

22. S. BETTINI e M. BOCCACCI. — Meccanismo d'azione tossica degli acidi iodo-, bromo-, e cloroacetico sugli insetti e proprietà insetticide di alcuni loro derivati (*).

Riassunto. — Vengono riferiti i risultati di una serie di ricerche sul meccanismo di azione tossica degli acidi iodo-, bromo- e cloroacetico negli insetti e sul potere insetticida di alcuni loro derivati.

E' stato dimostrato: a) che gli acidi iodo-, bromo- e cloroacetico posseggono una notevole attività insetticida per contatto, su mosche domestiche sia sensibili che resistenti ai prodotti clorurati; che tale attività insetticida è caratteristica anche di alcuni esteri dell'acido cloroacetico dei quali ne è stata preparata una serie;

b) che le sostanze in esame bloccano la triosofosfatodeidrogenasi del tessuto muscolare di *P. americana* e di *M. domestica* in vitro ed in vivo, provocando la paralisi in contrattura, analogamente a quanto si verifica per i vertebrati, e che esiste un parallelismo fra percentuale di inibizione dell'enzima e percentuale di mortalità;

c) che le sostanze studiate, penetrando in vivo attraverso l'esoscheletro di *P. americana* determinano la paralisi dei gruppi muscolari più vicini al punto di penetrazione e provocano, se inoculati fra gli urotergiti l'arresto delle pulsazioni del vaso dorsale che va in contrattura come i muscoli scheletrici; sul preparato di vaso dorsale l'acido iodoacetico provoca l'arresto delle pulsazioni entro 30' circa alla concentrazione di 1:5000, ed entro 120' alla concentrazione di 1:10000;

d) che queste sostanze determinano la paralisi in contrattura della muscolatura dell'intestino anteriore isolato di *P. americana* e di *Cybister lateralmarginalis* stimolato con KCl;

e) che l'acido iodoacetico alla dose di 900 µg/g determina una inibizione del 19% circa del contenuto in Coenzima A del muscolo di *P. americana*, mentre una eguale dose inibisce totalmente l'attività triosofosfatodeidrogenasica del muscolo stesso.

E' stato inoltre studiato il destino dell'acido bromoacetico marcato con C¹⁴ inoculato in *P. americana*. Separazioni cromatografiche del sangue di blatta prelevato dopo l'inoculazione hanno messo in evidenza che l'acido bromoacetico scompare entro 45' mentre appaiono altri composti radioattivi che aumentano col tempo. Le autoradiografie di alcune separazioni elettroforetiche su carta di estratti deproteinizzati di blatte

(*) Relazione tenuta al X Congresso Internazionale di Entomologia, Montreal, Canada, 17-25 agosto 1956 e che verrà pubblicata in inglese negli Atti del Congresso.

trattate hanno mostrato cinque componenti radioattivi elettronegativi, uno dei quali, presente in notevole quantità, ha mostrato la stessa velocità di migrazione dell'S-carbossimetilglutazione, e due componenti elettropositivi.

Infine con un idoneo metodo di selezione si è cercato di ottenere un aumento di tolleranza verso l'acido cloroacetico in due ceppi di *M. domestica*, uno sensibile e l'altro già resistente ai prodotti clorurati; dopo rispettivamente 51 e 55 generazioni non si è notato un aumento della tolleranza all'acido cloroacetico da parte dei due ceppi.

Résumé. — On résume les résultats d'une série de recherches sur le mode d'action des acides iodo-, bromo- et chloroacétique dans les insectes et sur la valeur insecticide de certains dérivés de ces acides.

On a démontré :

1) que les acides iodo-, bromo- et chloroacétique ont une considérable action insecticide de contact sur les mouches domestiques sensibles autant que sur les mouches domestiques résistantes aux produits chlorurés; que cette action insecticide est propre aussi de certains esters de l'acide chloroacétique dont une série a été préparée par nous mêmes,

2) que les substances examinées bloquent et in vitro et in vivo la triosophosphatedéhydrogénase du tissu musculaire de *P. americana* et de *M. domestica* et en provoquent la paralysie en contracture analoguement à ce que l'on voit pour les vertèbrés, et qu'il y a un parallélisme entre pourcentage d'inhibition de l'enzyme et pourcentage de mortalité;

3) que les substances étudiées lorsqu'elles pénètrent in vivo à travers l'exosquelette déterminent la paralysie des muscles les plus voisins au point de pénétration et provoquent, quand on les inocule entre les tergites, le bloc des pulsations entre 30 minutes environ à la concentration de 1:1000, entre 90 minutes à la concentration de 1:5000, et entre 120 minutes à la concentration de 1:10000;

4) que ces substances provoquent la paralysie en contracture de l'intestin antérieur isolé de *P. americana* et de *C. lateralimarginalis* stimulé avec KCl;

5) que l'acide iodoacétique à la dose de 900 µg/g cause une inhibition du 19% environ du CoA du muscle de *P. americana*, tandis qu'une dose égale bloque complètement l'activité de la triosophosphatedéhydrogénase du même muscle.

