

ATTI  
DELLA  
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCVII.

1910

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XIX.

2° SEMESTRE.



ROMA  
TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1910

Chimica vegetale. — *Sul metabolismo delle muffe* (1). *Ricerche sull'Aspergillus fumigatus*. Nota I di C. RAVENNA e G. PIGHINI, presentata dal Socio G. CIAMICIAN.

Nell'intraprendere una serie di ricerche sul ricambio delle muffe, che sembrano avere speciale importanza nella patogenesi della pellagra, è nostro precipuo intendimento l'isolare e l'identificare quei principî tossici che già da alcuni ricercatori vennero rintracciati in colture pure di alcuni di tali ifomiceti, e la cui natura chimica rimane tuttora ignorata.

È noto da tempo che gli infusi di mais guasto esercitano spiccato potere tossico negli animali ai quali vengono somministrati per via orale o sottocutanea, ed è merito di Lombroso l'aver messo in rapporto tale tossicità coll'infezione subita dal mais per opera di speciali muffe e l'aver cercato di isolare dal terreno di coltura le sostanze venefiche.

Sulle tracce di Lombroso l'attenzione dei ricercatori venne più specialmente rivolta verso il *Penicillium glaucum* che è l'ospite più comune del mais avariato. Dalle colture di questo ifomiceta, Gosio (2) isolò un tossico che ritenne un fenolo e Di Pietro (3) estrasse una sostanza amorfa di natura glucosidica, costituita, oltre che da zucchero, da un corpo a reazione fenolica.

La funzione fenolica degli estratti tossici, ritenuta da Gosio come loro carattere differenziale e specifico, non pare però abbia quella importanza che da prima le si era voluta riconoscere. Ceni e Besta (4), infatti, nelle loro ricerche su due varietà di *Penicillium glaucum*, non poterono riscontrare nessun rapporto fra reazione fenolica e tossicità degli estratti.

Oltre che dai penicilli, vennero estratti dei tossici attivissimi, anche dalle colture sporificanti di alcune specie di *Aspergillus*, ed anch'essi messi in rapporto coll'intossicazione maidica. Ceni e Besta (5), dagli aspergilli *fumigatus* e *flavescens*, estrassero una sostanza amorfa, tossica, che alcune volte dava, altre no, una reazione colorata col cloruro ferrico.

Noi abbiamo prescelto, per questa prima serie di ricerche, l'*Aspergillus fumigatus*. Isolato dall'ambiente, coltivato sulla patata in provette di Roux, veniva seminato in capsule di Tyndall su circa 150 cc. di liquido di Raulin

(1) Lavoro eseguito nel Laboratorio di Chimica agraria della R. Università di Bologna e nell'Istituto psichiatrico di Reggio Emilia.

(2) Rivista di igiene e sanità pubblica, 1902.

(3) Annali di igiene sperimentale, 1902.

(4) Rivista sperimentale di freniatria, 1903.

(5) Rivista sperimentale di freniatria, 1902.

e tenuto in termostato a 37° per 5-6 giorni. Dopo questo periodo, la patina è abbondantemente sporulata e pronta per l'estrazione. Seminavamo 20 capsule per volta, e toltele dalla stufa, ne saggiavamo la tossicità inoculando l'estratto alcoolico di mezza patina, emulsionato in acqua, nel peritoneo di una cavia. Sopra 20 seminagioni fatte successivamente dall'aprile 1909 al maggio di quest'anno, una sol volta la coltura non si è dimostrata tossica: in tutte le altre abbiamo ottenuto la morte delle cavie sperimentate non più tardi di 10 minuti dopo l'iniezione, con fenomeni di collasso. preceduti, in generale, da brevi accessi tetaniformi. Ciò contraddice alla affermazione del Ceni, variare la tonicità dell'aspergillo a seconda delle stagioni dell'anno.

Il primo tentativo, per l'estrazione della sostanza tossica, si eseguì sopra 40 patine. Queste, separate dal liquido di coltura, vennero tagliate ed estratte ripetutamente a ricadere con alcool bollente. La soluzione alcoolica ottenuta lasciò separare, dopo raffreddamento e riposo, una sostanza di aspetto amorfo che, separata dal liquido, venne nuovamente ripresa con alcool bollente, dove soltanto una parte ne passò in soluzione. Per raffreddamento si ebbe una sostanza cristallina che purificata dall'alcool, si presentò in forma di bei cristalli prismatici, incolori, fondenti intorno ai 300°. Il corpo in parola era pressochè insolubile nell'acqua, nell'alcool freddo e nell'etere e poco solubile nell'alcool bollente; non dava colorazione col cloruro ferrico. Per la piccola quantità di esso, non si potè farne l'analisi; furono, perciò, soltanto eseguite alcune prove per sperimentarne la tossicità.

