



SULL'AZIONE FISIOLÓGICA

DEI VELENI DEL MAIS

INVASO DA ALCUNI IFOMICETI

CONTRIBUTO ALL'ETIOLOGIA DELLA PELLAGRA

(*Memoria 3^a*)

PER

D.^{ri} B. Gosio e E. Ferrati

PERITI MEDICI IGIENISTI

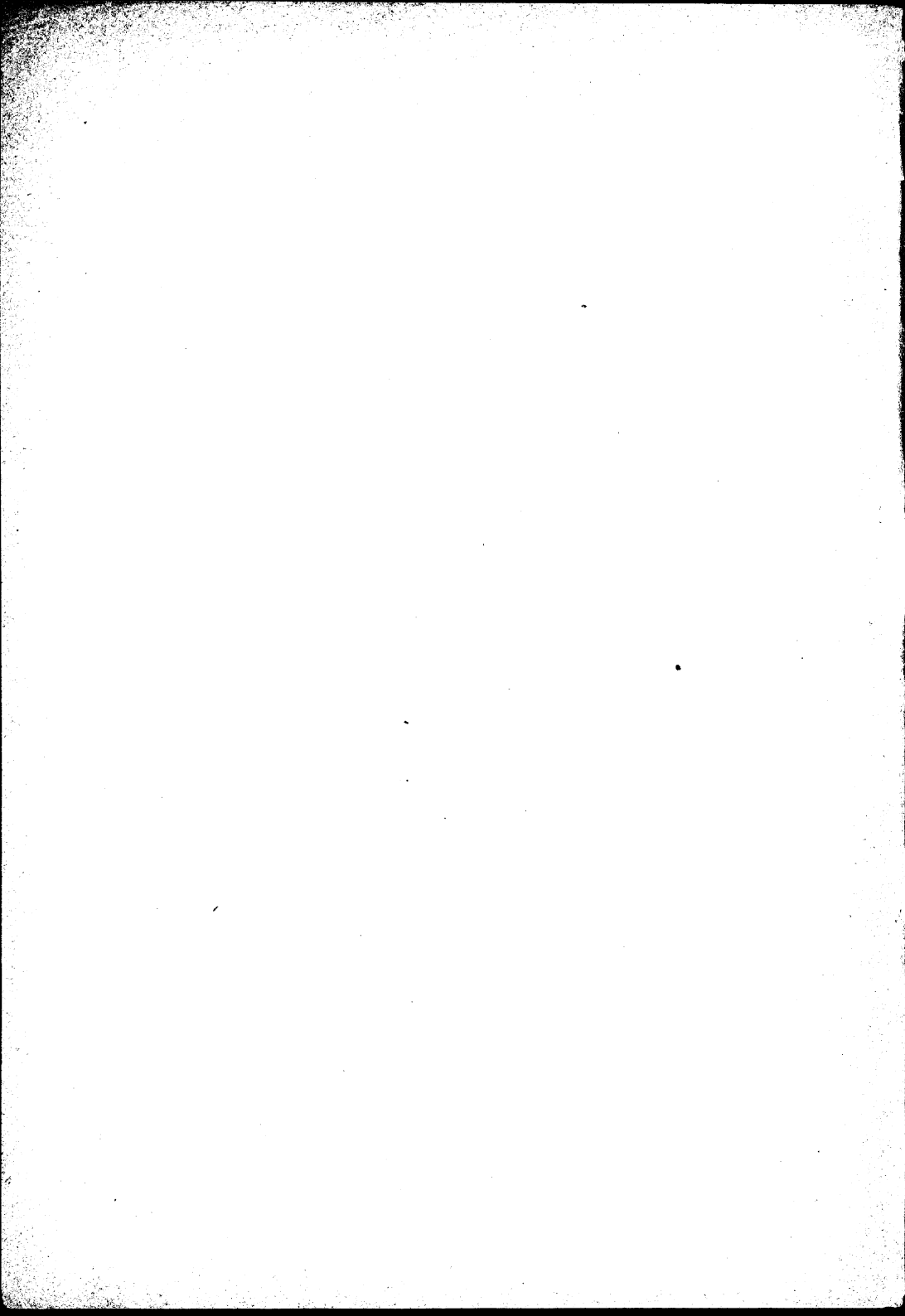


ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1896

mit.
B
65
39



SULL'AZIONE FISIOLÓGICA

DEI VELENI DEL MAIS

INVASO DA ALCUNI IFOMICETI

CONTRIBUTO ALL'ETIOLOGIA DELLA PELLAGRA

(Memoria 3^a)

DEI

D.^{ri} B. Gosio e E. Ferrati

PERITI MEDICI IGIENISTI



ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1896

Estratto dalla *Rivista d'Igiene e Sanità pubblica*
Anno VII - N. 24, 16 dicembre 1896.

Sull'azione fisiologica dei veleni del mais invaso da alcuni ifomiceti

CONTRIBUTO ALL'ETIOLOGIA DELLA PELLAGRA

(MEMORIA 3a)

pei

D.^{ri} B. GOSIO e E. FERRATI
Periti medici igienisti

Nel 1892 uno di noi, Gosio, iniziava una serie di ricerche sulle alterazioni del mais in rapporto colla pellagra; nel 1893 ne pubblicava i primi risultati sommarii e in questo anno una relazione più completa, venendo alle seguenti conclusioni fondamentali.

1° Il *penicillium glaucum* (la comune muffa del verderame del mais) sia sviluppandosi spontaneamente sul mais, sia coltivato in laboratorio nel liquido Raulin, produce sostanze isolabili e cristallizzabili, che appartengono alla serie aromatica (più propriamente si tratterebbe di fenoli o di acidi fenoli).

2° Il materiale impiegato dalla muffa per la formazione di queste sostanze è nel mais l'amido, nel terreno Raulin lo zucchero.

3° Fra i composti che si ottengono dalle culture di *penic. glaucum* in terreno Raulin v'è assai probabilmente l'acido idro-paracumarico.

Gosio fece alcuni saggi preliminari per vedere se detti prodotti sono tossici, ma poi occupato soprattutto a definire la loro natura e costituzione, a studiare il meccanismo biologico con cui essi si vengono formando e le condizioni che più favoriscono agli ifomiceti questa elaborazione, non proseguì le ricerche sulla loro tossicità.

Il determinare se questi composti siano o no e in qual grado tossici, il loro modo di agire, e quale sistema dell'organismo essi maggiormente attacchino, indagare se la loro azione possa avere una parte qualsiasi nel quadro molto complesso e vario della pellagra; vedere se nel mais muffito si abbia formazione di altre sostanze tossiche, oltre alle sopradette - sono stati oggetto di numerose indagini da noi compiute nel corso di questo anno. Racogliamo i risultati in questa memoria, che è naturale complemento al precedente lavoro di Gosio.

