

## Effetti tossici prodotti da derivati della calciocianamide sulla Mosca delle olive e sulle Gambusie

In seguito ai risultati ottenuti usando la calciocianamide come insetticida, risultati esposti in una precedente nota (1), le nostre ricerche continuarono perseguendo un duplice fine:

1°) assicurarsi che delle due sostanze che si possono ottenere in abbondanza dalla calciocianamide grezza trattata con acqua, e cioè la cianamide e la diciandiamide, soltanto la prima è la sostanza tossica che agisce come insetticida;

2°) estendere gli esperimenti con la cianamide alla Mosca olearia e ad altri animali non ancora sperimentati.

Al primo fine fummo condotti in seguito a notizie discordanti che compaiono nella letteratura italiana recente che tratta della calciocianamide come disinfestante.

Infatti il TILLI (2) asserisce di aver ottenuto l'uccisione di larve d'Anofeli intorno alla 20<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> ora con soluzioni di diciandiamide al 0,14% e al 0,33%, e asserisce inoltre che dopo 10 giorni tale soluzione perde ogni potere tossico.

D'altra parte noi, sperimentando su larve di Maggiolino con una soluzione di cianamide pura, avevamo ottenuto effetti uguali a quelli prodotti da una soluzione di calciocianamide grezza, e ne avevamo dedotto, come risulta dalla citata nota, che il principio tossico della calciocianamide era realmente la cianamide formantesi nella soluzione fresca di calciocianamide.

### ESPERIMENTI CON DICIANDIAMIDE

#### Preparazione della sostanza.

La diciandiamide venne preparata dalla calciocianamide grezza, riscaldando una miscela di calciocianamide grezza e di acqua, riscaldando fino all'ebollizione e mantenendovela per circa mezz'ora. Fil-

(1) GRANDORI REMO — L'azione disinfestante della calciocianamide contro la mosca domestica sperimentalmente dimostrata. - Boll. Zool. Agr. e Bachicoltura, Milano, Vol. VIII, 1938.

(2) TILLI P. — Disanofelizzazione idrica mediante la calciocianamide. - Rivista di Malariologia, Anno XII, n. 4, Roma, 1933.

trata in seguito la miscela, si ottenne nel liquido filtrato la precipitazione della diciandiamide per raffreddamento. La sostanza ottenuta allo stato cristallino venne controllata chimicamente nel Laboratorio di Industrie Agrarie della R. Università di Milano, e risultò diciandiamide pura.

#### Esperimenti con la mosca domestica.

Si prepararono con la diciandiamide soluzioni al 0,5 ‰, 1 ‰, 3 ‰, 5 ‰ alle quali venne aggiunto melasso di bietola nella proporzione del 10%.

Si formarono cinque lotti di 8 mosche ciascuno raccolte la mattina del 16 dicembre 1938 nella stalla di una cascina in prossimità del Laboratorio. I trattamenti furono eseguiti lo stesso giorno. Dopo 3 giorni i risultati erano i seguenti:

Soluzione 0,5 ‰:	4 mosche vive e 4 morte
» 1 ‰:	5 » » 3 »
» 3 ‰:	7 » » 1 »
» 5 ‰:	7 » » 1 »
Controllo:	6 » » 2 »

Il 23 Dicembre successivo trovammo tutte le mosche del controllo morte in tutti i lotti trattati con diciandiamide qualche mosca era ancora viva.

Il risultato di questo esperimento per quel che riguarda la tossicità della diciandiamide verso la mosca domestica è nettamente negativo, specialmente se si pensa che la mortalità, variabilissima nei diversi lotti, è da ricondurre certamente alla stagione quasi invernale e alla diversa età delle mosche catturate in stalla.

Tuttavia credemmo utile estendere la sperimentazione ad animali acquatici; data la stagione non rimaneva altra scelta che quella di pesci di facile allevamento.

#### Esperimenti con le Gambusie.

Quattro Gambusie di medie dimensioni furono poste il 24 gennaio 1939 in una soluzione di diciandiamide al 2 ‰ in acqua di fonte, mantenendoveli sempre a digiuno. Dopo 10 giorni di permanenza nella soluzione, constatando che le Gambusie non denotavano alcun disturbo, pensammo di rinnovare la soluzione di diciandiamide.

Dopo altri dieci giorni le Gambusie erano sempre vive e vivaci, e perciò decidemmo di continuare l'esperimento fino alla morte dei pesci per inedia e rinnovando la soluzione di diciandiamide ogni 10 giorni.

Delle quattro Gambusie iniziali una morì il 28 febbraio per trauma provocato nelle operazioni di cattura per il cambio della soluzione; un'altra morì per inedia l'8 marzo; le due superstiti vivono tuttora (fine di marzo).

