha}^{\dot{+}} +$$

$$+ \sum_{|\alpha| \leq 2M_0 + 1} \sigma^{2N - |\alpha|} (x_0, y_0) b^{**}(x', y') D_{\alpha}^{\alpha}.$$

Per la dimostrazione dei *TEOREMI 1 e 2* si tenga conto del *Lemma 1* di [3]; allora, dal *LEMMA 1* segue, per $\lambda \geq \frac{k_2}{k_1}$, per $u \in W_N^{2N}(\Omega, \partial\Omega)$

$$(16) \quad |u|_N^2 \leq k_1 \left(a(u, u) + \lambda \sigma^{-\gamma}(u, u) \right) \leq k |Au + \lambda \sigma^{-\gamma}u|_N |u|_{-N}$$

e dal *LEMMA 3* per $s = -N$ si deduce

$$(17) \quad \sum_{\langle \alpha, q \rangle \leq 2N} |D^{\alpha}u|_{\langle \alpha, q \rangle - N} \leq k \left(|Au + \lambda \sigma^{-\gamma}u|_N + |u|_{-N} \right)$$

Dalle (16) e (17) segue la (1). Alla stessa maniera, utilizzando il *LEMMA 2* con $s = -N$ al posto di s ed il *LEMMA 3* con $s = -2N$ al posto di s , si prova la (2).

Le (1) e (2) permettono di completare le dimostrazioni per mezzo degli stessi ragionamenti fatti da [8] per dimostrare ivi la prima parte del *Teorema 14.2*.

N.2 Si consideri l'operatore

$$B(x,y;D): u \in W_s^{2N}(\Omega, \partial/\partial v) \subseteq L_{s-2N}^2(\Omega) \longrightarrow -\sigma^{2N} Au \in L_{s-2N}^2(\Omega).$$

Si prova il seguente

TEOREMA 3

L'operatore B è generatore infinitesimale di un semigruppò di classe C_0 in ciascuno dei seguenti casi:

- 1.- valgono le ipotesi i), ii) e $s = N$;
- 2.- valgono le ipotesi i), ii), iii), $M_0 = 0$ e $s \in [N-s_0, N+s_0]$ per un opportuno $s_0 \in]0, 2^{-1}[$.

Dim. Per ogni s reale lo spazio $W_s^{2N}(\Omega, \partial/\partial v)$ è denso in $L_{s-2N}^2(\Omega)$; infatti per ogni $u \in L_{s-2N}^2(\Omega)$ esiste una successione di funzioni $u_k \in C_0^\infty(\Omega)$ tale che $\lim \| \sigma^{s-2N} u - u_k \|_{L^2(\Omega)} = 0$, quindi la successione di funzioni

$$w_k = \sigma^{2N-s} u_k \in C_0^\infty(\Omega) \subseteq W_s^{2N}(\Omega, \partial/\partial v)$$

è tale che

$$\| u - w_k \|_{L_{s-2N}^2(\Omega)} = \| \sigma^{s-2N} u - u_k \|_{L_{s-2N}^2(\Omega)}$$

e quindi

$$\lim \|u - w_k\|_{L^2_{s-2N}(\Omega)} = 0.$$

L'operatore B è chiuso. Infatti, sia $\{u_k\}$ una successione di funzioni appartenenti a $W_s^{2N}(\Omega, \partial/\partial v)$ tale che

$$\lim \|u_k - u\|_{L^2_{s-2N}(\Omega)} = 0 \quad \text{e} \quad \lim \|Bu_k - v\|_{L^2_{s-2N}(\Omega)} = 0.$$

Per le (1) e (2), per $\gamma = 2N$, in corrispondenza ai casi 1.- e 2.- rispettivamente, si ottiene:

$$\begin{aligned} (18) \quad \|u_k - u_h\|_{W_s^{2N}(\Omega)} &\leq \|Au_h - Au_k + \lambda \sigma^{2N}(u_h - u_k)\|_{L^2_s(\Omega)} = \\ &= \|\sigma^{2N}Au_h - \sigma^{2N}Au_k + \lambda(u_h - u_k)\|_{L^2_{s-2N}(\Omega)} \leq \\ &\leq k \left(\|Bu_h - Bu_k\|_{L^2_{s-2N}(\Omega)} + \|u_h - u_k\|_{L^2_{s-2N}(\Omega)} \right). \end{aligned}$$

Poichè lo spazio $W_s^{2N}(\Omega, \partial/\partial\nu)$ è chiuso⁽¹⁾, dalla (18) segue $u \in W_s^{2N}(\Omega, \partial/\partial\nu)$ e dalle i) e ii) si deduce poi $Bu = v$.

Dai *TEOREMI 1 e 2*, rispettivamente nei casi 1.- e 2.-; segue poi che l'operatore $-B+\lambda I$ è invertibile. Infatti, per ogni $f \in L_{s-2N}^2(\Omega)$ esiste un'unica $u \in W_s^{2N}(\Omega, \partial/\partial\nu)$ tale che

$$Au + \lambda \sigma^{-2N} u = \sigma^{2N} f$$

e quindi tale che $-Bu + \lambda u = f$.

Infine, applicando il *LEMMA 1* per il caso 1.- ed il *LEMMA 2* con $s - N$ al posto di s per il caso 2.-, si ottiene:

$$\begin{aligned} & \| -Bu + \lambda u \|_{L_{s-2N}^2(\Omega)} \cdot \| u \|_{L_{s-2N}^2} = \\ & = \| \sigma^s Au + \lambda \sigma^{s-2N} u \|_{L^2(\Omega)} \cdot \| \sigma^{s-2N} u \|_{L^2(\Omega)} \geq \\ & \geq (Au, \sigma^{2(s-N)} u) + \lambda \| u \|_{L_{s-2N}^2}^2 = \end{aligned}$$

(1) Cfr. *Lemma 1* di [3].

$$= a_{s-N}(u, u) + \lambda \|u\|_{s-2N}^2 \geq (\lambda - k_2) \|u\|_{s-2N}^2$$

da cui

$$\| -Bu + \lambda u \|_{L^2_{s-2N}(\Omega)} \geq (\lambda - k_2) \|u\|_{L^2_{s-2N}(\Omega)}$$

Da tutto quanto precede, per il *Teorema di HILLE* e *PHILLIPS*⁽¹⁾, la tesi è provata.

Come è noto⁽²⁾, dal *TEOREMA 3* segue che nelle stesse ipotesi il seguente problema

$$D_t u(x, y, t) - Bu(x, y, t) = f(x, y, t) \quad (x, y, t) \in X \times Y \times]0, T[$$

(II)

$$u|_{t=0} = u_0 \in W_s^{2N}(\Omega, \partial/\partial\nu)$$

è univocamente risolubile nello spazio

$$L^2\left(]0, T[; W_s^{2N}(\Omega, \partial/\partial\nu)\right)$$

(1) Cfr. ad es. [9] .

(2) Cfr. ad es. [6] , [9] .

