

ATTI  
DELLA  
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCIII.

1906

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XV.

2° SEMESTRE.



ROMA  
TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1906

sione temporanea dei sintomi morbosi, la presenza degli immigrati fra i soggetti indigeni, certe varietà patologiche che sfuggono all'esame ecc. E si pensi che le nostre ricerche sono vólte sopra la parte scelta della popolazione, perocchè i maestri cercano, e giustamente, di allontanare al più presto possibile dalla scuola i gravi deficienti, e non accolgono, com'è naturale, i veri e propri cretini. Nè credasi che questa enorme diffusione della malattia sia un appannaggio dei piccoli paesi dove non sono penetrati ancora, col lume della civiltà, i primi principî dell'igiene. Varrebbe l'esempio di Morbegno, dove, malgrado tutto, abbiamo riscontrato circa il 60 % di forme patologiche, ma non sarà inopportuno stralciare da analoghe ricerche, che abbiamo intrapreso sui bambini nella prima infanzia, alcuni dati eloquenti.

A Chiavenna, grossa ed agiata borgata della valle del Mera, dove pure l'endemia gozzo-cretinica non infierisce quanto nella bassa Valtellina, e dove la popolazione conta un numero rilevante d'immigrati e d'incroci con elementi forestieri, abbiamo esaminato i bambini dell'asilo infantile, dell'età dai 3 ai 5 anni, in numero di 72, e vi abbiamo trovato 36 casi spiccatamente patologici, vale a dire il 50 %, e, fra questi, 13 con vero e proprio gozzo, tre dei quali affetti da sintomi palesi di mixedema.

Si pensi ora all'importanza che ha sul normale sviluppo fisico e psichico il retto funzionamento della tiroide, e si giudichi della vastità e dell'urgenza del problema d'igiene sociale che lo Stato avrebbe avuto l'obbligo d'affrontare già da molti anni, mentre invece, fin'ora, lo ha lasciato completamente negletto.

**Biologia.** — *Ricerche sulla catalasi* (1). Nota del dott. AMEDEO HERLITZKA, presentata dal Socio A. MOSSO.

I.

*Ha l'ossigeno un'azione sulla reazione determinata dalla catalasi?*

La catalasi — intendendo con questo nome i vari fermenti di diversa origine che scindono l'acqua ossigenata — è stata studiata, per quello che riguarda la sua azione, molto profondamente da vari autori, tra cui soprattutto dal Senter (2), che studiò la sua emasi estratta dal sangue. Egli stabilì che per la velocità d'azione di essa vale la formola:

$$0,4343 K = \frac{1}{t_1 - t_2} \log \frac{C_1}{C_2}$$

(1) Lavoro eseguito nel Laboratorio di fisiologia della R. Università di Torino.

(2) Senter G., Zeitschrift f. physik Chemie, vol. 44, pag. 257, 1903; Id. Proc. Royal Soc., 74, pag. 201, 1905.

dove  $C_1$  e  $C_2$  sono la concentrazione dell'acqua ossigenata, espressa in cmc. di soluzione  $\frac{n}{500}$  di permanganato potassico, e misurato rispettivamente al tempo  $t_1$  e  $t_2$ . Un argomento che non ho trovato trattato nella letteratura si è, se l'ossigeno abbia o no un'azione sul processo stesso. È noto, che la massima parte delle reazioni enzimatiche arriva ad uno stadio d'equilibrio, determinato tra altro dalla concentrazione dei prodotti di scissione; diminuendo o aumentando quest'ultimo l'equilibrio si sposta in un senso o nell'altro. Se ciò avvenga anche per la scissione dell'acqua ossigenata non mi consta sia stato studiato.

Liebermann <sup>(1)</sup> ha studiato in una serie di lavori l'azione che ha l'ossigeno per l'inizio della reazione, dimostrando la necessità della presenza di ossigeno attivo per l'inizio della scissione dell'acqua ossigenata per opera dell'argento colloidale, mentre ciò non avviene per gli enzimi. A questo proposito va notato che mentre alcuni fermenti, che scindono l'acqua ossigenata — come altri che non hanno tale azione — ossidano in presenza del perossido la resina di guaiaco, altri fermenti non hanno tale azione perossidasi, ma solo quella di catalasi; i primi dunque mettono in libertà ossigeno attivo mentre le seconde non lo fanno.