* *

Era a ritenersi *a priori* che le sopramenzionate sostanze dovessero essere nocive all'economia animale, per le cognizioni che si posseggono sulla tossicità dei fenoli e degli acidi fenoli; a tal proposito, oltre le determinazioni sperimentali di laboratorio, si sono raccolte nella letteratura medica parecchi casi di avvelenamento; essi risalgono soprattutto ai primi tempi dell'introduzione in pratica dell'acido fenico quale disinfettante. Anche l'acido salicilico, il più semplice degli acidi fenoli, ha dato prove di essere discretamente tossico.

Con queste cognizioni però, data una *fermentazione fenolica* del mais per opera del *penic. glaucum*, stavano in evidente contrasto i risultati delle ricerche di Pellizzi e Tirelli, i quali trovarono che gli estratti glicerici delle culture d'ifomiceti in mais si possono impunemente iniettare ai cani ed ai conigli.

Era adunque doppiamente necessario per parte nostra di renderci ragione di tali discrepanze. Il metodo da noi seguito è però alquanto diverso, sia per riguardo alla preparazione del materiale d'esperimento, sia per la specie animale prescelta.

Anzitutto preparammo dei terreni culturali con farina di mais sano. In grandi matracci Erlenmeyer, della capacità di 4 litri circa, si misero 50 gr. di farina di mais sano e 150 cmc. d'acqua; si sterilizzarono a $+112^{\circ}$ per 30' e si tennero per 2 giorni in osservazione; i terreni che risultarono sterili si inseminarono con 5 cmc. di una sospensione di spore di *penic. glaucum* in acqua sterilizzata. Il *penicillium* era stato isolato di fresco da mais guasto della

provincia di Mantova; coltivato su liquido Raulin esso si era dimostrato atto a produrre abbondanti composti fenolici.

I matracci seminati si tennero in un ambiente a temperatura media di $+ 20^{\circ}$, a debole luce diffusa per circa 8 giorni; in capo a questo tempo l'ifomiceta si era sviluppato rigogliosamente, ricoprendo tutta la superficie superiore della salda di mais e formando uno spesso e increspato rivestimento miceliare, di color verde scuro, il quale compenetrava anche la salda, insinuandosi fra essa ed il vetro. Le coltivazioni, che all'esame microscopico e culturale si dimostrarono pure, furono spappolate e impastate con 250 cmc. ognuna di alcool a 90° e tenute in digestione per 24^h a $+ 38^{\circ}$, agitando ripetutamente. Si filtrò per carta e si ottenne così un liquido alcoolico giallo in sottile strato e rossigno in forte strato, di odore acuto aromatico, di sapore spiccatamente amaro e reazione acida: pochi cmc. di esso evaporati a bagno maria lasciavano un abbondante residuo giallo di profumo speciale, corae di frutta cotta, quasi insolubile in acqua fredda, discretamente solubile in acqua calda; con soluzioni diluite di $Fe^2 Cl^6$ si colorava in verdastro; riscaldato con $H_2 SO_4$ e resorcina e trattato poi con KOH dava intensa fluorescenza; col reattivo di Liebermann si coloriva in verde chiaro. Avevamo pertanto ottenuto una tintura di mais penicillare ricca in composti fenolici; di questa ci servimmo per le nostre esperienze fisiologiche.

I. — 10 cmc. di tintura (corrispondente a 2 grammi di farina) si evaporano a bagno maria: il residuo si riprende con 20 cmc. di acqua calda a $+ 38^{\circ}$ e si inietta nella vena crurale destra di un coniglio: l'animale presenta nelle 24^h successive grave abbattimento; però si rimette e dopo 2 giorni resiste ancora all'iniezione pure endovenale di uguale dose di tintura.

II. — 5 cmc. di tintura (1 gr. farina) si prepara in egual modo come sopra e ripresa pure con 10 cmc. d'acqua tiepida, si inietta nel sottocutaneo dell'addome di una cavia di 300 grammi; non si ha alcun fenomeno generale di avvelenamento; il liquido iniettato viene assorbito assai male; al punto dell'iniezione si nota una forte reazione edematosa. L'esperimento ripetuto su altre cavia dà lo stesso risultato e così pure allo stesso risultato si giunge con dosi minori di materiale diluito in molta acqua.

III. — 5 cmc. di tintura (1 gr. farina) si evaporano e si riprendono con 5 cmc. H_2O : 1 cmc. (0,20 gr. farina) iniettato nel sottocutaneo dorsale di un topo (*mus musculus*) causa la morte in circa 5^h con fenomeni di paralisi successiva a violenti spasmi specie dei muscoli del dorso: uguale risultato si ha iniettando 1 cmc. nel sottocutaneo dorsale di un topolino bianco; la morte è anzi più precoce (in circa 3^h).

Da queste esperienze risulta che il topo è più sensibile ai veleni penicillari che non la cavia ed il coniglio. Noi giudicammo perciò conveniente presceglierlo per studiare l'azione fisiologica di detti veleni.

È tuttavia probabile che con maggiore quantità di sostanza, si sarebbe potuto giungere a ottenere altresì nel coniglio e nella cavia un avvelenamento mortale (1). Difatti dalle ricerche di Simon Duplay e Maurice Cazin sappiamo che le dosi tossiche di fenoli sono (*coeleris paribus*) più elevate per i conigli e le cavia che non per i topi; mentre per questi piccoli organismi gr. 0,125 per Kg. di peso dell'animale bastano a provocare spasmi e convulsioni, ne occorrono gr. 0,415 per kg. di cavia: le dosi mortali sono di gr. 0,296 per Kg. di topo, di gr. 0,514 per Kg. di coniglio e di gr. 0,680 per Kg. di cavia. Cosicché se partiamo dal dato che del nostro materiale in esame cmc. 0,5 uccidono sicuramente il topo, anche ammesso (ma non è probabile), che i rapporti di tossicità siano pel nostro veleno x uguali a quello del fenolo (ac. fenico), verremmo alla conclusione che la dose letale per un coniglio di 1000 gr. di peso è di cmc. 58 e per le cavia di 300 gr. di cmc. 23. Ora nei nostri saggi noi abbiamo sempre adoperato quantità di molto inferiori a quelle calcolate, non è quindi meraviglia se dalla cavia e nel coniglio noi non avemmo che fenomeni passeggeri di avvelenamento. Avremmo potuto aumentare le dosi del materiale di iniezione; ma allora saremmo incorsi in altri inconvenienti.

