

16. R. NEGRI, F. MUNTONI, R. D'AMORE. — Ricerche sull'azione antibiotica dei senfali estratti da varie forme orticole di semi di *Raphanus Sativus* L., var. *radicula* Pers., nei confronti di numerosi germi, compresi due ceppi di *bb. tubercolare* tipo aviario Cow 18 e Cow 70 - (Nota II).

Riassunto. — Gli AA. hanno isolato dai semi di *Raphanus sativus* L., var. *radicula* Pers., una sostanza ad azione antibiotica particolarmente attiva nei confronti di numerosi germi gram-negativi e di due ceppi tubercolari tipo aviario (Cow 18 e Cow 70). Tale sostanza è stata caratterizzata e definita chimicamente ed è risultata simile al « sulforafene » (senfalo) di Schmidt e Karrer, mentre si differenzia nettamente dalla « raphanina » di Ivanovics e Horvath.

Tale sostanza — di cui si accetta la denominazione di « sulforafene » — è risultata però tossica per i topini bianchi ed irritante per i comuni animali di laboratorio per cui gli AA. dubitano della possibilità d'impiego di tale sostanza.

Résumé. — Les Auteurs ont isolé des graines de *Raphanus sativus* L., var. *radicula* Pers., une substance à action antibiotique particulièrement active vis-à-vis de nombreux germes gram-négatifs et de deux souches tuberculeuses du type « aviaris » (cow 18 et cow 70). Cette substance a été caractérisée et définie chimiquement, et s'est révélée semblable au « sulforaphène » (cénevol) de Schmidt et Karrer, tandis qu'elle se différencie nettement de la « raphanine » d'Ivanovics et Horvath.

Cette substance — qui a été appelée « sativine » — s'est toutefois révélée toxique pour les souris blanches et irritante pour les animaux usuels de laboratoire. C'est pourquoi les Auteurs sont en doute sur la possibilité d'emploi de la substance en question.

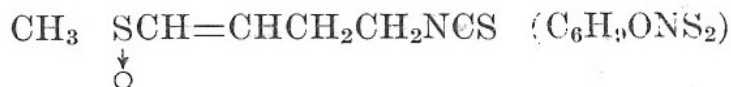
Summary. — The Authors have succeeded in isolating from the seeds of *Raphanus sativus* L., var. *radicula* Pers., a substance with a particularly energetic antibiotic action against numerous gram-negative germs and two tubercular specie (Cow 18 and Cow 70). This substance has been defined chemically and it appears similar to Schmidt and Karrer's « sulphoraphene » but presents considerable differences in comparison with Ivanovics and Horvath's « raphanine ».

This substance has been denominated « sativina ». It is, however toxic to white mice and irritant for other usual laboratory animals, and for this reason the Authors hold doubts concerning the possibility of its application.

Zusammenfassung. — Verff. haben aus *Raphanus Sativus*-Samen, Var. *Radicula Pers.*, eine Substanz isoliert die eine ganz besondere antibiotische Wirksamkeit für zahlreiche gram-negative Keime und für 2 Tuberkelstämme Cow 18 und Cow 70 besitzt. Diese Substanz weist chemisch eine kennzeichnende Ähnlichkeit mit dem Sulforaphen von Schmidt und Karrer auf, während sie sich deutlich vom Raphanin von Ivanovics und Horvath unterscheidet. Die Substanz, der der Name *Sativin* gegeben wurde, ist jedoch für die weissen Mäuse giftig und reizt die gewohnten Laboratoriumsversuchstiere; daher halten es Verff. unwahrscheinlich selbe benützen zu können.