BIBLIOCRAFIA

- [1] R.A.ADAMS, *Sobolev Spaces*, Pure and Appl. Math., Ser.of Monog., 65, New-York, 1975.
- [2] S.ACMON, *Lectures on elliptic boundary value problems*, Van Nostrand Mathematical Studies, Princeton, 1965.
- [3] L. CASTELLANO, *Teoremi di esistenza e unicit  per alcune classi di equazioni ellittico-paraboliche di ordine $2N$* , Ricerche di Mat., Vol.XXVI,(1977), 177-198.
- [4] G. COLAPS, *Un problema al contorno per una equazione ellittico-parabolica di ordine $2k$* , La Ricerca, Vol. XXXI, (1980), 1-24.
- [5] E. GIUSTI, *Equazioni quasi-ellittiche e spazi $L^{p, \nu}(\Omega, \delta)$* , Ann.di Mat., Vol.75 (1967), 313-353.
- [6] J.L.LIONS - E.MAGENES, *Probl mes aux limites non homog nes et applications*, Dunod Editeur, Paris, 1967.
- [7] J.NEC S, *Les Methodes directes en th orie des equations elliptiques*, Masson et Cie, Editeurs, Paris, 1967.
- [8] M.TPOISI, *Problemi al contorno con condizioni omogenee per le equazioni quasi-ellittiche*, Ann. di Mat.Vol.90 (1971), 331-412.
- [9] K.YOSIDA, *Functional Analysis*, Springer - Verlag, Berlin New-York, 1968.

La presente nota   stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci D. Greco, G. Cimmino, C. Ciliberto.

POLIMERIZZAZIONE ISOTATTICA DEL PROPILENE:
 ANALISI MEDIANTE R.M.N. DEL ^{13}C DEI GRUPPI TERMINALI,
 DERIVANTI DALL'INIZIAZIONE SU LEGAMI $\text{Mt-C}_6\text{H}_5$, E DEL
 RELATIVO COMPOSTO MODELLO.

Nota di Vincenzo Piscitelli ⁽¹⁾

Presentata dal Socio Paolo Corradini

Adunanza del 10/12/1983

Riassunto: È stato polimerizzato il propilene con catalizzatori Ziegler-Natta isospecifici iniziando la reazione su legami $\text{Mt-C}_6\text{H}_5$.

I gruppi terminali relativi all'iniziazione sono stati analizzati con la r.m.n. del ^{13}C . [8] as
 segnazioni dei chemical shifts sono state fatte per confronto con gli spettri r.m.n. del ^{13}C
 di un appropriato composto modello: 2-fenil-4,6-dimetileptano.

In tal modo si è potuto concludere che, anche in questo caso, l'inserzione è primaria e che è
 da escludere l'esistenza di un meccanismo carbenico implicante la migrazione reversibile di un
 idrogeno metileno al metallo del sito catalitico. Inoltre si è potuto stabilire che i metili
 della prima e della seconda unità propilenica entrate in catene iniziate su legami $\text{Mt-C}_6\text{H}_5$ si
 trovano in una relazione spaziale di tipo isotattico.

Abstract: Propylene has been polymerized with isospecific Ziegler-Natta catalysts initiating
 the polymerization on $\text{Mt-C}_6\text{H}_5$ bonds.

The end groups arising from initiation have been analyzed by ^{13}C nmr and the observed reso-
 nances have been assigned by comparison with a model compound.

It has been determined that the insertion of the first monomer unit on the $\text{Mt-C}_6\text{H}_5$ bonds is
 primary and isotactic specific.

Of course no carbene intermediates can be involve in the initiation.

Premessa : Nelle reazioni di poliaddizione vengono tradizionalmente distinti un
 processo di iniziazione di catena, uno di propagazione, uno o più di trasferimen-
 to e/o di terminazione.

Nel caso della polimerizzazione Ziegler-Natta delle α -olefine, l'estremità reat-
 tiva delle catene crescenti è costituita da un legame metallo di transizione-car-
 bonio sul quale si inseriscono via via successive molecole di monomero. Per la
 polimerizzazione isotattica del propilene, il processo di propagazione è descrit-
 to dall'equazione



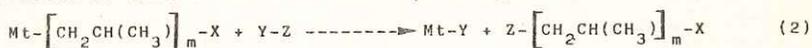
dove Mt è il metallo di transizione legato alla catena polimerica crescente, n è
 il grado di polimerizzazione, X è il sostituito legato al metallo prima dell'i-
 niziazione di catena.

1) Istituto Chimico-Via Mezzocannone 4 Napoli; l'argomento della presente nota è stato l'ogget-
 to della tesi di laurea in Chimica Industriale di Vincenzo Piscitelli.

X può essere un atomo di idrogeno o un radicale alchilico, aralchilico o arilico a seconda della composizione del sistema catalitico. Per esempio si possono ottenere sistemi catalitici per la polimerizzazione isotattica delle α -olefine, mescolando in un mezzo idrocarburico, del $TiCl_3$ violetto con composti organometallici dell'alluminio di tipo AlR_3 (dove R è un gruppo alchilico, arilico o aralchilico). In questi casi il processo di iniziazione avviene su legami Mt-R preformati per reazione tra $TiCl_3$ e AlR_3 ed il gruppo R(X) può essere osservato con opportuni metodi spettroscopici sull'estremità destra della catena.

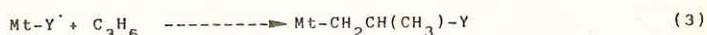
Secondo quanto proposto in letteratura l'estremità destra della catena è definita coerentemente con l'assunzione (arbitraria) che il metallo sia situato sulla estremità sinistra della catena stessa o in modo equivalente assumendo che la catena cresca da destra verso sinistra.

I processi di trasferimento di catena sono rappresentabili con l'equazione



dove Y-Z è un opportuno trasferitore di catena cinetica e dove X, Y e Z possono essere uguali o diversi tra loro.

Il processo (2) è seguito da un nuovo processo di iniziazione su legame Mt-Y secondo l'equazione



I composti organometallici dello zinco di tipo ZnR'_2 (dove R' è un gruppo alchilico, arilico o aralchilico) sono efficaci trasferitori di catena. In tal caso il trasferimento di catena è rappresentabile con l'equazione



Per tale motivo, quando si desidera ottenere un polimero di peso molecolare medio modesto si può ricorrere ad un sistema catalitico di tipo $TiCl_3-AlR_3-ZnR'_2$.

Inoltre se si fa in modo che $R=R'$ il processo di iniziazione e quello di riiniziazione, ovvero la nuova iniziazione che segue il trasferimento di catena cinetica divengono identici, come lo saranno anche i corrispondenti gruppi terminali di catena destri.

Meccanismo di controllo sterico ed iniziazione : La caratteristica più preziosa dei catalizzatori Ziegler-Natta è la loro capacità di controllare la struttura sterica delle macromolecole.

Il meccanismo di controllo sterico può essere studiato relativamente al processo di propagazione di catena attraverso l'analisi delle sequenze stereochimiche della catena polimerica, oppure relativamente al processo di iniziazione analizzando la struttura stereochimica dei gruppi terminali destri.