A noi basti per ora di avere stabilito che la tintura di mais penicillare agisce intensamente sul *mus musculus*. Rivolgiamoci ora a saggiare per controllo la tintura di mais sano, a determinare il

(1) I risultati positivi ottenuti nel coniglio da alcuni ricercatori e altresì da uno di noi con dosi relativamente piccole di materiale non sappiamo se riferire a una maggiore tossicità del prodotto o ad altre circostanze.

grado di tossicità della tintura di mais penicillare per il topo e ad esaminare più dappresso i fenomeni dell'avvelenamento.

I. — 10 gram. di farina di mais sano + 30 cmc. di acqua in piccolo matraccio Erlenmeyer della capacità di 100 cmc. si sterilizzano a + 112° per 30'; quindi si trattano con 50 cmc. di alcool a 90°, si digerisce per 24h a + 38°, agitando spesso, e si filtra; si evapora il filtrato a bagno maria e se ne sospende il residuo in 10 cmc. d'acqua; saggiato col cloruro ferrico, *non reagisce in alcun modo* e neppure reagisce con gli altri reattivi dei fenoli. 1 cmc. (corrispondente a 1 gr. di farina) viene iniettato sottocute a un topolino. Non si nota alcun disturbo.

2 cmc. (corrispondenti a 2 gram. di farina) danno al topo lievi disturbi passeggeri, dovuti senza dubbio al volume del liquido esagerato in rapporto alla piccola massa dell'animale.

II. — Tintura di mais penicillare cmc. 20 (4 gr. farina) sono evaporati a bagno maria; il residuo si riprende con 10 cmc. d'acqua; 1 cmc. (corrispondente a gr. 0,4 farina) iniettato sottocute a un topo lo uccide in 7h.

0,5 cmc. (0,2 gr. farina) uccide il topo in 3h; 0,3 cmc. (0,12 gr. farina) dà fenomeni gravi di avvelenamento con spasmi, contratture e paralisi di arti posteriori e collasso; l'animale dopo 30h accenna a rimettersi, pure rimanendo fortemente abbattuto.

0,5 cmc. (0,2 gr. farina) uccide un topo bianco in 4h.

Dunque: mentre la tintura di mais sano non è tossica neppure alla dose corrispondente a 2 grammi di farina, la tintura di mais penicillare uccide in poche ore il topo anche alla dose decima della prima. Anche dosi minori poi sono in grado di produrre fenomeni gravi di avvelenamento.

In questo quadro di avvelenamento acuto si osservano in prevalenza i fenomeni a carico del sistema muscolare e nervoso; essi consistono essenzialmente in contrazioni cloniche e contratture localizzate ai muscoli del dorso; la respirazione si fa affannosa, e appaiono quì e là contrazioni fibrillari; a poco a poco sopravviene la paralisi; gli arti posteriori rimangono distesi in dietro, mentre l'animale è agitato e si trascina qua e là con i movimenti sempre più limitati degli arti anteriori. Infine compaiono fenomeni di collasso, che perdurano spesso parecchie ore prima della morte: l'animale allora si mostra rigido con una spiccata e carat-

teristica incurvatura del dorso. Alla autopsia si ritrova poco degno di nota; cioè una forte iniezione del sottocutaneo nel punto di innesto e una forte iperemia delle meningi rachidiane.

* *

A questo punto si presentavano alla nostra mente alcuni quesiti riguardanti la natura delle sostanze tossiche del mais invaso da *penic. glaucum*.

1° La sostanza tossica, se unica, è dessa quella stessa che dà le reazioni dei fenoli?

2° Non vi hanno, oltre questa, altre sostanze tossiche, ad esempio basi organiche come le ricerche di Lombroso e dei suoi collaboratori farebbero ritenere?

Sinora noi riteniamo per acquisito:

1° che l'estratto alcoolico di mais sano non dà alcuna reazione di fenoli e non reagisce tossico.

2° che la sostanza tossica di mais invaso da penicillo è pochissimo solubile in acqua fredda, discretamente nell'acqua calda, molto nell'alcool e insolubile in acidi diluiti, così come si comportano le sostanze esistenti nel mais guasto e che reagiscono con i comuni reattivi dei fenoli. Questi fatti non portano però che un contributo indiziario alla questione.

Per avere al proposito dei criteri più positivi, dobbiamo esaminare il comportamento con gli altri solventi e in specie con l'etere e con le basi:

a) 40 cmc. tintura di mais penicillare si evaporano a bagno maria, il residuo sospeso in 20 cmc. di acqua si estrae con eguale volume di etere solforico; l'etere separato si lava con acqua e si evapora; il residuo (reazione intensa in verdastro col reattivo ferrico) si sospende in 5 cmc. d'acqua.

1 cmc. (8 cmc. tintura = gr. 1.6 farina) iniettato sottocute a un topolino provoca il quadro sopradescritto di avvelenamento e la morte in 12^h.

I 20 cmc. della sospensione acquosa vengono agitati con nuovo etere sino a esaurimento, cioè sino a che una porzione di etere evaporata non dia quasi più tracce di reazione col reattivo ferrico: allora si libera completamente dell'etere a bagno maria e se ne inietta cmc. 1,5 (= 3 × dose mortale preced.) in un topo. Si hanno disturbi rapidamente transitori.

b) 40 cmc. di tintura vengono evaporati a debole calore: il residuo sospeso in 20 cmc. di acqua, si neutralizza con NaOH $\frac{N}{10}$ sino a debole reazione alcalina; con la alcalinizzazione il liquido da torbido e di color giallo pallido si fa pressochè limpido e l'assume una tinta più carica. 1,5 cmc. iniettati sotto cute a un topo provocano leggerissimi disturbi, dai quali l'animale bentosto si rimette; ugualmente si comporta un altro topo sottomesso a pari trattamento; a questo punto, il liquido residuale, si acidifica con H_3PO_4 ; si estrae con etere e questo separato e lavato con acqua si evapora; il residuo viene sospeso in 5 cmc. d'acqua. Un cmc. (= a gr. 1.5 di farina) provoca nel topo un avvelenamento tipico come i sopradescritti; l'animale dopo 24^h si rimette a stento.

c) Il residuo di 40 cmc. di tintura incorporato in 20 cmc. d'acqua si tratta con una sospensione acquosa di ossido di magnesio sino a reazione nettamente alcalina e si filtra. Il filtrato si acidifica con H_3PO_4 e si estrae con etere; l'estratto eterico non dà reazione apprezzabile col reattivo ferrico e non è tossico pel topo. L'ossido di magnesio viene, dopo il suddetto trattamento, raccolto su filtro, lavato abbondantemente con acqua e trattato quindi con acqua acida per H_3PO_4 ; la miscela si agita con etere, l'etere separato si lava con acqua, si evapora ed il residuo si riprende con 2 cmc. d'acqua: questo estratto dà intensa reazione coi reattivi dei fenoli. - Un cmc. iniettato sotto cute a un topo provoca grave intossicazione con contrattura caratteristica del dorso e paralisi del treno posteriore; l'animale non soccombe, ma si rimette lentamente in capo a parecchi giorni.