Per quanto le generalizzazioni siano pericolose, noi siamo giunti alla convinzione, forti del controllo chimico esercitato, che la diciandamide pura non è tossica per animali acquatici e per le mosche, e sono quindi da accogliere con ogni riserva i risultati ottenuti dal TILLI. È lecito pensare che egli non abbia usato una soluzione di diciandamide pura, ma una soluzione di diciandamide mista a cianamide, e perciò tossica per un primo periodo; ma poi con tutta probabilità, la cianamide si sarà trasformata in diciandamide, rendendo quindi, dopo 10 giorni dalla preparazione della soluzione, completamente innocua la soluzione stessa.

### ESPERIMENTI CON CIANAMIDE

#### Preparazione della sostanza.

La cianamide allo stato di grande purezza è stata preparata da noi col metodo « Ulpiani » (1), e cioè precipitando il sale calcico dell'acido cianamido-carbonico con l'immissione di una corrente di CO<sub>2</sub> nella soluzione fredda di calciocianamide grezza, e sottoponendo a sua volta il sale ottenuto all'azione prolungata dell'acido carbonico fino a che si è ottenuta l'idrolisi completa del sale in cianamide e carbonato di calcio. La titolazione della cianamide così ottenuta è stata fatta presso il Laboratorio di Industrie Agrarie della R. Università di Milano.

Inoltre si usò anche la soluzione di cianamide pura conservata dal 1936 nel Laboratorio di Chimica agraria di Milano, e che al momento dell'esperimento risultò al titolo del 2,4 ‰.

Infine si preparò la cianamide pura dalla calciocianamide col metodo BAUM da noi modificato, ottenendo una quantità di cianamide corrispondente al 24% in peso della calciocianamide grezza usata. Anche la cianamide così ottenuta è stata titolata presso il Laboratorio di Industrie Agrarie di Milano.

#### Esperimenti con soluzioni di cianamide pura contro il *Dacus oleae* (Mosca olearia).

Per la cortesia del Prof. Guido PAOLI potemmo avere a disposizione il 10 gennaio una sessantina di pupe di *Dacus oleae*.

(1) ULPANI CELSO — *Opera omnia* . Vol. II<sup>o</sup>, Pag. 431-432 . F.lli Marescalchi Editori, Casale Monferrato, 1928.

Poste in una gabbia tenuta in una camera ben riscaldata, dalle pupe ottenemmo via via, stentatamente, alcune poche mosche adulte. Dato lo sfarfallamento non contemporaneo, i trattamenti furono individuali. Ciascuna mosca per un giorno o due dallo sfarfallamento era mantenuta digiuna perchè si affamasse, e poi veniva posta in una grossa provetta che si chiudeva con un tappo di cotone idrofilo imbevuto nella soluzione di cianamide alla quale si era precedentemente aggiunto il 10-20% di melasso di bietola. (1)

Le mosche dimostrarono tutte di appetire la soluzione. Il controllo venne fatto con un solo individuo, un maschio di *Dacus oleae*, che, posto in una grossa provetta in modo simile alle mosche trattate con cianamide, venne nutrito con soluzione acquosa di melasso al 10%. Tale mosca, sfarfallata il 13 gennaio 1939, è morta il 14 febbraio successivo, vivendo quindi in captività per oltre un mese.

Riassumiamo nel seguente specchietto tutti i dati riferentisi a questi esperimenti:

N. d'ordine delle mosche trattate	Titolo della soluzione di cianamide aggiunta al melasso	Data di sfarfall.	ESITO
1	1 ‰	18 - I - 1939	sopravvissuta
2	2 ‰	2 - II - 1939	morta in 24 ore
3	2 ‰	2 - II - 1939	morta in 24 ore
4	2 ‰	21 - I - 1939	morta in 24 ore
5	2,2 ‰	10 - I - 1939	morta in 6 ore
6	2,4 ‰	23 - I - 1939	morta in 60 ore
7	2,4 ‰	25 - I - 1939	morta in 24 ore
8	2,4 ‰	26 - I - 1939	morta in 60 ore
9	2,4 ‰	26 - I - 1939	morta in 60 ore
10	3 ‰	10 - II - 1939	morta in 8 ore
11	3 ‰	10 - II - 1939	morta in 24 ore
12	4,4 ‰	10 - I - 1939	morta in 24 ore
13 (controllo)	—	13 - I - 1939	vissuta 32 giorni

(1) Brevetto 829/1939 (25 gennaio).

### Osservazioni dopo i trattamenti.

Le suddette mosche poste nelle provette vennero accuratamente osservate dopo i trattamenti, e potemmo così accertare:

1°) che le mosche olearie appetivano molto il melasso mescolato a cianamide, e bevevano avidamente e a lungo la miscela avvelenata così come la mosca del controllo beveva quella normale;

2°) che i disturbi derivanti dall'avvelenamento si rendevano manifesti breve tempo dopo il pasto. Dapprima le mosche perdono la capacità di volare, in seguito provano grande difficoltà a rimettersi sulle zampe quando siano capovolte e denotano infine un sempre più grave disordine nelle contrazioni muscolari. Sovente le mosche avvelenate rimangono ad intervalli paralizzate con un'ala aperta e l'altra distesa lungo il corpo. Negli stadi avanzati dell'intossicazione le loro zampe non sono capaci di aderire perfettamente alla parete di vetro, dimodochè le mosche scivolano sul substrato. Parecchie cadono per qualche tempo in uno stato di morte apparente, per riprendere poi una effimera vitalità.