La propagazione e l'iniziazione differiscono solo per la natura del gruppo alchilico legato al metallo del sito attivo. Si può osservare che, a causa della struttura ripetitiva della catena stessa, lo studio del processo di propagazione risulterà tanto più facile, sul piano sperimentale, quanto più alto è il peso mole

colare medio numerale.

L'informazione ricavabile dallo studio della propagazione è limitata dal fatto che i gruppi alchilici a cui il monomero si addiziona sono costituiti da gruppi polimerici di grado di polimerizzazione statisticamente variabili, ma praticamente indistinguibili tra loro per quanto riguarda la reattività ed in particolare il comportamento in rapporto alla stereochimica di addizione al monomero.

Lo studio della iniziazione di catena è più difficile sia per la scarsa frequenza dei gruppi terminali destri (tanto più scarsa quanto maggiore è il peso molecolare medio numerale), sia perchè l'analisi spettroscopica richiede la disponibilità di prodotti modello di struttura nota per ogni X che si vuole esaminare. Tuttavia la possibilità di variare la struttura di X entro ampi margini e di osservare l'effetto sul decorso stereochimico dell'addizione del monomero rappresenta una fonte insostituibile di informazione meccanicistica.

Nella letteratura più recente è riportato lo studio, via r.m.n. del ^{13}C , della stereochimica di iniziazione della polimerizzazione isotattica del propilene su legami $\text{Mt-}^{13}\text{CH}_3$, $\text{Mt-}^{13}\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{Mt-CH}_2\text{CH}(^{13}\text{CH}_3)\text{CH}_3$, del butene-1 su legami $\text{Mt-}^{13}\text{CH}_3$ ¹⁾ e della stereochimica di iniziazione della polimerizzazione isotattica stereoselettiva del 3-metil-1-pentene su legami $\text{Mt-}^{13}\text{CH}_3$.²⁾

Si è potuto stabilire che l'inserzione del 3-metil-1-pentene è diastereoselettiva indipendentemente dalla struttura del sito catalitico, che il decorso isotattico della polimerizzazione delle α -olefine è dovuta all'asimmetria dei siti catalitici, che l'addizione del monomero è variamente soggetta a controllo sterico a seconda del gruppo alchilico legato al metallo del sito catalitico. Più precisamente, nel caso del propilene, l'inserzione su Mt-CH_3 non è stericamente controllata, l'inserzione su $\text{Mt-C}_2\text{H}_5$ lo è parzialmente, l'inserzione su $\text{Mt-CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ lo è in maniera pressoché completa.

Nonostante il successo delle ricerche qui citate brevemente molti problemi riguardanti il meccanismo di polimerizzazione rimangono tuttavia aperti. In particolare quanto menzionato sull'influenza di R rispetto alla addizione del monomero successivo può significare che il controllo sterico dell'addizione è intermedio dalle interazioni steriche tra il monomero entrante ed il carbonio B rispetto al metallo del gruppo alchilico.³⁾

Alternativamente la variabilità del controllo sterico in funzione di R potrebbe genericamente essere legata all'ingombro sterico crescente, nella sfera di coordinazione di Mt, passando da CH_3 a C_2H_5 a $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

Un secondo problema meccanicistico tuttora aperto riguarda il meccanismo di incorporazione del monomero che potrebbe avvenire via addizione del legame σ Mt-R al legame π del monomero,^{4) 5)} oppure come proposto da alcuni autori via migrazione reversibile dell'idrogeno B (fig. 1).^{6) 7)}

Questo lavoro si propone appunto di contribuire alla definizione di questi ultimi

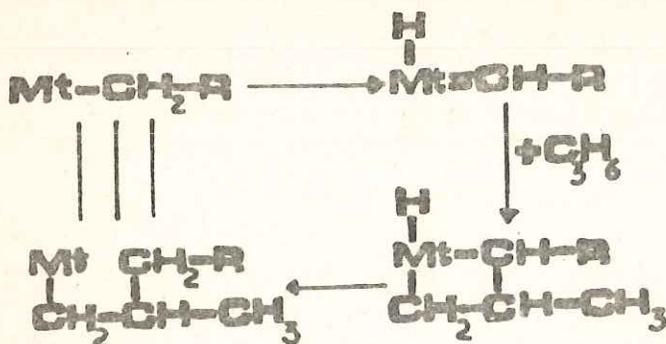


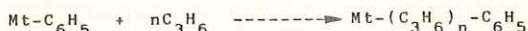
Fig. 1: Mt-atomo di metallo del complesso catalitico; R=cadena polimerica. H migra al carbonio più sostituito dell'intermedio metal-ciclobutanico.

mi problemi.

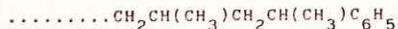
In particolare abbiamo studiato l'iniziazione su legami metallo-fenile che consente di escludere che l'addizione avvenga attraverso un meccanismo carbenico e di osservare l'influenza di due carboni β rispetto al metallo sulla stereochimica di addizione.

Lo studio è stato possibile via r.m.n. del ^{13}C dei terminali di catena destri ed ha comportato la sintesi e la caratterizzazione di un appropriato composto modello: 2-fenil-4,6-dimetileptano.

Gruppi terminali fenilici: Supponendo che la polimerizzazione isotattica del propilene avvenga attraverso inserzione primaria e inizi su un legame reattivo metallo fenile (come quello che si presume presente nei siti attivi del sistema catalitico da noi usato)



la struttura dei gruppi terminali destri, ovvero quelli formatisi nell'iniziazione stessa, sarà



Abbiamo perciò preparato un campione di polipropilene impiegando il sistema catalitico $\text{TiCl}_3\text{-Zn}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$ e lo abbiamo frazionato per estrazione con solventi di punto di ebollizione crescente: A) etere etilico, B) n-esano, C) n-eptano, D) n-ottano.

Come è noto questo tipo di estrazione consente di separare il polipropilene in frazioni di stereoregolarità e peso molecolare crescenti all'aumentare della temperatura di estrazione.

Le diverse frazioni sono state esaminate via r.m.n. del ^{13}C . Negli spettri di r.m.n. delle frazioni solubili rispettivamente in A) etere etilico, B) n-esano, C) n-eptano bollenti si sono osservate, oltre alle risonanze dei carboni metilici, metilenici e metinici del propilene, deboli risonanze attribuibili alla presenza di carboni aromatici

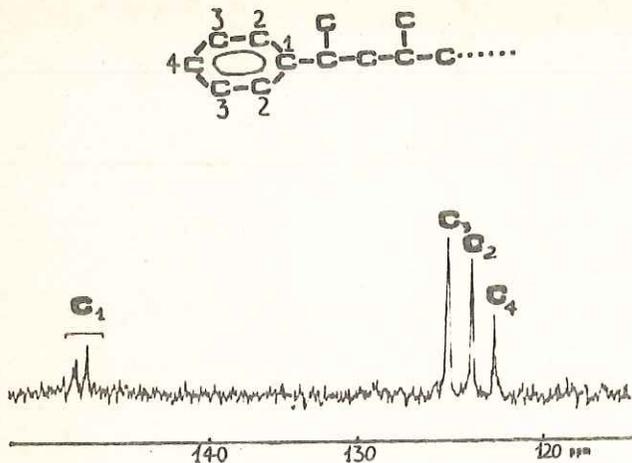


Fig. 2: Spettro di r.m.n. del ^{13}C della regione aromati- ca della frazione solubile in etere etilico bollente A). In figura sono riportate le assegnazioni delle risonanze dei carboni del fenile monosostituito.