Uguale risultato si ebbe, trattando direttamente con latte di magnesia la tintura di mais penicillare.

Da queste 3 serie di ricerche (esaurimento con etere - neutralizzazione con alcali - precipitazione con ossido di magnesio) noi concludiamo:

1° che le sostanze tossiche del mais penicillare si comportano di fronte al trattamento eterico, in modo identico alle sostanze di reazione fenolica; le une e le altre infatti si estraggono dalla tintura in presenza di acido libero;

2° che dette sostanze tossiche si sciolgono nelle soluzioni diluite di basi alcaline, con che non sono più estraibili dall'etere e perdono quasi interamente ogni azione tossica (analogamente a ciò che si sa dei fenoli acidi);

3° che le sostanze tossiche del mais penicillare si combinano con MgO in composti insolubili in acqua e non più estraibili con etere, se non previo spostamento con un acido.

* *

Facemmo ancora il seguente saggio:

20 cmc. di sospensione acquosa della tintura si trattano con una soluzione diluita di Na_2CO_3 sino a reazione nettamente alcalina e quindi si agita con etere; questo si lava e si evapora; il residuo scarsissimo non reagisce affatto col reattivo ferrico; il liquido acquoso si acidifica con H_3PO_4 e si estrae con nuovo etere: nell'estratto eterico sono assai abbondanti i composti fenolici.

Noi abbiamo quindi qui non un fenolo semplice ma un acido fenolo. Il parallelismo esistente poi tra reazione col Fe^2Cl^6 ed azione tossica ne fa persuasi che il materiale tossico è appunto quello che reagisce con Fe^2Cl^6 e cogli altri reattivi dei fenoli. Se siano uno o più corpi della stessa serie che si comportino a questo modo nel mais penicillare noi non possiamo bene affermare; considerando le differenze delle reazioni e dell'azione tossica nei vari preparati, per quanto noi abbiamo sempre cercato di metterci nelle stesse condizioni, siamo condotti a credere aversi qui non un composto unico, ma una numerosa serie, i cui termini variano a seconda di molte circostanze non anche bene stabilite, ma specialmente per la mutevole attività degli ifomiceti e per la diversa età della cultura, come si vedrà in seguito. Su questo punto si è del resto in modo più esplicito insistito nel precedente lavoro pubblicato da uno di noi.

Il quadro dell'avvelenamento collima con quello descritto dal Binz, da Salkowski e da altri autori per il fenolo e come l'abbiamo potuto noi stessi riprodurre nei topi con la iniezione di 5-10 milligr. di acido fenico o di resorcina, o di 15 milligr. di acido salicilico.

È poi nota la neutralizzazione della tossicità dei fenoli trattati con basi alcaline e terrose (quindi l'uso invalso della calce saccharata come antidoto nell'avvelenamento per acido fenico), ciò che corrisponde perfettamente a quanto abbiamo osservato noi neu-

tralizzando la tintura di mais penicillare. Questi fatti, uniti anche alla proprietà antisettica già dimostrata da uno di noi nel precedente lavoro, ci confortano sempre più nella persuasione che, nell'avvelenamento ottenuto nei topi colla tintura di mais penicillare, l'azione più importante, se non esclusiva, è dovuta a composti acidi di funzione fenolica.

Ma sono le sostanze fenoliche le uniche tossiche esistenti nel mais guasto? Non vi sono sostanze di altra costituzione o di altro comportamento chimico le quali sieno pure tossiche? soprattutto non vi esistono basi organiche tossiche?

I risultati delle precedenti ricerche ci portavano già ad escludere con molta probabilità la esistenza di *basi tossiche* nel mais penicillare, soprattutto la innocuità della tintura di mais penicillare in seguito ad esaurimento eterico, in soluzione acida, e la grande diminuzione di tossicità della tintura provocata dall'alcalinizzazione. Però noi ci trovammo innanzi i risultati di Lombroso, Duprè, Erba, Brugnattelli e Zenoni, che sono giunti ad isolare dal mais guasto composti tossici a funzione basica. Noi osserveremo subito che il metodo di ricerca dei suddetti sperimentatori è stato assai diverso dal nostro; era quindi naturale si potesse giungere o un diverso risultato: essi isolavano dette basi dal mais abbandonato alla putrefazione, nella quale certamente presero parte molti schizomiceti, come ne accerta l'esame fatto dal prof. Gibelli sul materiale d'indagine.

Essendo nota la formazione di basi organiche tossiche specialmente *neurina*, *neuridina*, *colina*, *cadaverina*, nella putrefazione attivata da schizomiceti, non era a meravigliare se detti autori sono giunti ad estrarre delle basi dal mais putrefatto. Siccome poi dal suddetto esame del Gibelli parrebbe risultare una predominanza di ifomiceti sugli altri microrganismi, e siccome esiste una grande analogia di sintomi nell'avvelenamento descritto da Lombroso come caratteristico della pellagrozeina e quello da noi ottenuto con la tintura di mais penicillare e sono d'altra parte analoghi il comportamento con alcuni reattivi chimici, noi siamo tentati d'espri-

mere il dubbio che in qualche caso l'azione tossica attribuita alle basi potesse provenire in parte dai fenoli, presenti come impurità dei preparati. Egli è poi evidente che il successo della pratica di neutralizzare colla calce il mais guasto, tanto in voga nel Messico, dove non esiste pellagra, e raccomandata anche dal Lombroso, s'accorda molto male con le teoria di un'intossicazione per basi organiche, mentre s'accorda colla tesi da noi sostenuta.

Tuttavia si esigea al riguardo un'indagine diretta e noi ci credemmo in dovere di accertarci della esistenza o non anche di piccole quantità di sostanze basiche tossiche, cercando di estrarle con etere in ambiente alcalino da quantità relativamente grande di tintura.

100 cmc. tintura di mais penicillare vengono acidificati con H_3PO_4 diluito, si aggiungono 50 cmc. d'acqua e si evapora a bagno maria, rinnovando sempre l'acqua evaporata sino a scacciare quasi completamente l'alcool; quindi si alcalinizza con una soluzione di NaOH e si estrae con etere ripetutamente: l'etere si lava con acqua alcalinizzata con NaOH e quindi si evapora a bagno maria: si ha abbondante residuo resinoso giallo carico, quasi insolubile in acqua anche a caldo. Questo residuo viene emulsionato in circa 3 cmc. di acqua e se s'iniettano 1.5 cmc. sottocute a un topo: non sopravvengono disturbi che possano interpretarsi come azione tossica del liquido iniettato.