Io ho voluto studiare, se il fenomeno della scissione dell'acqua ossigenata per opera di una catalasi si modifica col variare della concentrazione, cioè della pressione parziale dell'ossigeno.

A questo scopo mi sono servito di una catalasi preparata dal fegato di bue, per ripetuta precipitazione con l'alcool, secondo il metodo adoperato da Battelli e Stern <sup>(2)</sup>. Ottenni così un preparato attivissimo, perfettamente libero di ogni traccia di azione di perossidasi.

Per poter fare agire la catalasi sull'acqua ossigenata in presenza di un determinato gas, e per poter prendere i campioni della soluzione da esaminare, senza che il liquido venga a contatto coll'aria atmosferica, finché non sia spenta l'azione della catalasi, ho costruito l'apparecchio rappresentato nella fig. 1. In tale costruzione mi sono anche preoccupato di far gorgogliare i gas, per quanto possibile, con la stessa velocità attraverso il liquido, perchè la diversa violenza, con la quale il liquido viene agitato ha certo un'azione sulla velocità della scissione.

Per ottenere tale scopo ho fatto passare i gas — quando non si trattava di gas compressi — sotto una pressione costante, servendomi di un regolatore della pressione, che è una modificazione di uno esistente in commercio. In un bicchiere da pile contenente un liquido per es. olio di vaselina, e nel quale si trova un tubo  $g$  piegato più volte, pesca una cam-

<sup>(1)</sup> Liebermann L., Arch. f. d. ges. Physiol. (Pfüger), 104, pag. 119 e seg., 1904.

<sup>(2)</sup> Battelli e Stern, Archivio di Fano, II, 471.

pana di vetro *a*. L'estremità del tubo *g* sorpassa il livello del liquido e penetra dunque nella camera d'aria chiusa dalla campana. Questa comunica con l'esterno mediante un sottile tubo *e* che si trova in un grosso manicotto *d*; tra *e* e *d* si trova uno strato di mercurio.

La campana è sospesa in *b* mediante il sistema bifilare, e si trova in equilibrio mediante il peso *p* attaccato ai fili che passano sulla puleggia. Nel manicotto *d* penetra il tubo *f* tenuto fisso da un sostegno, e che mediante un tubo di gomma comunica col serbatoio del gas. Nell'interno del tubo *f*

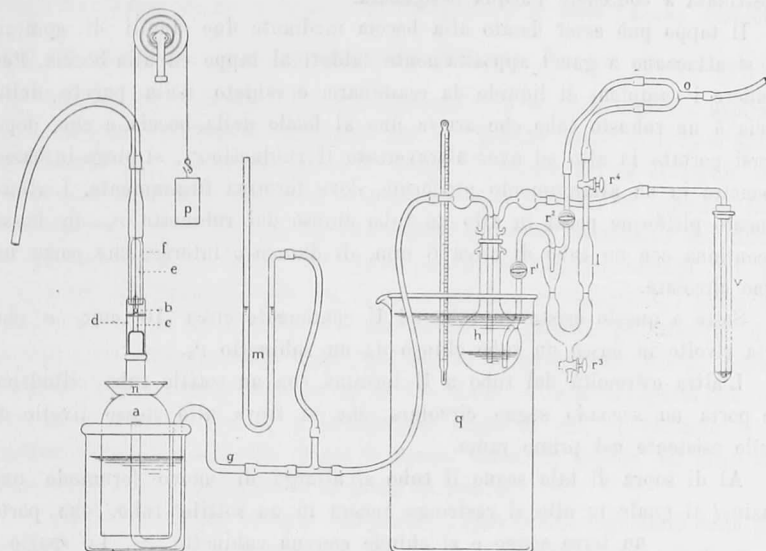


FIG. 1.