Ad esempio esaminando l'amplificazione relativa alla regione aromatica dello spettro della frazione A (fig. 2) si possono osservare tre picchi di risonanza a 126,2₃, 124,8₈, 123,6₅ p.p.m.* di intensità relativa 2/2/1/ e due ulteriori picchi di intensità minore a 145,6 e 146,2 p.p.m. La bassa intensità delle risonanze considerate ed il fatto che essa diminuisce ulteriormente nelle frazioni a peso molecolare più elevato suggerisce che effettivamente esse possono essere dovute alla presenza di gruppi terminali aromatici. Inoltre la presenza di risonanze aventi i chemical shifts sopra riportati e le intensità relative indicano la presenza di nuclei benzenici monosostituiti.

Per confronto con gli spettri di benzeni monosostituiti si possono attribuire le due più deboli risonanze a campo basso al carbonio aromatico sostituito (C_1), la risonanza a 124,8₈ p.p.m. ai carboni orto (C_2), e le risonanze a 126,2₃ e 123,6₅ p.p.m. rispettivamente ai carboni meta (C_3) e para (C_4).

E' pertinente notare che, in analogia con quanto osservato per altri gruppi terminali,¹⁾ nei gruppi terminali fenilici ci si aspettava di osservare che il chemical shift del C_1 fosse sensibile all'intorno stereochimico e più precisamente alla configurazione relativa del carbonio fenil sostituito e del carbonio metil sostituito adiacente.

In effetti la frazione osservata è scarsamente stereoregolare e nella regione del C_1 si osservano due risonanze che potrebbero essere attribuite alla presenza di due differenti intorni stereochimici (R,R-S,S) e (R,S-S,R) del gruppo terminale fenilico.

Nelle frazioni B e C più altamente stereoregolari (fig. 3) si può osservare la scomparsa della risonanza a 146,2 p.p.m.

Questo fatto suggerisce che nelle frazioni stereoregolari anche i gruppi terminali siano stereoregolari o in altre parole che l'ingresso di una molecola di mono-

* Tutti i chemical shifts sono misurati rispetto a HMDS

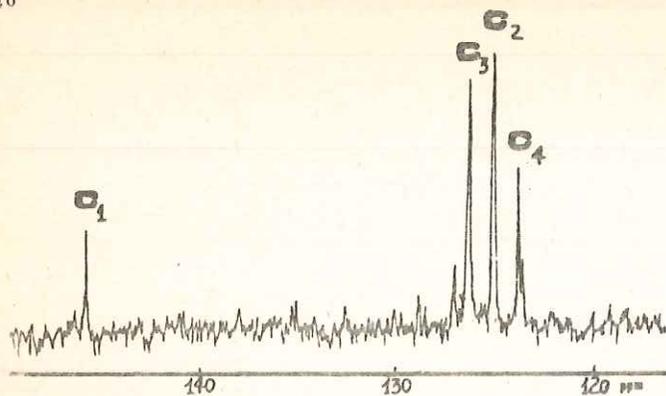
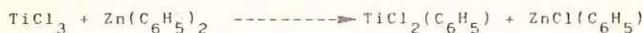


Fig. 3: Spettro di r.m.n. del ^{13}C della regione aromatica della frazione B solubile in esano bollente. In figura sono riportate le assegnazioni delle risonanze dei carboni del fenile monosostituito.

mero sul legame metallo fenile dei siti attivi isotattici è stereospecifica, così come lo è per l'ingresso su legami metallo-alchile primario.⁸⁾

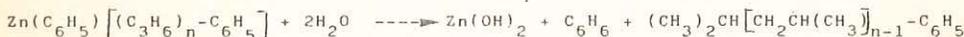
Le assegnazioni qui sopra riportate sono state confermate e completate mediante lo studio di un opportuno composto modello come riportato nella sezione seguente. Si può ancora osservare che i gruppi fenilici dovrebbero provenire sia dall'arilazione superficiale del TiCl_3 da parte del cocatalizzatore organometallico



sia dalla reazione di trasferimento di catena



Alla fine della polimerizzazione i legami metallo-carbonio vengono idrolizzati con conseguente formazione di gruppi terminali sinistri isobutilici



Nella frazione insolubile in n-eptano i segnali attribuiti ai gruppi terminali non sono rilevabili a causa del troppo elevato peso molecolare.

2-fenil-4,6-dimetileptano: Le osservazioni riportate nella sezione precedente sono subordinate alla correttezza dell'assegnazione delle risonanze del ^{13}C considerate.

E' necessario quindi confermarle per confronto con un adatto composto modello.

Il 2-fenil-4,6-dimetileptano è il più semplice modello dei gruppi terminali considerati, infatti esso replica la struttura dei gruppi terminali ipotizzati fino alla distanza di 6 legami dal carbonio aromatico sostituito. In tal modo è garantito un accurato confronto tra i chemical shifts dei carboni aromatici diagnostici nel polimero e nel composto modello stesso.

La presenza di due carboni asimmetrici consente inoltre di rilevare l'effetto dell'intorno stereochimico sul chemical shift del carbonio aromatico sostituito. Pertanto abbiamo sintetizzato, come descritto nella parte sperimentale, un campione di 2-fenil-4,6-dimetileptano facendo reagire acetofenone e 2,4-dimetilpentillitio e riducendo ad idrocarburo il risultante carbinolo (2-fenil-4,6-dimetileptan-2-olo).

In tal modo si è ottenuta una miscela diastereomerica di composizione 60 % e 40 %. La composizione della miscela diastereomerica è stata valutata via G.L.C. e si è potuto osservare che il diastereomero più altobollente era il più abbondante. Infine si è effettuata l'analisi di r.m.n. del ^{13}C della stessa miscela diastereomerica. Lo spettro relativo è riportato in figura 4 per la parte relativa ai carboni alifatici ed in figura 5 per la parte relativa ai carboni aromatici.

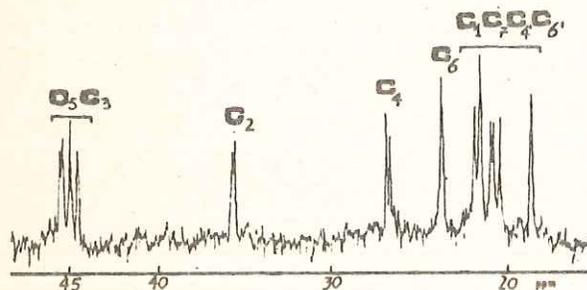
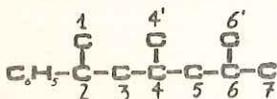


Fig. 4: Spettro di r.m.n. del ^{13}C del composto modello relativo alla regione alifatica.