Gr. 0,024 della sostanza vennero sciolti in 10 cc. di alcool caldo e si aggiunse alla soluzione altrettanta acqua. L'emulsione ottenuta, divisa in due parti uguali, venne iniettata nel peritoneo a due cavie, che morirono dopo circa un minuto di shock. Due cavie di controllo, iniettate con uguale miscela di alcool ed acqua, morirono dopo 24 ore, con sintomi di collasso.

Un'altra esperienza si eseguì nel seguente modo: gr. 0,005 di sostanza vennero introdotti in un tubettino di vetro imbutiforme, sfilato ad un'estremità, del diametro massimo di 4 mm. e della lunghezza di circa 15 mm. Sterilizzato il tutto, venne innestato nel peritoneo di una cavia, osservando tutte le cautele dell'antisepsi.

Dopo 15 ore, la cavia comincia a manifestare tremori diffusi a tutti gli arti, specialmente ai posteriori; la reattività muscolare è esagerata, il respiro accelerato, il cuore tumultuante. I fenomeni vanno via via aggravandosi, alternati con spasmi tetaniformi; segue quindi il collasso e la morte, 20 ore dopo l'innesto.

Aperta la cavità peritoneale, non si osserva nessun essudato, tanto alle pareti, che sulle anse intestinali, che hanno aspetto normale. Si ritrae l'imbutino di vetro fra queste. Entro la sua apertura è invaginata una porzione di mesentere assai congesta, che giunge sin quasi in contatto della massa cristallizzata e ne è separata da un sottile strato di liquido essudato gial-

lognolo e limpido. Evidentemente, quel liquido e quel tratto di mesentere chemotatticamente invaginatosi entro il tubetto, hanno servito da solvente e da veicolo per la diffusione nel circolo della sostanza sperimentata. Gli altri visceri non presentano nulla di notevole, eccettuati il cervello ed il midollo assai congesti.

Il tubetto, contenente ancora discreta quantità di cristalli, venne lavato con acqua, essiccato e pesato. Contenendo esso ancora gr. 0,003 di sostanza, fu sterilizzato alla stufa e iniettato nel peritoneo di una nuova cavia. Dopo 14 ore, insorgono fenomeni identici a quelli presentati dalla cavia precedente, con aggiunta di trisma. Al mattino vien trovata morta. All'autopsia si riscontra: pareti intestinali leggermente congeste; nessun liquido essudato nella cavità; anse intestinali normali. Tra queste si rinviene il tubetto entro cui, come nel primo caso, è introflessa una porzione del mesentere ed abbondante liquido citrino, limpido, immergente i cristalli. Visceri toracici congesti; assai congesti la corteccia cerebrale, il bulbo, il midollo.

Il tubetto, contenente ancora pochissimi cristalli, venne lavato con soluzione di acido fenico al 2% ed innestato in una terza cavia. Questa presenta, 7 ore dopo l'innesto, fenomeni simili ai precedenti, che dopo 20 ore si vanno attenuando, persistendo solo il trisma provocato da stimoli tattili. Il dì seguente, ogni sintomo è scomparso. Dopo tre giorni, l'animale viene sacrificato. Nel tubetto è, anche questa volta, invaginata una faldella di mesentere nuotante nel liquido essudato che riempie la piccola cavità. Non si rinviene più traccia della sostanza cristallizzata. Gli altri visceri sono normali.

Parallelamente alle prove ora descritte, fu sempre, per controllo, innestato a una o due cavie, un tubetto vuoto uguale a quello che conteneva i cristalli. I soggetti di controllo non presentarono mai sintomi notevoli.

Risulta evidente, da queste esperienze, che la sostanza iniettata e innestata nelle cavie, è dotata di un elevato potere tossico, essendone stati sufficienti 5 mg. a uccidere due cavie ed a provocare gravi fenomeni morbosi in una terza cavia, che ha potuto sopravvivere. I fenomeni prodotti si riferiscono ad un'azione tossica tetanizzante e convulsivante.