è fissato con saldatura un tubo *e* chiuso in alto ed aperto in basso. L'estremità inferiore di *e* si trova di uno o due centimetri più in alto, che quella di *f*; questo particolare non è visibile nel disegno. Nel tubo *e* penetra il tubo *c*, che fa corpo con la campana. Quando la campana si innalza, il mercurio chiude l'estremità inferiore di *f*; se allora si fa passare il gas, questo dal serbatoio penetra in *f*, da dove passa per l'apertura inferiore in *e* e da *e* attraverso *c* nell'interno della campana. Da questa poi esce attraverso *g*. Se in *g* si trova una resistenza, la pressione in *a* aumenta, la campana si innalza e in tal caso il mercurio chiude anche l'apertura inferiore di *e*.

Il gas perciò non può più entrare da *f* in *e* e quindi in *a* diminuisce un po' la pressione, ed il passaggio da *f* ad *e* si riapre. Un piatto *n* è destinato a contenere i pesi, che regolano la pressione secondo i bisogni dell'esperimento. La modificazione principale da me portata è l'equilibratura della campana mediante il contrappeso *p*; con tale modificazione la sensibi-

lità del regolatore è grandissima e la pressione si mantiene costante fino al millimetro d'acqua.

Da *g* il gas arriva a un tubo a T al quale è innestato un manometro ad acqua, e da qui arriva alla boccia *h* di circa 200 cmc. di contenuto.

Questa è a tappo smerigliato, attraversato da un tubo lungo di afflusso, che pesca nel liquido, e che termina in basso con numerosi forellini, e da un tubo di efflusso, che porta il gas alla valvola *v*, chiusa da uno straterello d'acqua e che deve impedire l'accesso dell'aria atmosferica in *h*. La boccia è destinata a contenere l'acqua ossigenata.

Il tappo può esser fissato alla boccia mediante due anelli di gomma che si attaccano a ganci appositamente saldati al tappo ed alla boccia. Per prendere i campioni di liquido da esaminare, è saldato nella parete della boccia *h* un robusto tubo, che arriva fino al fondo della boccia, e che, dopo essersi portato in alto ed aver attraversato il rubinetto *r*<sub>1</sub>, si piega in basso e penetra in un allargamento piriforme, dove termina fusatamente. L'allargamento piriforme porta in alto un tubo chiuso dal rubinetto *r*<sub>2</sub>, in basso si continua con un tubo di circa 6 mm. di diametro interno, che porta un segno circolare.

Sotto a questo esiste un tubo ad U contenente circa 10 cmc. e che porta rivolto in basso un tubo chiuso da un rubinetto *r*<sub>3</sub>.

L'altra estremità del tubo a U termina con un sottile tubo cilindrico che porta un secondo segno circolare, che si trova allo stesso livello di quello esistente nel primo ramo.

Al di sopra di tale segno il tubo si allarga di nuovo formando uno spazio *l* il quale in alto si restringe ancora in un sottile tubo, che porta un terzo segno e si chiude con un rubinetto *r*<sub>4</sub>. Lo spazio *l* posto tra i due segni è esattamente misurato e contiene 10 cmc. Con due tubi di gomma i due tubi chiusi da *r*<sub>2</sub> e *r*<sub>4</sub> sono messi in comunicazione con un tubo a Y *o*.



FIG. 2.

L'esperimento si fa nel modo seguente. In *h* (dopo chiuso *r*<sub>1</sub>) si mettono 75 cmc. esattamente misurati della soluzione di acqua ossigenata (*perhydrol* Merck) circa all'1%. Il fermento si pone in piccole ampolline di vetro di circa 2 cmc. di contenuto, chiuse alla lampada (fig. 2). Il fermento si prepara sciogliendo una minima porzione di catalasi in 50 cmc. di acqua e filtrando. Per ogni serie di esperienze si prepara espressamente il fermento. Questo si riempie nelle ampolle misurandolo con una pipetta divisa in  $\frac{1}{100}$  di cmc.; ogni segno dista dall'altro circa 2,5 mm. e la lettura si fa con la lente, per avere sempre la stessa quantità di fermento. Per poter mescolare il fermento all'acqua ossigenata al momento voluto, si costruisce l'ampolla di vetro sottilissimo e, per facilitarne la rottura, si saldano all'am-