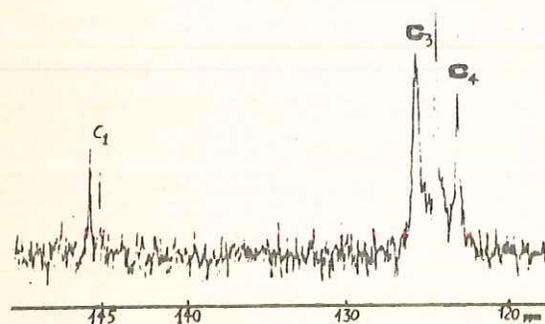
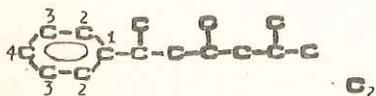


Fig. 5: Spettro di r.m.n. del ^{13}C del composto modello relativo alla regione aromatica.

Lo spettro relativo ai carboni alifatici è quello aspettato per la miscela dei due diastereomeri considerati. In particolare i chemical shifts osservati sono quelli prevedibili con le regole di additività del chemical shift del ^{13}C di Lindeman e Adams,¹⁰⁾ nove per ciascun diastereomero. Le assegnazioni delle diverse risonanze sono riportate in figura. La presenza di due diastereomeri è confermata dalla presenza di quindici risonanze risolte su un totale di diciotto. La diversa concentrazione dei due diastereomeri valutata via G.L.C. trova riscontro nella diversa intensità dei doppietti dei carboni omologhi dei due diastereomeri (per esempio C_3 , C_5 , C_4 , C_2).

Confrontando i chemical shifts dei carboni C_3 , C_5 , C_4 , C_2 nei due diastereomeri, identificati sulla base della intensità relativa con le regole di additività del chemical shift stereochimico proposte per idrocarburi alifatici metil sostituiti; ⁹⁾ si può arrivare alla conclusione che il diastereomero più abbondante è il (2R,4S) (2S,4R).

Per quanto riguarda la parte relativa ai carboni aromatici si può osservare in primo luogo la perfetta coincidenza dei chemical shifts osservati nel modello con quelli osservati nelle frazioni polimeriche, in secondo luogo si può osservare che il chemical shift del carbonio aromatico sostituito è sensibile all'intorno sterico (146,5 p.p.m. e 145,9 p.p.m. per gli isomeri (2R,4S) e (2S,4S) rispettivamente) ed infine che l'intorno stereochimico del carbonio aromatico sostituito dei gruppi terminali delle frazioni di polimero B e C (prevalentemente isotattiche) è lo stesso che si ha nel diastereomero meno abbondante. (ovviamente nel polimero saranno presenti le coppie enantiomere di ciascun terminale diastereomero visto che il polimero nel suo complesso è otticamente inattivo e che gli enantiomeri sono indistinguibili all'analisi di r.m.n.).

Parte sperimentale

2-fenil-4,6-dimetileptano: il 2-fenil-4,6-dimetileptano è stato sintetizzato attraverso una sintesi malonica tra bromuro di isobutile e dietilmetilmalonato; l'acido ottenuto è stato ridotto ad alcool e questo trasformato in cloro derivato. L'alogeno derivato è stato trasformato in litio derivato e questo è stato fatto reagire con acetofenone ed il carbinolo risultante è stato ridotto ad idrocarburo.

Per i singoli passaggi si è operato come descritto in letteratura.^{11,12,13,14,15} I prodotti di reazione sono stati analizzati via G.L.C. e quindi separati dai prodotti secondari, in questo modo si sono ottenuti 71 mg di miscela diastereomerica.

Gli spettri di massa ed i cromatogrammi dei due diastereomeri sono riportati in figura 6 per il diastereomero più abbondante ed in figura 7 per il diastereomero

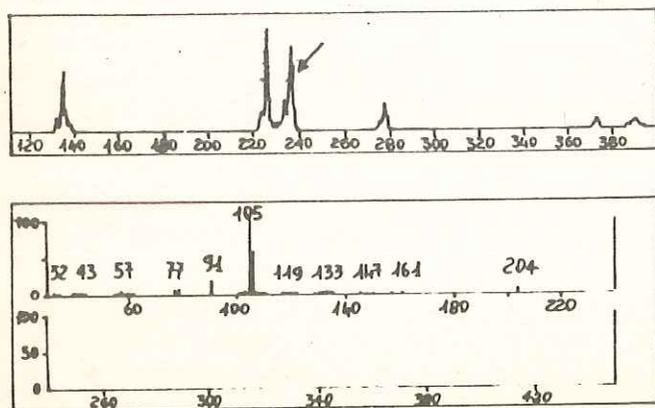


Fig. 6: Spettro di massa e relativo cromatogramma del diastereomero più abbondante.

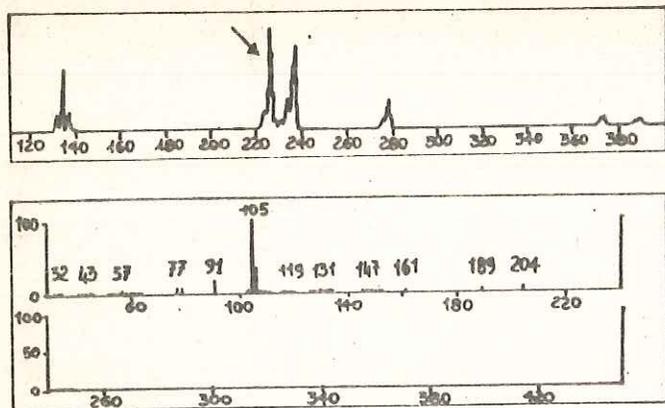


Fig. 7 Spettro di massa e relativo cromatogramma del diastereomero meno abbondante.

meno abbondante.

Si può notare un picco molecolare a $m/e = 204$ come era da aspettarsi per i due diastereomeri ($M_n = 204$), oltre ad un picco a $m/e = 105$ dovuto alla frammentazione principale. Inoltre si può notare la perfetta similitudine dei due spettri. Gli spettri di massa sono stati fatti con un Hewlett Packard 5985 B con colonna capillare SE54. La temperatura è stata mantenuta a 150°C per 2 minuti, poi da 150°C a 280°C con aumento di $3^\circ\text{C}/\text{minuto}$. L'intervallo di scansione è stato $m/e = 30-450$.

Polimerizzazione del propilene: la polimerizzazione è stata eseguita in autoclave basculante da 500 ml a 75°C , con una pressione parziale di propilene di 3 atm, usando il seguente sistema catalitico: $\text{Zn}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$ ($3,7 \cdot 10^{-2}$ mol) e TiCl_3 ($3,7 \cdot 10^{-2}$ mol) sospeso in 150 ml di toluene anidro.