Uno di noi ⁽¹⁾ ha messo in evidenza, in una precedente comunicazione, che gli estratti acquosi di semi di *Raphanus sativus* L., var. *radicula Pers.*, contengono una sostanza antibiotica, attiva « in vitro » verso numerosi germi gram-positivi e gram-negativi ed in particolare verso il *V. Cholerae*. A tale sostanza ad azione antibiotica venne dato in un primo tempo il nome di « sativina » per differenziarla dalla « rafanina » isolata da G. IVANOVICS e S. HORVATH ⁽²⁾ da un altro *Raphanus sativus* di varietà non specificata e i cui spettri antibiotici si differenziano da quelli della sativina. Essendo pertanto sorto il dubbio che la « rafanina » fosse una sostanza diversa della « sativina » si è cercato di isolare e caratterizzare il principio attivo delle varie forme orticole di semi di *R.s.L.*, var. *radicula Pers.*, e di svolgere uno studio comparativo sulle loro proprietà antibiotiche.

Mentre queste ricerche erano in corso, SCHMIDT e KARRER ⁽³⁾ hanno descritto una sostanza estratta dai semi di *Raphanus sativus* L., var. *alba*, sostanza che si differisce completamente da quella descritta e denominata rafanina da IVANOVICS e HORVATH. Nella nota di SCHMIDT e KARRER non si fa però riferimento alle proprietà antibiotiche della sostanza da loro isolata, un senfola, ben individuato e caratterizzato, per il quale propongono il nome di « sulforafene », fissandone la seguente formula:

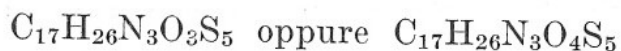


corrispondente al P. M. di 175,20 ed alla seguente composizione centesimale:

Calc:	:	C	41,10	H	5,18	N	8,00	S	36,60
Trov.	:		41,01		5,14		8,06		35,48
			41,42		5,39		8,41		35,58

Nella determinazione del P. M. per crioscopia essi hanno ottenuto con canfora il valore di 215, con benzolo quello di 174.

La sostanza descritta da Schmidt e Karrer risulta quindi interamente dissimile da quella di Ivanovics e Horvath, i quali avevano, in base alla sola analisi elementare, proposto come formula bruta



ESTRAZIONE DELLA SOSTANZA ANTIBIOTICA DAI SEMI DI R. S. L., VAR. RADICULA PERS.

Il procedimento usato da uno di noi ⁽⁴⁾ per l'estrazione della sostanza è il seguente:

gr. 300 di semi grossolanamente macinati vengono tenuti a contatto per 40 minuti e agitando di quando in quando con cm³ 1200 di acqua distillata. Si filtra per tela fitta e il filtrato (cm³ 800 circa) si tratta in pallone separatore con cm³ 150 di etere di petrolio (D. 0,625 - 0,640). Si lasciano a contatto i due liquidi, sbattendo fortemente di tempo in tempo, per 24 h, e si separa quindi la parte acquosa dall'etere di petrolio che si è intensamente colorato in giallo per l'estrazione della maggior parte del pigmento. La porzione acquosa, sempre in pallone separatore, viene quindi addizionata di cm³ 200 di cloroformio, col quale viene lasciata in contatto, sbattendo ogni tanto per 12 h. I due liquidi che si sono in parte emulsionati, si separano per centrifugazione e la porzione cloroformica, si distilla su bagnomaria. Il residuo si riprende con cm³ 200 di acqua distillata e si ripete l'estrazione con cm³ 100 di cloroformio. Separata la porzione cloroformica, si distilla su bagnomaria la maggior parte del solvente e, quando il liquido è ridotto a circa cm³ 10, si lascia evaporare a temperatura ambiente, in cristallizzatore, il cloroformio rimasto. Si ha come residuo un liquido oleoso di colore giallo paglierino assai chiaro, di sapore bruciante, neutro al tornasole. Tale sostanza è solubile in acqua, cloroformio e metanolo, solubile in etere etilico e insolubile in etere di petrolio. La resa per un chilo di semi di R. s. L., var. rad. Pers. denominate « Tondo bianco » e « Tondo rosso quarantino », oscilla tra i 3 e i 4 grammi mentre dalle forme orticole denominate « Tondo rosso a punta bianca » e « Lungo rosso » la resa massima per ogni chilo oscilla sui 2 grammi.

L'analisi elementare ha dato i risultati seguenti:

C 40,70 % ; H 5,39 % ; N 7,81 % ; S 35,94 %

Carbonio, idrogeno e azoto sono stati determinati microanaliticamente, lo zolfo macroscopicamente a mezzo della bomba di Mahler.