*Noi crediamo quindi potere affermare che il *penic. glaucum* svilupandosi su salsi di mais non forma alcuna sostanza di natura basica tossica per il *mus musculus*, e crediamo anche poter ritenere che le basi dimostrate dai suddetti autori nel mais putrefatto (dato pure che fossero scevre da sostanze estranee, che ne mentissero l'azione) si devono riferire con grande probabilità alla attività degli schizomiceti riscontrati dal Gibelli.*

* *

Abbiamo veduto come si comporta l'organismo dei topi alla iniezione di forti dosi dei prodotti di ricambio del *penic. glaucum*;

abbiamo in altre parole rappresentato l'avvelenamento acuto: ora vediamo come si comporta l'organismo del *mus musculus* quando vi si introducano ripetutamente piccole dosi incapaci per sè isolatamente di provocare fenomeni tossici. Per quanto si conosce per analogia, l'organismo si può in simili casi comportare in due differenti modi, a seconda dei varii veleni: o l'organismo si assuefà (Mitridatismo), ovvero in esso vanno via via accumulandosi tutte le piccole dosi di veleno introdotte, sino a raggiungere quella che provoca la reazione organica; allora si ha l'avvelenamento. Vediamo che cosa succede nel nostro caso.

Il 14 marzo 1896 a 6 topi si inietta sottocute il residuo di cmc. 0.3 (gr. 0.12 farina) di tintura di mais penicillare (dose minima mortale cmc. 0.5); si osservano in tutti gli animali leggieri disturbi motori, che però scompaiono in breve (il materiale si era mantenuto per oltre due mesi in sospensione acquosa; esso aveva evidentemente scemato nella sua tossicità, poichè nel gennaio, quando era fresco, cmc. 0.3 provocavano un grave avvelenamento, le cui manifestazioni si prolungavano per oltre 24h).

15 marzo: i 6 topi ricevono ciascuno la uguale dose del giorno precedente; di nuovo si osservano leggieri disturbi.

16 marzo: iniezione a tutti i 6 topi di 0.3 di tintura: un topo si sottrae alla prigionia; un altro muore con spasmi e spiccata contrattura dorsale.

I quattro topi superstiti presentano una breve fase di collasso, ma poi riappaiono sani. Essi per cinque giorni successivi ricevono giornalmente cmc. 0.3 della medesima tintura. Ad ogni iniezione succede una fase di collasso con qualche spasmo.

Questi sintomi manifestansi progressivamente sempre più prontamente ma più prontamente anche si dileguano; parrebbe che il veleno si assorba più prontamente e più prontamente si elimini o si neutralizzi; alla fine degli otto giorni un topo muore in collasso; i tre superstiti hanno in tutto ricevuto cmc. 2.7 di tintura, presentano uno stato di cachessia spiccata; hanno la mobilità gravemente disturbata per una forte contrattura del dorso e paralisi degli arti, specie dei posteriori, che si trascinano distesi indietro, mentre il sensorio pare abbastanza conservato. Gli animali riportati a vita abituale entro una gabbia, e con abbondante nutrizione, presentano una speciale voracità; essi non tendono affatto a rimettersi, ma invece si conservano in stato di grave marasma. Soprattutto è inte-



ressante la permanenza della contrattura del dorso. Dopo una settimana, gli animali vengono sacrificati.

Dunque non si può dire che avvenga una accumulazione di veleno (infatti si è pervenuti fino alla dose quintupla di quella mortale pel topo, ottenendo solo eccezionalmente la morte); tuttavia però aumenta senza dubbio la sensibilità da parte dell'animale d'esperienza; in esso vengono facendosi sempre più accentuati i fenomeni di paralisi e di contratture assieme a depressione spiccata della nutrizione generale.

Non abbiamo ripetuto, come sarebbe stato nostro desiderio, questa esperienza, richiedendo essa molto tempo, oltre che un materiale adatto; riteniamo però dimostrata l'azione deleteria della tintura di mais penicillare introdotta replicatamente, anche a piccole dosi, nello organismo del *mus musculus*.

*
*
*

Passiamo ora a esaminare l'azione della tintura di mais penicillare quando si introduca per via digestiva.

Due topi ricevono della mollica di pane inzuppata con la sospensione di 10 cmc. di tintura di mais; 16^h dopo che una siffatta alimentazione si è intrapresa, entrambi gli animali presentano paresi degli arti posteriori ed uno di essi soccombe dopo le 24^h.

Tre topi ricevono ogni giorno mollica di pane che consumano intieramente (circa gr. 12) imbevuta con sospensione acquosa di 10 cmc. di tintura di mais penicillare: in capo a due giorni un topo muore, gli altri due presentano il quadro completo della intossicazione di tintura di mais penicillare, quale fu da noi ripetutamente descritta (contratture del dorso e paralisi degli arti posteriori).

Dunque i veleni del mais invaso da penicillium glaucum agiscono tossici anche se introdotti pel tubo digerente.

Le sostanze tossiche della tintura di mais penicillare sono desse le stesse che si hanno dalle culture di *penicillium glaucum* su terreno Raulin e che reagiscono coi reattivi dei fenoli? Per rispondere a questa domanda, saggiammo la tossicità del liquido Raulin in cui si era sviluppato rigogliosamente il penicillo per 10 giorni; 20 cmc. di liquido acidificato con H_3PO_4 si esauriscono con etere.

L'estratto lavato lasciò all'evaporazione un residuo minutamente cristallino, tracce del quale danno intensa reazione in grigio viola col reattivo ferrico. Si tratta con 2 cmc. di acqua a caldo e se ne inietta 1 cmc. sottocute a un topo; in capo a 1 ora si manifestano tremiti, spasmi, quindi paralisi; in circa 10 ore l'animale muore; uguale risultato si ottiene da una seconda prova. *In ambo i casi però la sintomatologia è meno accentuata che quella dell'avvelenamento cogli estratti di mais penicillare.* Questa minore energia noi non crediamo poterla attribuire a minor quantità di composti fenolici iniettati, poichè la reazione col percloruro di ferro era nel caso del liquido Raulin più intensa che non per gli estratti di mais: invece crediamo doverla attribuire alla diversa qualità di detti composti. Ne conforta in questa opinione l'aver osservato:

1° il diverso tipo di reazione colorata (gli estratti del liquido di Raulin con Fe^2Cl^6 reagivano per lo più con tinte vivaci, varianti tra il viola ed il bleu; mentre quelli del mais reagivano prevalentemente in verdastro, producendo anche precipitati).