Dopo 48 ore la polimerizzazione è stata interrotta mediante aggiunta di metanolo acidulato con HCl. Il polimero è stato coagulato in un eccesso di metanolo, filtrato e ripetutamente lavato con metanolo fresco ed essiccato sotto vuoto a 70°C . Si sono ottenuti 14,5 g di polipropilene.

Frazionamento del polimero: il polimero è stato frazionato mediante estrazioni successive con etere etilico, n-esano, n-eptano, n-ottano bollenti in estrattore Kumagawa; le estrazioni sono state operate ad esaurimento.

Si sono ottenute le seguenti percentuali di polimero estratto:

Estratto eterico	18,3 %
" esanico	6,4 %
" eptanico	7,8 %
" ottanico	32,1 %
Residuo	35,4 %

Spettri di r.m.n. del ^{13}C : le frazioni del polimero ed il composto modello sono state esaminate via r.m.n. del ^{13}C a 110°C con uno spettrometro Bruker HX-90 operante a 22,63 MHz con il metodo della trasformata di Fourier. I campioni sono sta

ti preparati sciogliendo il polimero (80-250 mg) ed il composto modello (71 mg) in 1,2-dideutero-tetracloroetano ($C_2D_2Cl_4$) contenente 1 % di esametildisilossano (HMDS) come riferimento interno.

Conclusioni. I catalizzatori isotattici specifici per la polimerizzazione delle α -olefine sono eterogenei, per cui uno studio diretto della loro struttura è pressochè impossibile, o quanto meno non ha dato risultati apprezzabili dal punto di vista meccanicistico dopo 30 anni di ricerca. Per conto sono stati proposti diversi possibili modelli di siti attivi sulla base di considerazioni indirette quali la struttura cristallina dei componenti solidi del catalizzatore. Un modo di valutare i diversi modelli come pure di diminuire i gradi di libertà della speculazione meccanicistica è l'osservazione del decorso stereochimico del monomero sui legami metallo-carbonio dei siti attivi al variare del radicale organico. Questo approccio è del tutto analogo allo studio dell'effetto sostituente nelle reazioni organiche. In questa ottica era stata studiata in precedenti lavori della letteratura la struttura di catene poliolefiniche omopolimeriche e la struttura di gruppi terminali isobutilici, isoamilici, 2,4-dimetilpentilici, 2,3-dimetilpentilici. Si era concluso che l'inserzione del monomero era sempre primaria e che l'ingresso del monomero era soggetto a controllo sterico variabile con la struttura del radicale organico.

I motivi per cui abbiamo scelto di studiare l'inserzione su legami metallo-fenilici sono sostanzialmente tre. In primo luogo l'ingombro sterico di un radicale fenilico poteva forzare il monomero ad un tipo di inserzione secondaria, come avviene nella polimerizzazione sindiotattica del propilene. Confrontando lo spettro del ^{13}C dei gruppi terminali del polimero con quello del 2-fenil-4,6-dimetilheptano abbiamo potuto concludere che l'inserzione del monomero rimane primaria. In secondo luogo è stato proposto che l'inserzione del monomero possa decorrere con un meccanismo carbenico implicante la migrazione reversibile di un idrogeno metilenico al metallo del sito attivo catalitico ^{6,7)} (fig. 1). Questa possibilità è senz'altro da escludere, una volta osservato semplicemente che l'inserzione può avvenire su un gruppo fenilico, il quale ovviamente non può dare luogo a migrazioni siffatte.

Infine volevamo vedere se la presenza di un radicale organico molto ingombrato per la presenza di 2 carboni β rispetto al metallo poteva annullare o sovvertire il tipo di controllo sterico. Infatti, secondo un modello di sito attivo proposto recentemente, ¹⁶⁾ il controllo sterico isotattico deriverebbe dalle interazioni steriche tra il sostituente del monomero ed il carbonio β rispetto al metallo della catena polimerica crescente. Si poteva pertanto aspettarsi la perdita di controllo sterico o addirittura un controllo sterico diverso per un radicale organico caratterizzato dalla presenza di 2 anzichè un solo carbonio β .

Anche in questo caso abbiamo potuto concludere che il controllo sterico permane

di tipo immutato dato che la relazione spaziale tra i metili della prima e della seconda unità propilenica entrate in catene iniziate su legami $Mt-C_6H_5$ è di tipo isotattico.

Ringrazio i Dr. M.C. Sacchi e P. Locatelli dell'I.C.M. del CNR per il sostanziale aiuto fornitomi nello svolgimento della Tesi.

Bibliografia e Note

- 1) A. Zambelli, Locatelli P., Sacchi M.C., Zannoni G.; *Macromolecules*: 1982, 15, 211
- 2) Zambelli A., Ammendola P., Locatelli P., Sacchi M.C., Zannoni G.; *Macromolecules*: 1983, 16, 341
- 3) Corradini P., Barone V., Guerra G.; *Macromolecules*: 1982, 15, 1242
- 4) Cossee P.; *Tetrahedron Lett.*: 1960, 12
- 5) Boor J.; *Macromol. Rev.*: 1967, 2, 115
- 6) Ivin K.J. e altri; *Journ. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 1978, 604
- 7) Ivin K.J.; *Proc. Eur. Symp. Polym. Spectr.*: 1978, 11, 261
- 8) Zambelli A., Locatelli P., Sacchi M.C., Tritto I.; *Macromolecules*: 1982, 15, 831
- 9) Zambelli A., Gatti G.; *Macromolecules*: 1978, 11, 485
- 10) Lindeman, Adams; *Am. Chem. Soc. Div. Petr. Chem. Prep.*: 1972, 17, 2
- 11) Odham G.; *Arkiv Kemi*: 1967, 26, 367
- 12) Nyström, R.F., Brown W.G.; *Journ. Am. Chem. Soc.*: 1947, 69, 2548
- 13) Wiley e altri; *Journ. Am. Chem. Soc.*: 1939, 16
- 14) Buhler; *Journ. Org. Chem.*: 1973, 38, 904
- 15) Bell, Brown; *Journ. Am. Chem. Soc.*: 1966, 88, 1473
- 16) Corradini P., Barone V., Fusco R., Guerra G.; *Europ. Polym. Journ.*: 1979, 15, 1133

La presente nota è stata giudicata degna di pubblicazione da una commissione composta dai soci R. Nicolaus, L. Mangoni, P. Corradini.

RELAZIONE SUI LAVORI COMPIUTI

DALL'ACCADEMIA DELLE SCIENZE FISICHE E MATEMATICHE

durante l'anno 1983, letta nell'adunanza del 31 gennaio 1984

dal Socio Vincenzo Leone

Segretario dell'Accademia di Scienze Fisiche e Matematiche

L'Accademia ha tenuto nel corso dell'anno 1983 le consuete 8 adunanze ordinarie, più due straordinarie, sotto la Presidenza del Socio Donato Greco, coadiuvato dai Soci Vicepresidenti Giovanni Chieffi, dal Segretario Vincenzo Leone e dal Tesoriera Riccardo Sersale.