polla stessa numerosi bastoncini di smalto facilmente fusibile. Tali aculei agiscono da leve: questi aculei si staccano al minimo urto asportando dei pezzi della parete dell'ampolla. A due di essi si attacca un filo, col quale si sospende l'ampolla ad un altro filo lungo che, attraversando il tubo corto del tappo, passa tra il tubo di gomma e quello di vetro della valvola. Dando al momento opportuno uno strappo al filo, l'ampolla si rompe e il fermento si mescola all'acqua ossigenata.

Chiusa la boccia *a* si fa gorgogliare il gas attraverso l'acqua ossigenata. Dopo 10 minuti circa, si prende un campione e si dosa l'acqua ossigenata con una soluzione  $\frac{n}{10}$  di permanganato potassico. Per far ciò si riempie il

tubo ad U, tra i due segni, di una soluzione 1:5 di acido solforico, aspirando per *o* e facendo penetrare il liquido per *r*<sub>3</sub>. Quindi chiuso *r*<sub>3</sub> e *r*<sub>2</sub> si apre *r*<sub>1</sub> e si aspira per *o* tenendo aperto *r*<sub>4</sub> finchè il liquido arriva al segno superiore di *l*. Si chiude quindi *r*<sub>4</sub> e si apre *r*<sub>3</sub> e si continua ad aspirare, finchè il liquido, il cui livello si sarà abbassato nel ramo prossimale del tubo ad U, sarà ritornato al segno. Si ricaccia allora il liquido, restato nel tubo che mette in comunicazione con *h*, in *h* stesso e si richiude *r*<sub>1</sub>. Tutto l'apparecchio che va da *r*<sub>1</sub> ad *r*<sub>4</sub>, e che chiamerò pipetta per brevità, dovrà prima esser riempito dallo stesso gas che si fa gorgogliare per *h*. Aprendo *r*<sub>3</sub> si fa defluire ora il liquido in un bicchiere, si lava la pipetta due volte con acido solforico e si fa la titolazione. Dopo di che si mescola il fermento all'acqua ossigenata. Dopo il tempo voluto si prende un altro campione dell'acqua ossigenata e si titola di nuovo.

Quando si lavora sui gas compressi, l'apparecchio regolatore della pressione si omette e al posto della valvola *v* si innesta un tubo a T, che da un lato porta a un manometro a mercurio, dall'altro si continua con un tubo di gomma, di cui si regola l'apertura con una pinza a vite.

La boccia *h* si trova in un bagno d'acqua *g* a temperatura costante. In genere ho lavorato a 24°5.

Io ho esaminata la scissione dell'acqua ossigenata in un ambiente di ossigeno a un'atmosfera di pressione e confrontato con questa, da un lato la scissione in un ambiente di azoto, dall'altro quella che avviene con ossigeno compresso a 410 mm. di mercurio di pressione positiva.

Ammettendo che si tratti di una reazione monomolecolare, la velocità della reazione è regolata dalla formula

$$K = \frac{1}{t_1 - t_2} \log \frac{C_1}{C_2}$$

dove *C*<sub>1</sub> e *C*<sub>2</sub> sono espresse in concentrazione molecolare. Senter — come ho avvertito — ha dimostrato che per soluzioni molto diluite e per l'emasi ciò vale. Qui però debbo subito avvertire, che nelle condizioni in cui io ho lavo-

rato questo non avviene, come si vedrà dal fatto che i valori di  $k$  in due tempi successivi di una stessa esperienza non sono eguali. Se ciò dipenda dalla concentrazione o dalla natura del fermento non posso dire, nè era mia intenzione studiare tale argomento.

Le tabelle che seguono ci danno nelle colonne C le concentrazioni dell'acqua ossigenata (in grammi per cento) esistenti nei vari momenti dello esperimento, le colonne K i valori di tale costante nei singoli intervalli di tempo.