La determinazione del P. M. per crioscopia con canfora e con benzolo ha dato i seguenti risultati:

Solvente	K	Solvente usato g	Sostanza usata g	Δ	T ⁰	P. M.	Media
Canfora	40	0,2885	0,0141	8,8	222,1	176,4	
Benzolo	5,12	28,45	0,1518	0,149	183,5		
		31,14	0,1837	0,178	169,3		

Il comportamento della sostanza estratta dai semi di R. s. L., var. rad. Pers. nei confronti del nitrato d'argento, sia in soluzione acquosa che ammoniacale, è uguale a quello descritto da Schmidt e Karrer per il sulforafene. Si ha in entrambi i casi un precipitato (più rapidamente con la soluzione ammoniacale) di solfuro d'argento.

Da quanto determinato risulta quindi che anche i semi di R. s. L., var. rad. Pers., contengono la medesima sostanza (senfola) trovata da Schmidt e Karrer nella varietà alba, sostanza alla quale è dovuta l'azione antibiotica riscontrata da uno di noi ⁽¹⁾ di cui si riportano gli spettri antibiotici ottenuti con sostanza pura (v. tabella n. 1).

Tale sostanza che d'ora in poi chiameremo « sulforafene » si è inoltre dimostrata termostabile in quanto non viene distrutta in 30' a 100° C. a b. m. mentre la sua attività antibiotica diminuisce di circa un terzo, del valore iniziale, dopo 1 h a 100° C. in b. m.

La sostanza non viene pure alterata nel suo potere antibiotico nemmeno da soluzioni di HCL al 10 % anche dopo 5 h di contatto, da soluzioni di pepsina al 3 ‰ dopo 5h di contatto, da siero e sangue defibrinato di coniglio, cavia, e montone (prove « in vitro » su piastre di agar-germi).

La sostanza non ha azione emolitica nei confronti delle emazie di montone, coniglio e cavia.

AZIONE ANTIBIOTICA DEL SULFORAFENE « IN VITRO ».

Per tali ricerche ci siamo serviti dei senfoli estratti dalle forme orticole dei semi di R. s. L., var. rad. Pers., denominate « Tondo bianco » e « Tondo rosso quarantino » che davano una resa di senfola di circa 4 gr. per kg. di semi. Vennero ripetute le ricerche fatte da uno di noi in una nota preliminare ⁽¹⁾ adoperando però, invece degli estratti acquosi, i senfoli estratti chimicamente col metodo sopra descritto dai semi in questione. Per stabilire l'azione antibiotica venne usato lo stesso metodo indicato da Ivanovics e Horvath (piastre di agar-germi, metodo dei cilindri) ⁽⁵⁾; i valori medi di inibizione, espressi in millimetri, ottenuti dalla lettura di 10 piastre di agar-germi per ogni germe cimentato, sono riportati nella tabella

TABELLA I

SPETTRI ANTIBIOTICI COMPARATIVI DELLA "RAFANINA" E DEL SULFORAFENE

Specie batteriche	Concentrazione di rafanina inibente per cc.	Aloni di inibizione	Specie batteriche	Concentrazione di sulforafene inibente per cc.	Aloni di inibizione
Stafilococcus aureus	1 mgr.	mm. 18	Stafilococcus aureus	1 mgr.	mm. 16
B. coli	1 »	» 16	B. coli	1 »	» 30
Salm. thyphy H	1 »	» 19	Salm. thyphy H	1 »	» 30
Salm. typhy O	1 »	» 24	Salm. typhy O	1 »	» 32
Salm. Schott-Müller (E)	1 »	» 22	Salm. Schott-Müller (B)	1 »	» 30
Bact. Shiga-Kruze	1 »	» 16	Bact. Shiga-Kruze	1 »	» 32
Pseudomonas aeruginosa	1 »	» 19	Pseudomonas aeruginosa	—	—
B. antracis (avirulento)	1 »	» 23	B. antracis (avirulento)	1 »	» 22
B. antracis (virulento)	1 »	» 22	B. antracis (virulento)	1 »	» 20
B. subtilis	1 »	» 20	B. subtilis	1 »	» 20
B. prodigiosus	1 »	» 12	B. prodigiosus	—	—
			V. Cholerae Inaba	1 »	» 32
			V. Cholerae Alessandria	1 »	» 30
			V. Cholerae Giappone	1 »	» 30
			V. Cholerae El Korein	1 »	» 32
			B. tuberculare, aviario (Cow 18) .	1 »	» 36
			B. tuberculare, aviario (Cow 70) .	1 »	» 36