Per la Sezione di Scienze Matematiche sono stati proposti per la nomina a Socio Ordinario il Prof. Salvatore Rionero, a Soci corrispondenti nazionali i Professori Paolo De Lucia, Renato Fiorenza, e Antonio Romano; per la Sezione di Scienze Naturali, a Soci Corrispondenti Nazionali i Professori Giuseppe Caputo, Vittorio Silvestrini e Alessandro Morescalchi, e a Socio Nazionale Ordinario non residente la Prof.ssa Angiola Maria Maccagno.

In riunioni estese ai Soci delle altre Classi della Società, sono stati commemorati il Socio Emerito Carlo Miranda, dal Socio Donato Greco, ed il Socio Ordinario Mario Covello, dal Socio Riccardo Sersale.

Sono state effettuate 35 comunicazioni di lavori da parte dei Soci, 19 per le discipline chimiche, 8 per quelle matematiche, 5 per le Scienze Biologiche e 2 per quelle della Terra.

In particolare, per le discipline chimiche, il Socio Mangoni ha presentato 10 lavori, di cui 2 di M. Adinolfi, G. Barone,

R.Lanzetta, G.Laonigro, M.Parrilli e L.Mangoni su componenti glicosidici e nortriterpenici estratti da bulbi di Muscari comosum, 2 degli stessi AA. sulle reazioni di alogenuri su composti steroidei, e, sempre degli stessi AA., una sui componenti diterpenici di Stachys recta. Gli altri lavori presentati dal Socio Mangoni riguardano: una nota di di R.Caputo, P.Monaco, G.Palumbo, L.Previtera e L.Mangoni sulla debromurazione selettiva di bromuri sostituiti, tre note (una di P.Morrìca, C.D'Ambrosio, I.Behar, e due di P.Morrìca e C.Ferreri) sulle reazioni dei trichetoni ciclici con nucleofili bifunzionali. Il Socio Mangoni ha anche presentato una nota di F.Capasso, P.Morrìca, E.Ramundo, V.Santagada e C.D.Vinciguerra su alcuni derivati naftodiazepinici a potenziale attività biologica. Il Socio Corradini ha presentato una nota di E.Benedetti, E.Broccoli e A.Di Nola, e una di E.Benedetti, E.Broccoli e P.Crimaldi, sulla struttura cristallina di alcune benzamidi sostituite, e una nota di V.Piscitelli sulla polimerizzazione isotattica del propilene. Il Socio Sersale ha presentato una nota di A.Nastro sull'influenza di sodio e potassio sulla sintesi di zeoliti, ed una di P.Ciambelli, V.De Simone e R.Valentino sulla separazione di ossigeno e azoto dell'aria su tufo zeolitico. Il Socio Nicolaus ha presentato due note di A.Bolognese, C.Piscitelli e G.Scherillo su ommocromi naturali e di sintesi, ed una di A.Bolognese e R.Maglione sull'azione di peracidi su trifenodiossazina. Il Socio Leone ha comunicato un lavoro di G.Barone, M.Belardini A.Lanzetta, G.Laonigro e M.Parrilli sulla 7-O-metilpunctatina di Muscari comosum.

Per le Scienze Matematiche, il Socio Ciliberto ha presentato una nota di G.Colaps su un semigruppato generato da un operatore differenziale quasi-ellittico degenero, ed una di O.Fiodo su problemi quasi-ellittici nel semispazio dipendenti da un parametro. Il Socio Franchetta ha comunicato una nota di G.De Simone e G.Di Maio su una classe di assiomi di separazione più deboli di T_1 , e una di L.Di Fiore e S.Freni su alcune proprietà delle varietà di Segre. Il Socio Avantaggiati ha presentato un lavoro di G.Caradonna su alcuni sistemi di equazioni non lineari, e uno di M.Renzi su funzioni assolutamente continue con derivata prima a variazione limitata. Il Socio Curzio ha comunicato una nota di A.Leone e M.May su gruppi finiti non sub-modulari a quozienti propri sub-modulari. Il Socio Buoncristiano ha presentato un lavoro di S.Dragotti su ostruzioni a estendere Δ -sets di strutture differenziabili.

Per le Scienze Biologiche, il Socio Chieffi ha presentato una nota di O.Picariello e M.Paolucci su ricerche elettroforetiche su forme molecolari di esterasi nella ghiandola digerente di alcuni molluschi, e una di A.Gobbetti, A.Polzonetti-Magni, M.Zerani e M.Paolucci sulla sintesi di vitellogenina indotta da estradiolo 17β nella rana verde. Il Socio Ghiara ha presentato un lavoro di M.C.Grimaldi, A.Pica, S.D'Ippolito e F.Della Corte su studi citochimici della pelle delle torpedini. Il Socio De Vincentis ha comunicato un lavoro di A.Pica, M.C.Grimaldi, S.D'Ippolito e F.Della Corte sui valori ematologici e le cellule del sangue di Schylliorbinus stellaris. Il Socio Leone ha presentato due lavori, uno di P.Quesada, G.Pontarelli, A.Meduri, M.Merola e B.Farina sulle ribonucleasi di cellule HeLa, ed un altro di P.Quesada, H.Suzuki e B.Farina sul meccanismo di ADP-ribosilazione della ribonucleasi seminale.

Per le Scienze della Terra, il Socio D'Argenio ha comunicato due lavori, il primo di G. Nardi su studi paleomagnetici dell'ammonitico rosso della Sicilia occidentale, e il secondo di A. Incoronato su ricerche paleomagnetiche sulla formazione di "red flysch" negli Appennini meridionali.

Tutte le Note ora ricordate saranno pubblicate nel volume 51, Serie IV, dei Rendiconti dell'Accademia.

Per l'anno 1984 il Consiglio di Classe è formato dal Presidente G. Chieffi, dal Vicepresidente B. D'Argenio, dal Segretario V. Leone e dal Tesoriere R. Sersale.