2° il diverso comportamento chimico colle basi terrose (i composti che si isolano dalle culture di *penicillium glaucum* in liquido Raulin, per quanto risulta dalle esperienze fatte, danno colle basi terrose dei sali solubili in acqua, mentre nelle tinture di mais invasato dallo stesso ifomiceta vi ha certamente un composto che precipita coll'ossido di magnesia).

In tutti i modi è certo che anche in liquido Raulin, il *penic. glaucum* produce, come nel mais, sostanze d'azione tossica specifica appartenenti allo stesso gruppo degli acidi fenoli.

♦♦

Questa conclusione ne spingeva a saggiare la tossicità di vari altri terreni ove fosse sviluppato il *penicillium glaucum*. Cominciammo col pane:

Alquanto mollica di pane bianco inzuppata di acqua fu messa in tubi strozzati, come quelli per culture in patate alla Roux, sterilizzati nell'autoclave, quindi seminati con spore di una razza penicillare, che, sia sul terreno Raulin, sia su salda di mais sviluppava abbondanti composti tossici; dopo 8 giorni di permanenza a $+20^{\circ}$ a all'oscuro, nelle quali condizioni l'ifomiceta si era discretamente sviluppato, sporificando su tutta la superficie del pane, si trattò la massa (20 gr.) con 50 cmc. di alcool a 90° . La tin tura è debolmente acida e reagisce discretamente in verde rossiccio con Fe^2Cl^6 : 10 cmc. di essa evaporati vengono sospesi in 2 cmc. d'acqua: di questa emulsione se ne iniettano cmc. 1.5 in un topo; dopo 5' si hanno spasmi, tremiti, contratture e la morte dopo 24 ore.

Quindi: *anche sviluppandosi sul pane il penicillo produce sostanze tossiche reagenti col percloruro; esse però sono relativamente meno attive.*

♦♦

A che attribuire la maggiore tossicità dei prodotti estratti dal mais? Lombroso accusa ripetute volte l'abbondanza del grasso nel mais, per spiegare la gran tossicità del mais muffito. Cercammo pertanto di determinare qual parte possa avere il grasso nella formazione delle sostanze tossiche: 200 gr. circa di farina di mais sana si misero in un grande estrattore Soxhlet e vi si fece circolare etere per circa 10 ore consecutive. Della farina liberata dall'etere si presero 15 gr. e se ne fece una salda con 45 gr. di acqua; si sterilizzò in autoclave, si insemenzò con spore di penicillo e, dopo 8 giorni di sviluppo, si intrapresero i saggi come si fece per le precedenti colture.

Nello stesso tempo prendemmo il grasso rosso bruno estratto dal mais, lo impastammo con mollica di pane e lo distribuimmo in tubi strozzati.

Altresi ci volemmo assicurare se il pigmento del mais avesse alcuna parte nello sviluppo di prodotti tossici: estraemmo perciò detto pigmento con alcool assoluto da 50 gr. di farina di mais sana, evaporammo l'alcool ed incorporammo il pigmento nella mollica di pane, la quale fu distribuita in tubi strozzati.

I risultati di tutte queste prove e delle relative esperienze sugli animali sono messi in evidenza nel seguente prospetto:

Dopo 8 giorni di sviluppo a $+20^{\circ}$ a debole luce, si saggiò la tossicità della tintura, utilizzando sempre il topo come animale di esperimento.

Ecco i risultati di questa serie di ricerche:

1° (controllo) *Mais semplice* gr. 10 + gr. 30 H_2O .

La cultura si estrae con 50 cmc. alcool; la tintura reagisce intensamente col Fe_2Cl_6 ; dose minima letale per topo 1 cmc. di tintura (= gr. 0.2 farina).

2° *Mais sgrassato* gr. 15 + 45 cmc. H_2O .

Dopo 8 giorni si ha sviluppo rigoglioso di penicillo e abbondante sporificazione; si estrae con 100 cmc. alcool; la tintura reagisce intensamente col Fe_2Cl_6 in verde violaceo; dose minima letale per topo cmc. 1 di tintura (= gr. 0.15 farina).

3° *Mollica pane + grasso di mais* + H_2O , peso totale gr. 20.

Dopo 8 giorni si ha sviluppo abbondante con diffusa sporificazione; si estrae con 50 cmc. alcool; la tintura reagisce intensamente con Fe^2Cl^6 ; 1 cmc. di tintura (= gr. 0.4 di terreno culturale) provoca forte avvelenamento.

4° *Mollica pane + pigmento mais*, peso totale gr. 19.

Dopo 8 giorni discreto sviluppo; si estrae con 50 cmc. alcool; reazione discreta con Fe^2Cl^6 ; 1 cmc. (= gr. 0.38 terreno culturale) dà fenomeni di avvelenamento assai meno spiccati e la morte interviene in capo a due giorni per paralisi.

5° *Mollica pane semplice inumidito*, peso totale gr. 20.

Dopo 8 giorni sviluppo discreto; si estrae con 50 cmc. alcool; reazione discreta col Fe^2Cl^6 ; 5 cmc. di tintura (ridotta in sospensione a cmc. 1.5) = gr. 2 di terreno culturale, provoca avvelenamento tipico e la morte in 24h.

Dal confronto della 1^a e 2^a colonna risulta che *il penicillo produce sostanze altrettanto tossiche, se non più, sviluppandosi sul mais liberato dal suo grasso che non nel mais normale*. Però dal confronto tra la colonna 3^a e le successive risulterebbe che il grasso di mais provocherebbe uno sviluppo più rigoglioso della muffa: ma, per potere affermare ciò, una sola serie di ricerche è insufficiente, avendovi potuto influire altre circostanze da noi non apprezzate.

Neppure il pigmento del mais non ha parte notevole nella formazione del veleno, come si può dedurre dal confronto delle 2 ultime colonne e neppure, nei limiti delle nostre ricerche attuali, non favorisce nè impedisce lo sviluppo dell'ifomicela.

A che dunque la maggiore tossicità dei prodotti del penicillo sul mais? Una volta ammesso che i composti fenolici sono prodotti di trasformazione dell'amido, resta a pensare che l'amido del mais sia di tal natura, da servire meglio degli altri ad elaborare fenoli di qualità più tossica. Noi conosciamo ben poco sulla costituzione chimica dei singoli idrati di carbonio. Ma per rispondere in modo definitivo al quesito, bisognerebbe poter disporre di campioni d'amido puro dei diversi cereali.