ESP. 23.

Tempo	Ossigeno		Ossigeno		Azoto		Azoto	
	C	K	C	K	C	K	C	K
inizio . . . . .	1,192	..	1,189	..	1,182	..	1,171	..
dopo 15' . . . . .	0,869	0,0090	0,884	0,0085	0,942	0,0066	0,937	0,0065
dopo 30' . . . . .	0,856	0,00046	0,867	0,00045	0,927	0,00046	0,924	0,00042

ESP. 26.

Tempo	Ossigeno		Azoto		Azoto	
	C	K	C	K	C	K
inizio . . . . .	1,107	..	1,123	..	1,125	..
dopo 10' . . . . .	0,381	0,0463	0,279	0,04047	0,352	0,05046
dopo 20' . . . . .	0,316	0,0081	0,232	0,0080	0,316	0,00469

ESP. 29.

Tempo	Ossigeno		Azoto		Azoto	
	C	K	C	K	C	K
inizio . . . . .	1,073	..	1,076	..	1,078	..
dopo 10' . . . . .	0,662	0,0209	0,703	0,01777	0,716	0,01948
dopo 20' . . . . .	0,619	0,0029	0,673	0,00167	0,689	0,00189

ESP. 31.

Tempo	Ossigeno pressione ordinaria		Ossigeno pressione ordinaria		Ossigeno compresso 410 mm.		Ossigeno compresso 410 mm.	
	C	K	C	K	C	K	C	K
inizio . . . . .	0,941	..	0,9509	..	0,9944	..	0,9509	..
dopo 10' . . . . .	0,5357	0,02446	0,5893	0,02078	0,4285	0,03659	0,5129	0,02672
dopo 20' . . . . .	0,4185	0,01042	0,4855	0,00841	0,3365	0,01049	0,4068	0,01049

Da queste tabelle risulta subito che, come ho detto, la reazione fatta nelle condizioni anzidette, non è una reazione monomolecolare. Per quanto poi riguarda l'argomento della presente Nota, si vede che non esistono differenze notevoli e in un senso solo tra il caso in cui la reazione avviene in ambiente d'ossigeno o di azoto da un lato, di ossigeno compresso o a pressione ordinaria dall'altro. Noi possiamo quindi concludere, che la pressione parziale — o la concentrazione — dell'ossigeno, cioè di uno dei prodotti di scissione della reazione, non ha nessun effetto sull'azione della catalasi. Questa dunque a differenza della massima parte degli enzimi, non determina una reazione invertibile.

Mi riservo di studiare ulteriormente se questo fatto si verifica anche per la catalasi, quando è accompagnata da perossidasi.

II.

*L'azione dei sali di manganese in rapporto alla catalasi.*

È noto per le ricerche di Bertrand (1) che nella laccasi esiste sempre un sale di manganese e che l'azione della laccasi è in stretto rapporto con la concentrazione di questo sale. Egli ha pure veduto (2) che il manganese ha un'azione ossidante diretta sull'idrochinone, sulla resina di guaiaco, sul pirogallolo, e tale azione è per i vari sali di manganese tanto più intensa, quanto più debole è l'acido da cui derivano. Il Bertrand spiega l'azione dei sali di manganese ammettendo che questi per idrolisi danno luogo alla formazione di ossido di manganese, che agirebbe poi come trasportatore di ossigeno.

(1) Bertrand, C. R. Acc. Sc. T. 124, pag. 1032, 1897.

(2) Bertrand, C. R. Acc. Sc. T. 124, pag. 1355, 1897.



Io ho voluto studiare se i sali di manganese modificano l'azione della catalasi, avvicinandola a quella di una perossidasi. Ho disposto perciò l'esperienza nel modo seguente.