È evidente quindi che, anche quando la morte si fa attendere molte ore od anche sopravviene solo al 2° o 3° giorno dalla prima ingestione tossica, tuttavia questi fenomeni di paralisi parziale e più o meno profonda mettono praticamente fuori di combattimento la mosca perchè la rendono incapace di volare. La rapidità di azione del veleno è evidentemente proporzionale alla quantità di liquido tossico introdotto con le prime ingestioni.

Si può concludere che nei nostri esperimenti la miscela attrattiva e tossica formata da soluzione di cianamide pura e melasso di bietola, ha dato risultato nettamente positivo contro la mosca olearia adulta usando soluzioni di cianamide che vanno dal 2 al 4.4 ‰, sia preparate di fresco, sia preparate da 3 anni.

Nè si può seriamente obiettare che il numero esiguo degli individui sperimentati non permette di trarre conclusioni sicure; le costanti ed enorme differenza fra la mosca controllo e le mosche trattate, non lascia alcun dubbio, e siamo stati noi stessi che dinanzi alla chiarezza dei risultati non abbiamo insistito in ulteriori esperimenti, nella persuasione che questi, fatti su 10 individui o ripetuti su 100, hanno, nel nostro caso, lo stesso valore.

### Esperimenti con le Gambusie.

Il 19 dicembre 1938 introducemmo 5 Gambusie di grandezza media in una soluzione di cianamide pura al 2 ‰; altre 5 Gambusie vennero poste in soluzione di cianamide all'1 ‰. Come controllo tenemmo 4 Gambusie in acqua di fonte senza fornire loro alcun nutrimento.

Dopo 4 ore dall'immissione i pesci immessi nella soluzione al 2 ‰ morirono, mentre quelli immessi nella soluzione all'1 ‰ morirono dopo 9 ore. Le Gambusie del controllo non solo vissero benissimo, ma il 25 gennaio servirono all'esperimento con la diciandiamide e due di esse vivono tuttora senza nutrirsi, come precedentemente abbiamo riferito.

Il 16 febbraio 1939 l'esperimento venne ripetuto con una soluzione di cianamide pura al 5 ‰; le quattro Gambusie immesse nella soluzione morirono nel termine di mezz'ora.

L'8 marzo 1939 ripetemmo ancora l'esperimento con una soluzione di cianamide recentemente preparata, al titolo del 2 ‰; vi introducemmo 4 Gambusie che digiunavano dalla metà di febbraio.

Il digiuno aveva resi chiari e trasparenti i pesci, cosicchè si scorgeva nettamente nel loro corpo il rosso del sangue ben evidente specialmente nella regione cefalica. Seguendo gli effetti dell'intossicazione, la trasparenza degli animali ci permise di osservare un *graduale e rapido annerimento del sangue*. Non ci è stato per ora possibile chiarire il fenomeno dal punto di vista biochimico; è probabile che esso possa spiegarsi come un fenomeno di riduzione dell'emoglobina effettuantesi per assorbimento della cianamide attraverso il delicato epitelio branchiale.

In effetto la cianamide agisce come riducente. A riprova di questa asserzione stanno i risultati dei seguenti saggi: Aggiungendo 10 c.m.c. di una soluzione di cianamide pura all'1.6% a 100 c.m.c di acqua sterilizzata avente pH = 7.35 e rH = 37,70, si abbassava l' rH a 24.7; aggiungendo ancora 1 c.m.c. della stessa soluzione, si abbassava l' rH a 22.7.

Il fenomeno verrà studiato da noi in seguito.

### Conclusioni.

Gli esperimenti sopradescritti dimostrano:

1°) che il *Dacus oleae* adulto appetisce la miscela costituita da melasso di bietola e soluzione di cianamide pura di titolo dall'1 al 4,4 ‰;

2°) che quando la soluzione di cianamide pura aggiunta al melasso, ha una concentrazione non inferiore al 2 ‰, essa è tossica per il *Dacus oleae* adulto, il quale muore immancabilmente dalle 6 alle 60 ore dopo l'ingestione della miscela;

3°) che anche le Gambusie muoiono in poche ore quando siano immesse in una soluzione di cianamide pura al 2 ‰ per effetto di cianamide pura;

4°) che uno degli effetti specifici molto evidenti della cianamide sulle Gambusie, e che accompagnano la rapida intossicazione di questi pesci è l'annerimento del sangue.