Incoraggiati da questi risultati, abbiamo eseguito l'estratto alcoolico di altre 150 patine di *Aspergillus fumigatus*. Procedendo col metodo precedentemente descritto abbiamo ottenuto, per successivi trattamenti con alcool caldo, non più la sostanza ritrovata nella prima esperienza, ma dei cristalli a forma di aghi sottili che riempivano tutto il solvente. Fondevano a 166-167°. L'analisi diede i numeri richiesti dalla formula  $C_6H_{14}O_6$ .

Gr. 0,1256 di sostanza diedero gr. 0,1830 di  $CO_2$  e gr. 0,0864 di  $H_2O$ .

In cento parti:

|   | Calcolato | Trovato |
|---|-----------|---------|
| C | 39,54     | 39,74   |
| H | 7,74      | 7,69    |

La sostanza in parola è mannite che fonde, secondo gli autori, a 166° (1) e cristallizza in modo identico alla sostanza da noi estratta la quale, mescolata con mannite pura, conserva invariato il punto di fusione.

Un'ultima esperienza si fece sopra 200 patine di aspergillo. Questa volta non si rintracciò nè la sostanza tossica, nè la mannite. L'estratto alcoolico, infatti, convenientemente concentrato, lasciò separare dei grossi cristalli prismatici nella quantità di circa 6 grammi. La sostanza, disciolta a caldo in alcool ordinario, dove è poco solubile, si separa sciropposa, ma in breve tempo assume aspetto cristallino. I cristalli fondono a 98°; nel vuoto perdono acqua di cristallizzazione, mentre il punto di fusione si innalza; esso però è, per la sostanza deacquificata, variabile a seconda delle condizioni di riscaldamento. L'analisi dimostrò che il corpo in parola, ha la composizione di un bisaccaride.

Gr. 0,1828 di sostanza diedero gr. 0,2830 di CO<sub>2</sub> e gr. 0,1104 di H<sub>2</sub>O.

In cento parti:

| Calcolato per C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> | Trovato |
|---|---------|
| C 42,10   | 42,22   |
| H 6,43  | 6,76    |

La sostanza non riduce il liquido di Fehling, non si combina colla fenilidrazina, è otticamente attiva (destrogiro). Fu determinato il potere rotatorio specifico.

Gr. 0,2960 di sostanza sciolti in 10 cc. di acqua, diedero, per lo spessore di 10 centimetri, un angolo di rotazione  $\alpha_D = 5^{\circ},81$ . Il potere rotatorio specifico trovato è quindi  $[\alpha]_D = +196^{\circ},3$ .

I cristalli estratti questa volta dalla nostra coltura di aspergillo sono dunque costituiti da *trealosio* di cui gli autori danno (per la sostanza idratata) il punto di fusione intorno ai 100° (2) ed il potere rotatorio specifico (per la sostanza anidra)  $[\alpha]_D = 197^{\circ}$  circa (3).

Noi abbiamo isolato dunque, seguendo sempre lo stesso procedimento, da tre estratti di aspergillo, rispettivamente tre corpi differenti e cioè: una sostanza tossica, non identificata, la mannite ed il *trealosio*. La presenza non simultanea di queste due ultime sostanze negli estratti di *Aspergillus fumigatus*, apparisce come una nuova prova del nesso genetico tra mannite e *trealosio*, stabilito da Bourquelot per altri funghi (4).

(1) Beilstein, 3ª edizione, vol. I, pag. 284.

(2) Beilstein, 3ª edizione, vol. I, pag. 1070.

(3) Lippmann, *Die Chemie der Zuckerarten*, 3ª ediz., vol. II, pag. 1430 (1904).

(4) Vedasi: Czapek, *Biochemie der Pflanzen*, vol. I, pag. 230 e sgg. (1905); Lippmann, op. cit., vol. II, pag. 1428.

(1) Cercheremo, nelle ulteriori ricerche, di poter nuovamente raggiungere le condizioni della nostra prima esperienza nella quale siamo riusciti ad isolare, probabilmente allo stato di purezza, ma non ad identificare, per la troppo piccola quantità, una sostanza tossica.

**Meteorologia.** — *Sul comportamento del mese di giugno nell'andamento annuale della temperatura in Italia.* Nota di FRILIPPO EREDIA, presentata dal Socio E. MILLOSEVICH.

Questa Nota sarà pubblicata in uno dei prossimi fascicoli.

E. M.