In una serie di tubi ho versato 10 cmc. di soluzione di acqua ossigenata, e due di una soluzione di resina di guaiaco preparata di fresco. A questo miscuglio ho aggiunto: in *a* 3 gocce di una soluzione di lattato di manganese, in *b* 3 gocce di lattato di manganese e 3 gocce di una soluzione di catalasi, in *c* 3 gocce della soluzione di catalasi; il tubo *d* serve da controllo. D'altra parte in un altro tubo *e* aggiungo a 10 cmc. di acqua distillata 2 cmc. di resina di guaiaco ed in *f* a questo stesso miscuglio 3 gocce di soluzione di lattato di manganese. Si osserva allora in questo ultimo tubo la colorazione azzurra, comparire dopo qualche minuto, mentre comparisce subito, per intensificarsi poi, nel tubo *b*. Negli altri tubi non si ha affatto colorazione azzurra, neanche dopo molte ore. È da notare dunque che si ha colorazione azzurra nel tubo contenente acqua, resina di guaiaco e manganese, e in quello contenente acqua ossigenata, resina di guaiaco, manganese e catalasi. Invece nè il manganese, nè la catalasi non determinano l'ossidazione in presenza di acqua ossigenata. Ancora debbo avvertire che la catalasi aggiunta ad acqua distillata e resina non determina la colorazione. Con altre sostanze da ossidarsi — con l'idrochinone — invece il campione con l'acqua ossigenata semplicemente è quello che si ossida più presto; aggiungendo invece la catalasi l'ossidazione avviene più lentamente.

La catalasi in questo caso ostacola l'ossidazione come Shaffer<sup>(1)</sup> ha dimostrato per altre sostanze. Il manganese aggiunto all'acqua ossigenata non accelera l'ossidazione dell'idrochinone, nè la ritarda.

I risultati dell'esperimento fatto sulla resina di guaiaco, colpiscono dapprima per la loro apparente stranezza. Difatti ci si attenderebbe che l'ossidazione debba avvenire più facilmente in presenza di acqua ossigenata. Il fatto, che, in presenza di manganese l'acqua ossigenata ostacola l'ossidazione della resina di guaiaco, e che questa è solo possibile mercè la scissione dell'acqua ossigenata stessa, sembra un paradosso, ma si spiega bene ammettendo la dottrina di Bertrand. Difatti egli ha veduto, che quanto più debole è l'acido, da cui proviene il sale di manganese, tanto più forte è l'azione ossidante, e noi sappiamo, che quanto più debole è l'acido, tanto maggiore è l'idrolisi, che il sale subisce, cioè tanto maggiore è la concentrazione dell'ossido di manganese. Noi sappiamo d'altra parte che l'acqua ossigenata è uno ionizzatore più forte dell'acqua distillata; in essa perciò sono più dissociati anche gli acidi deboli, e perciò i fenomeni di idrolisi sono molto limitati. Per questa ragione anche da un sale di un acido debole, come l'acido lattico, e di una base debole, come il manganese, non si ha nel-

(<sup>1</sup>) Shaffer P. Amer. Journ. of Physiol. XIV, pag. 299, 1905.

l'acqua ossigenata che una formazione minima di ossido di manganese. Perciò il lattato di manganese aggiunto all'acqua ossigenata ed alla resina di guaiaco non determina l'ossidazione di questa. Ma se noi aggiungiamo ora la catalasi, questa, distruggendo l'acqua ossigenata, fa diminuire la dissociazione degli elettroliti disciolti e quindi ne favorisce l'idrolisi; per questa si forma ossido di manganese e quindi si ha l'ossidazione della resina di guaiaco, la quale è ancora più favorita dall'abbondante ossigeno, che si sta mettendo in libertà e si discioglie nel liquido.

Una riprova di questa spiegazione l'abbiamo nel fatto, che l'ossidazione per opera del manganese si ha, tanto aggiungendo prima il sale e poi la catalasi, quanto aggiungendo il sale, dopo la scissione dell'acqua ossigenata per opera della catalasi.

Non è improbabile, che, quando la catalasi ha anche l'azione di perossidasi, ci si trovi di fronte a fenomeni analoghi a quelli che si manifestano per l'aggiunta del manganese alla catalasi.

V. C.

---