Egli è certo però che il *tipo d'azione*, a parte l'intensità dei fenomeni, è sempre lo stesso, anche se si impiega un altro amido.

Preparammo dei terreni culturali con amido di riso (scegliemmo l'amido di riso perchè più facile ad aversi puro in commercio) (1); in alcuni di questi mescolammo sali e grasso ottenuti rispettivamente dalla calcinazione e dallo sgrassamento di farina sana di mais; ad alcuni aggiungemmo anche peptone, a rappresentare le sostanze azotate del mais. Tutti questi componenti mescolati nella proporzione della media delle analisi date dal König furono messi in Erlenmeyer con 3 parti di acqua e sterilizzati nell'autoclave.

Il seguente quadro riassume i risultati delle varie prove.

(1) I risultati delle esperienze vanno quindi riferiti al solo amido di riso e non a quello di altri cereali.

Amido + sali —	Amido + sali + grasso —	Amido + sali + peptone —	Amido + sali + grasso + peptone —
Gr. 15 amido + > 0.24 sali + > 45 H ₂ O	Gr. 15 amido + > 0.24 sali + > 0.6 grasso + > 45 H ₂ O	Gr. 15 amido + > 0.24 sali + > 1.5 peptone + > 45 acqua	Gr. 15 amido + > 0.24 sali + > 0.6 grasso + > 1.5 peptone + > 45 acqua
Scarsa vegetazione.	Scarsa vegetazione.	Dopo 8 giorni si ha sviluppo rigo- gioso e abbon- dante. La tintura reagisce sporificazione. La tintura reagisce forte con Fe ² Cl ⁶ . 2 cmc. tintura (= gr. 0.3 di ami- do) provoca nel to- po spasmi e para- lisi: l'animale è però già rimesso in 2 ^a giornata.	Rigoglioso svi- luppo. La tintu- ra reagisce con Fe ² Cl ⁶ . 2 cmc. tin- tura (= gr. 0.8 a- mido) provocano nel topo fenomeni tipici di avvelena- mento da fenoli; l'animale si rimet- te nelle 24h.

Da questi risultati, oltre che una conferma delle premesse fatte, si deduce che la presenza di azoto (sia sotto forma di albumine, sia, come vedemmo già prima, sotto forma di sali d'ammonio) è *indispensabile al pen. glaucum per vivere una vita rigogliosa*: data questa condizione, può consumare maggiore quantità di sostanze carboidrate e formare più abbondanti le sostanze tossiche a comportamento fenolico.

Le sostanze tossiche sono prodotte dal penicillo durante tutto il periodo della sua vegetazione o soltanto in una determinata fase di essa? A risolvere questo quesito istituimmo le seguenti ricerche.

In 8 Erlenmeyew, della capacità di 100 cmc. ciascuna circa, si misero 10 gr. di farina sana di mais e 25 cmc. di acqua; seguì la sterilizzazione in autoclave e quindi l'inseminamento colla stessa quantità presso a

poco di spore di penicillo: dopo 2 giorni di sviluppo a temperatura dell'ambiente ed all'oscuro si procede ad un primo saggio. Una cultura si digerisce in 50 cmc. di alcool; poi si evapora completamente l'alcool e si riprende il residuo con acqua: 1 cmc. del liquido ($\equiv 0.2$ gr. di farina) produce in un topo fenomeni gravi e morte in 2 ore (?).

Nelle culture di 4 giorni la sporificazione è completa; se ne tratta una alla stessa guisa della precedente e si procede all'esperimento fisiologico: 1 cmc. dà al topo leggeri disturbi.

Cultura di 7 giorni: la sporificazione è completa su tutta la superficie: la tintura è acida e reagisce intensamente con Fe^2Cl^6 in verde bottiglia. 1 cmc. ($\equiv 0.2$ farina) sottocute provoca nel topo fenomeni marcati di intossicazione fenolica.

Cultura di 8 giorni: uguale risultato: pare che la cultura si arricchisca sempre più di composti fenolici.

Cultura di 9 giorni: risultati uguali ai precedenti.

Cultura di 10 giorni: reazione intensissima con Fe^2Cl^6 , reazione acida; 1 cmc. ($\equiv$ gr. 0.2 farina) provoca forti spasmi e contratture e quindi collasso; l'animale va rimettendosi a stento dopo le 24 ore.

Cultura di 16 giorni: risultati analoghi a quelli della cultura di 10 giorni.

Cultura di 26 giorni: la tintura reagisce sempre con Fe^2Cl^6 ed è sempre tossica.

Esaminando i risultati di queste esperienze, senza però dare molto peso a quello ottenuto con la cultura della 2^a giornata (della cui esagerata attività noi non ci sappiamo rendere giusta ragione), possiamo concludere:

La produzione di sostanze tossiche s'inizia bensì con l'inizio dello sviluppo dell'ifomiceta; ma raggiunge la massima intensità verso l'epoca della sporificazione, dopo la quale si mantiene si può dire a un livello costante, almeno fino alla 26^a giornata.

La tossicità delle culture ottenute in questa serie fu molto inferiore a quella osservata all'inizio di queste ricerche e ciò certo unicamente per una diversa attività delle muffe in rapporto a condizioni non tutte ben note. (V. pubblicazione precedente di Gosio).

È poi interessante notare che la tintura di mais pentcellare anche in culture molto vecchie (26^a giornata) risulta ancora acida, benché in grado molto minore, relativamente ai primi periodi. Invece in cultura Raulin, dove il germe consuma presto lo zuc-

chero e scompone allivante i sali d'ammonio, la diminuzione dell'acidità è più rapida; contemporaneamente scema la tossicità delle culture in terreno Raulin. Ciò si spiega con la neutralizzazione degli acidi fenoli, i cui sali alcalini hanno solo una debolissima azione tossica. Questa neutralizzazione, benché avvenga anche nel mais, è molto più lenta e meno spiccata, sia per la grande abbondanza di idrati di carbonio, che la muffa ha a disposizione, sia perchè la parte azotata del mais meno facilmente dei sali d'ammonio si presta per la formazione di composti basici.

Si potrebbe pertanto dire che i gradi di tossicità delle culture penicillari in liquido Raulin, messi in rapporto colla loro età, seguono una curva che, partendo dallo 0, si solleva grado grado sino ad un massimo, donde prestamente ricade presso all'asse delle ascisse; mentre nelle culture in salda di mais si ha l'elevazione di una curva graduale, che, raggiunto l'apice, vi si mantiene a lungo.