I N D I C E

A. Scherillo - Commemorazione di Giuseppe Imbò Commemorazione letta da Antonio Scherillo nell'adunanza del 7 Novembre 1981	Pag. 9
M. Rigutti - Commemorazione di Tito Nicolini (1899-1981) Commemorazione letta da Mario Rigutti nell'adunanza del 6 Febbraio 1982	" 19
V. Leone - Relazione sui lavori compiuti dall'Accademia delle Scienze Fisiche e Matematiche durante l'anno 1983 Letta nell'Adunanza del 31 Gennaio 1984 dal Prof. Vincenzo Leone.....	" 453

Scienze della Terra

S. Di Nocera, B. Russo, M. Torre - I depositi marini del ciclo pliocene inferiore-medio nei dintorni di Vietri di Potenza	" 87
M.T. Quagliariello, G. Napoleone - Dalla revisione del grande terremoto 'napoletano' del 16 Dicembre 1857 un criterio di zonizzazione sismica	" 107
V. Zamparelli, L. Brancaccio, P. Di Girolamo - Nuove considerazioni sul terrazzo marino de 'La Starza' presso Pozzuoli	" 119
A. Incoronato - Paleomagnetic Study of the Red Flysch Formation (Southern Apennines, Italy)	" 337
G. Nardi - Paleomagnetic Evidences of Early Diagenetic Formation of the Ammonitico Rosso of W. Sicily .	" 361

Scienze Chimiche

E. Finamore, L. Minale, M. Ali Mohammed - The Sterols of the Somalian Sponge Plerophysilla Papyracea	" 81
E. Benedetti, E. Broccoli, P. Grimaldi - Restricted rotation in tertiary Amides. The Crystal structure of N-i-Propyl, N-Benzyl-o-Bromobenzamide	" 195
E. Benedetti, E. Broccoli, A. Di Nola - Restricted Rotation in Tertiary Amides. The Crystal Structure of N-i-Propyl, N.-Benzyl-o-Chlorobenzamide	" 203
A. Nastro - Influence of Na or K on the Synthesis of ZSM-5 from Systems Containin TPA and NH ₄	" 211
P. Ciambelli, V. De Simone, R. Valentino - Separation of Oxygen and Nitrogen from air by Zeolitic tuff	" 227

F. Capasso, P. Morrica, E. Ramundo, V. Santagada, C.D. Vinci guerra - Derivati 1,5-Naftodiazepinici a potenziale attività biologica	Pag. 247
M. Adinolfi, G. Barone, R. Lanzetta, G. Laonigro, M. Parril- li, L. Mangoni - Influenza dell'alogeno sulla reazione di for- mazione di epossidi per azione di alogeno e ossido di argento su alcheni trisostituiti steroidici	" 281
M. Adinolfi, G. Barone, R. Lanzetta, G. Laonigro, M. Parril- li, L. Mangoni - Componenti Diterpenici della Stachys Recta L.	" 285
M. Adinolfi, G. Barone, R. Lanzetta, G. Laonigro, M. Parril- li, L. Mangoni - Decorso sterico della addizione di alogenu- ri di iodio all'1-Metil-4-t-Butilcicloesene: influen- za della specie elettrofila	" 289
M. Adinolfi, G. Barone, R. Lanzetta, G. Laonigro, M. Parril- li, L. Mangoni - Struttura di un glicoside estratto dai bul- bi di Muscari Comosum	" 293
M. Adinolfi, G. Barone, R. Lanzetta, G. Laonigro, M. Parril- li, L. Mangoni - Struttura di due nortriterpeni a scheletro lanostanico estratti da bulbi di Muscari Comosum ..	" 295
G. Barone, M. Belardini, R. Lanzetta, G. Laonigro, M. Parril- li - La 7-O-Metil-3,9-Diidropunctatina: un nuovo omoisoflava- none dal Muscar Comosum	" 297
R. Caputo, P. Monaco, G. Palumbo, L. Previtera, L. Mangoni - Selective Debromination of Substituted Vic-Dibromide	" 299
P. Morrica, C. D'Ambrosio, I. Behar - Reazioni di Trichetoni ciclici con nucleofili bifunzionali - I	" 349
P. Morrica, C. Ferreri - Reazioni di Trichetoni ciclici con nucleofili bifunzionali - II	" 353
P. Morrica, C. Ferreri - Reazioni di Trichetoni ciclici con nucleofili bifunzionali - III	" 357
A. Bolognese, R. Maglione - Formazione degli N-Ossidi della Trifenodiossazina per azione dei peracidi: isolamen- to e caratterizzazione	" 405
A. Bolognese, C. Piscitelli, G. Scherillo - Isolamento di un ommocromo fotolabile dagli occhi della "Musca dome- stica". Trattamento con acidi di alcuni composti mo- dello	" 409
A. Bolognese, G. Piscitelli, G. Scherillo - Sulla chimica de- gli ommocromi. Spettri HNMR di 3H-fenossazin-3-oni e fenossazine	" 415
V. Piscitelli - Polimerizzazione isostatica del propilene: analisi mediante R.M.N. del ¹³ C dei gruppi termina- li, derivanti dall'iniziazione sui legami Mt-C ₆ -H ₅ e del relativo composto modello	" 441

Scienze Matematiche

N. Avena, T. De Ruvo - Alcuni teoremi di singolarità eliminabili per soluzioni deboli di equazioni non lineari quasi-ellittiche	Pag: 29
S. Dragotti - Una costruzione per particolari \triangleleft sets	" 43
S. Dragotti - Sulle strutture differenziabili parziali di un microfibrato su una varietà PL	" 53
L. Bader - Sull'isomorfismo di H-Anelli dotati di un modulo irriducibile e quasi fedele	" 65
S. Dragotti - Ostruzioni ad estendere strutture differenziabili	" 133
G. De Simone, G. Di Maio - Alcune osservazioni su una classe di assiomi di separazione più deboli di T_1	" 143
M. Renzi - Un'osservazione sulle funzioni assolutamente continue con derivata prima a variazione limitata	" 155
G. Caradonna - Sui sistemi di equazioni non lineari alle derivate parziali del secondo ordine di tipo iperbolico, in due variabili indipendenti	" 163
A. Leone, M. Maj - Gruppi finiti non submodulari a quozienti propri submodulari	" 185
L. Di Fiore, S. Freni - Su qualche proprietà delle varietà Segre	" 259
G. Colaps - Un semigruppato generato da un operatore differenziale quasi-ellittico degenerare	" 419
O. Fiodo - Problemi quasi-ellittici nel semispazio dipendenti da un parametro e perturbazioni singolari	" 301

Scienze Biologiche

A. Gobetti, A. Polzonetti-Magni, M. Zerani, M. Paolucci - Vitellogenin Synthesis Induced by Estradiol 17β in the Green Prog.....	" 319
M.C. Grimaldi, A. Pica, S. D'Ippolito, F. Della Corte - La pelle delle Torpedini (<u>Torpedo marmorata</u> Risso e <u>Torpedo ocellata</u> Rafinesque) con particolare riguardo all'istochimica del secreto epidermico e dei raggi cartilaginei delle pinne e pettorali	" 325
A. Pica, M. Consiglio Grimaldi, S. D'Ippolito, F. Della Corte - I valori ematologici e le cellule del sangue di <u>Scyliorhynchus Stellaris</u> L.: Varietà di forme e prime osservazioni citoistochimiche !.....	" 371

O. Picariello, M. Paolucci - Comparative Electrophoretic Analysis of Esterase Molecular Forms in the Digestive Gland of Some Venerids (Mollusca: Bivalvia)	Pag. 381
P. Queseda, G. Pontarelli, A. Meduri, M. Merola, B. Farina - Studies on Ribonucleases from HeLa Cells Nuclei	" 389
P. Queseda, H. Suzuki, B. Farina - Mechanism of ADP-Ribosylation of Seminal Ribonuclease	" 397