n. 1 insieme ai valori ottenuti con la « rafanina » dei predetti AA. Di notevole interesse si è dimostrata la sensibilità dei due ceppi tubercolari, tipo aviario (Cow 18 e Cow 70) al « sulforafene » (fig. 1); per tali germi fu pure usato il metodo dell'agar-germi adoperando però dell'agar-siero e facendo la lettura dopo 48h di termostato a 37° C (fig. 1). Tali ceppi tu-

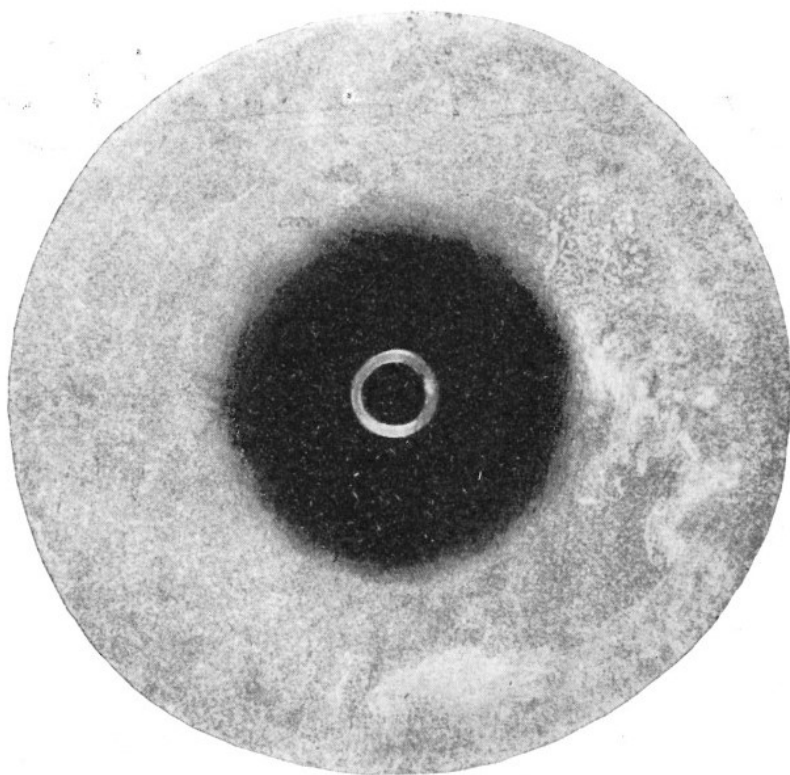


Fig. 1 — Piastra di agar-germi (B. Tubercolare, tipo aviario Cow 18). Alone di inibizione ottenuto con mgr. 1/cc di « sulforafene »

bercolari sono adattati ad un particolare terreno sintetico (Sauton modificato) che ne permette un rigoglioso sviluppo in 36-48 h con intorbidamento uniforme del mezzo colturale.

Dagli spettri antibiotici riportati nella tabella 1, risulta che a parità di concentrazione, il « sulforafene » si dimostra molto più attivo della « rafanina » verso i germi gram-negativi. Inoltre, la dose minima di « sulforafene » capace di inibire lo sviluppo dei germi gram-negativi e dei due ceppi tubercolari è di 100 γ /cc; mentre per i germi gram-positivi la dose minima inibente è di 1 mgr/cc. Si viene così a confermare anche dal punto di vista antibiotico la supposizione avanzata da uno di noi in una nota preliminare ⁽¹⁾ e cioè che la sostanza estratta dai semi di R. s. L., var. radicola Pers., è completamente diversa da quella isolata da Ivanovics e Horvath.