Abbiamo anche fatto alcuni saggi generici con culture su salda di mais di *aspergillus niger*, i cui risultati ci autorizzano ad affermare che anche per questo ifomiceta si ha la produzione di composti tossici di comportamento fenolico; le culture si tenevano 2 giorni nella stufa a $+37^{\circ}$, poi si passavano alla temperatura dell'ambiente, dove si lasciavano sporificare; quindi si sterilizzavano per 30' nella pentola di Koch. Coll'aspergillo la produzione di sostanze reagenti col Fe^2Cl^6 in verde scuro è molto maggiore e pure più forte ne è la tossicità, mentre le culture fatte su terreno Raulin si attenuano molto rapidamente colla progressiva neutralizzazione della acidità libera; anzi osservammo un periodo, in cui si aveva sviluppo di ammine.

Possono questi composti fenolici che si riscontrano nel mais, come effetto della vegetazione di ifomiceti, acquistare importanza di *pellagrogeni*?

In proposito faremo le seguenti osservazioni: gli ifomiceti sono diffusissimi in natura, specialmente il penicillo, che Lombroso

elevò ad indice di mais pellagrogeno e che De Giaxa ed altri riscontrarono costante nei chicchi e nelle farine di mais. È certo altresì che nel mais questo ed altri ifomiceti sono in grado di svilupparsi e formarvi un fitto micelio, che penetra fra le maglie del reticolo cotiledonale; vi è dunque tutta la probabilità della formazione dei veleni da noi studiati per parte degli ifomiceti nel mais male condizionato.

Di più è ben vero che fin'ora una ben evidente e costante forma d'intossicazione a mezzo delle culture di ifomiceti in mais, non ci riuscì ottenere se non nel *mus musculus*, ma abbiamo già detto più innanzi la ragione probabile dei risultati negativi in animali di maggior mole.

Siccome poi l'avvelenamento si effettua bene, come vedemmo, anche per via intestinale, così è giustificato ammettere il pericolo dell'uomo, se per inavvertenza o per necessità si alimenta di mais invaso da ifomiceti.

Noi non intendiamo con ciò affermare che la pellagra sia in senso esclusivo una intossicazione di prodotti aromatici fabbricati dagli ifomiceti sul mais; ci pare però poter affermare che *nel quadro della pellagra possono entrare in campo fenomeni di intossicazione da dette sostanze*. Non potevamo d'altra parte pretendere di provocare in un animale la pellagra sperimentale e ciò per parecchie ragioni: 1° un diverso organismo reagisce diversamente di fronte ad una stessa causa morbosa; 2° ci mancava un fattore importantissimo: il tempo, che ha sì larga parte nello sviluppo della pellagra, malattia a lentissimo decorso; 3° noi nella ristretta cerchia delle nostre esperienze non preparammo l'organismo alla intossicazione mediante una scarsa ed incongrua nutrizione, non preparammo cioè quella condizione che venne definita dal Lussana col nome di *fondo pellagroso*.

Ci sia poi lecito osservare che i veleni da noi studiati ledono appunto quei sistemi organici e quei centri che sono precipuamente intaccati nella pellagra.

Un'ultima serie di ricerche, a cui più modestamente daremo il nome di saggi esplorativi, venne da noi fatta su urine di pella-

grosi (1). Sopra urine di quattro pellagrosi noi potemmo constatare aumentata la quantità di fenoli solfoconiugati e liberi e gli ossiacidi aromatici che in quantità varia si sa dalle esperienze di Salkowsky trovarsi costante nelle urine normali. Ci si potrebbe obbiettare che un aumento di questi composti si riscontra già nelle urine nei casi di disturbi intestinali che sono quasi costanti nella pellagra. Ma tale aumento di composti fenolici e di ossiacidi aromatici si è riscontrato anche nelle urine di due pellagrosi che il dott. Antonini ci ha assicurato non presentare manifestazioni intestinali.

Noi abbiamo fatto qui soltanto dei saggi comparativi con le urine di individui sani; non abbiamo fatto delle determinazioni quantitative in confronto specialmente con urine di individui sani ad alimentazione maidica o almeno esclusivamente vegetale; a questo proposito però ci conviene osservare che i pellagrosi, di cui saggiavamo le urine, erano ricoverati nel manicomio, quindi sottratti alle influenze pellagrogene e essenzialmente all'azione della misera e insufficiente alimentazione. Riconosciamo che i saggi sin qui fatti hanno valore di una semplice esplorazione e devono essere seguiti da ricerche satte e sistematiche, perchè si possa giungere a potere o no affermare che nella pellagra si ha introduzione di veleni aromatici che si eliminino per le urine. Tali saggi però messi assieme agli altri criteri servono a convalidare l'idea che nella sindrome pellagrosa devono assai probabilmente aver parte i veleni sopradetti: quindi l'esatta conoscenza di alcuni di essi può essere profittevole per dedurre le norme di una razionale profilassi.

La grande sensibilità dimostrata dal topo casalingo verso i veleni del mais, ci spinge infine a consigliarlo come animale di prova nei casi, in cui si debba dare un giudizio sul grado di avaria che questo cereale possa avere subito. Sia da questo saggio fisiologico, sia da quello chimico della reazione fenolica già consigliato da uno di noi, si possono desumere buoni criterii d'interesse pratico.

Roma, novembre 1896.

(1) I campioni ci vennero gentilmente spediti dal dott. Giuseppe Antonini, aiuto al manicomio provinciale di Bergamo. All'egregio collega esprimiamo la più viva gratitudine.

LETTERATURA.

- LUSSANA. — Sulla pellagra. Milano, 1854, 1859.
LOMBROSO. — Trattato profilattico e clinico della pellagra. Torino, 1892.
MONTI e TIRELLI. — Ricerche sui microrganismi del mais guasto. (*Rivista d'Igiene e Sanità pubblica*, 1891.)
DE GIAXA. — Contributo alle cognizioni sulla etiologia della pellagra. (*Annali dell'Istituto d'igiene di Roma*, 1892-93.)
PELIZZI e TIRELLI. — L'etiologia della pellagra in rapporto alle tossine del mais guasto. (*Annali di freniatria*, 1894.)
V. TIRELLI. — Sull'azione fisiologica dei prodotti batterici del mais guasto. (*Giornale dell'Accademia di medicina di Torino*, 1895.)
SALKOWSKY. — Über die Wirkung und das chemische Verhalten des Phenols im thierischen Organismus. (*Plüger's Archiv*, v. V, 1872.)
S. DUPLAY et M. CAZIN. — De l'action de l'acide phénique sur les animaux. (*Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, vol. 112, 1891.)
B. GOSIO. — Ricerche batteriologiche e chimiche sulle alterazioni del mais. (*Rivista d'Igiene e Sanità pubblica*, 1896.)