TOLLERANZA E SOMMINISTRAZIONE DEL « SULFORAFENE » NEGLI ANIMALI DA ESPERIMENTO.

La sostanza è stata somministrata per via orale e parenterale a topini bianchi, cavie e conigli. I topini bianchi del peso di 10-15 gr. sono sensibilissimi al « sulforafene » e muoiono dopo pochi secondi in preda a convulsioni quando la sostanza viene somministrata per via parenterale alla dose di 10 mgr. per Kg. di peso. La stessa dose, somministrata per via orale, dà una sopravvivenza di circa il 30% negli stessi animali. L'esame anatomo-patologico dei topini venuti a morte dopo qualche giorno dall'ingestione della sostanza mette in evidenza note imponenti di flogosi gastro — enterica di tipo emorragico.

Le cavie del peso di circa 400 — 500 gr. sopravvivono tutte — dopo un mese di osservazioni — sia se la sostanza viene somministrata per os che per via parenterale alla dose di 100 mgr. per Kg. di peso. Se la somministrazione viene fatta per via parenterale, gli animali si mostrano subito agitatissimi ed emettono stridii per qualche secondo, per ritornare subito tranquilli e sopravvivere a lungo presentando solo — a volte — e dopo qualche giorno, reazione infiammatoria al punto d'inoculazione.

I conigli sopportano bene le inoculazioni sottocutanee, intramuscolari, endoperitoneali ed endovenose di 150 mgr. di sostanza per Kg. di peso e per diversi giorni. A parte le manifestazioni dolorose immediate all'inoculazione, gli animali sopravvivono per lungo tempo senza manifestare disturbo alcuno. L'instillazione della sostanza anche alla dose di 100γ/cc. nel sacco congiuntivale del coniglio ha dato sempre luogo a fenomeni infiammatori con fotofobia e lacrimazione imponente. La prova del potere pirogeno della sostanza fatta nei conigli alla dose di 10 mgr. per Kg. di peso è stata negativa (nessun rialzo termico).

Da queste esperienze « in vivo » risulta che il « sulforafene » non si è dimostrato tossico per cavie e conigli mentre lo è stato per i topini bianchi specie se trattati per via parenterale. Si è però dimostrato altamente irritante se somministrato per via parenterale. I tentativi fatti per togliere questo potere irritante mediante l'aggiunta di anestetici locali del tipo della novocaina, non hanno dato esito favorevole. L'azione antibiotica della sostanza rimaneva immutata ma persisteva il potere irritante.

CONCLUSIONI.

Da quanto esposto risulta che:

- 1) La sostanza antibiotica estratta dai semi di *Raphanus sativus* L. var. rad. Pers. è risultata chimicamente differente dalla « rafanina » di

G. Ivanovics e S. Horvath; è invece risultata chimicamente simile al « sulforafene » (senfola) di Schmidt e Karrer;

2) l'attività antibiotica del « sulforafene » si è dimostrata superiore a quella della « rafanina », specie nei confronti dei germi gram-negativi. Di notevole interesse è pure la spiccata azione nei confronti dei due ceppi tubercolari, tipo aviario (Cow 18 e Cow 70);

3) a causa del potere irritante si dubita sulla possibilità di impiego del « sulforafene »; sono comunque in corso ricerche in tale senso.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Microbiologia e di Chimica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) NEGRI R.: Rendiconti Ist. Sup. Sanità - Vol. XI, parte IV, 990-993.
 - (²) G. IVANOVICS e S. HORVATH: Nature 160, 4061, 297 (1947).
 - (³) SCHMIDT e KARRER: Helv. ⁷1, 1017 (1948).
 - (⁴) MUNTONI F.: Rendiconti Ist. Sup. Sanità - Vol. XIII, 174, (1950).
 - (⁵) FLOREY e Coll.: The Lancet 177, 178 (1941).
 - HEATLEY: The Biochemical Journal - Vol. 1, 38, 61-65 (1944).
-