On a encore étudié la destinée de l'acide bromoacétique-2-C¹⁴ inoculé dans *P. americana*. Les séparations chromatographiques du sang de

blatte prélevé après l'inoculation ont mis en évidence que l'acide bromoacétique disparaît entre 45 minutes et que d'autres composés radioactifs paraissent et augmentent avec le temps. Les autoradiographies de certaines séparations électrophorétiques sur papier des extraits déprotéinisés de blattes traitées ont révélé 5 composants électronégatifs, un desquels présent en quantité considérable a montré la même vitesse de migration que l' S-carboxyméthyl glutathione, et deux composants électronégatifs. Avec une méthode de sélection convenable, enfin, nous avons essayé d'obtenir une augmentation de tolérance à l'acide chloroacétique dans deux souches de *M. domestica*, l'une qui était sensible et l'autre qui était résistante aux produits « chlorurés »; après respectivement 51 et 55 générations nous n'avons pas observé une augmentation appréciable de tolérance à l'acide chloroacétique dans les deux souches.

Summary. — The authors report the results achieved from research on the mode of action of iodo-, bromo- and chloroacetic acid on insects, and on the insecticidal properties of some of their derivatives. The following points have been demonstrated:

1) Iodo-, bromo- and chloroacetic acid, and their esters, possess a considerable insecticidal action by contact which proved to be equal for normal as well as for resistant house flies.

2) The above mentioned substances block the triosephosphate dehydrogenase of *Periplaneta americana* and of *Musca domestica* muscular tissue, *in vivo* and *in vitro*, causing a contracture paralysis, analogous to the one observed in vertebrates. A parallelism is present between enzyme inhibition percent and mortality percent.

3) The substances under study, penetrating through *P. americana* exoskeleton, bring about paralysis of the muscles nearest to the penetration point and, if injected between the tergites, cause the dorsal vessel to stop pulsating and to undergo contracture, similarly to skeletal muscles; iodoacetic acid determines the cessation of contractions of isolated heart preparation within 30 minutes at a concentration of 1:1.000, within 90 minutes at a concentration of 1:5.000, and within 120 minutes at a concentration of 1:10.000.

4) Iodoacetic acid brings about *in vitro* a contracture paralysis of the foregut muscles of *P. americana* and of *Cybister lateralmarginalis* if the isolated foregut is being stimulated with KCl.

5) Iodoacetic acid at a dose of 900 µg/g brings about 19% inhibition of Coenzyme A of *P. americana*'s muscle, while an equal dose totally inhibits the activity of muscle triosephosphate dehydrogenase.

The authors, moreover, have studied the fate of 2-C¹⁴ bromoacetic acid injected in *P. americana*. Chromatographic separations of roach blood withdrawn after inoculation have shown that bromoacetic acid disappears within 45 minutes and that contemporarily other radioactive compounds appear increasing with time. Autoradiographies of electrophoresis separations of deproteinized roach extracts have shown two radioactive electropositive components and five electronegative components, one of which of considerable quantity has shown the same migration rate of S-carboxymethyl glutathion.

The authors have also prepared a series of chloroacetic acid esters; their insecticidal action and residual properties are reported.

Finally, the authors have tried to obtain, through a proper method of selection, an increase of tolerance towards chloroacetic acid in two strains of *M. domestica* one of which susceptible and the other resistant to chlorinated hydrocarbons: in 51 and 55 generations respectively the authors did not succeed in obtaining an increase of tolerance towards chloroacetic acid in the two strains in experiment.

Zusammenfassung. — Es wird über die Ergebnisse einer Reihe von Untersuchungen über den Mechanismus der toxischen Wirkung der Jod-Brom- und Chloressigsäure gegenüber den Insekten sowie über die die insektiziden Eigenschaften einiger Derivaten dieser Verbindungen berichtet.

Es wurde bewiesen:

a) dass die Jod- Brom- und Chloressigsäure eine bedeutende insektizide Kontaktwirkung so auf chlorderivatempfindliche wie auf die resistenten Stämme der Stubenfliege hat; Dass diese insektizide Eigenschaft auch für einige Ester der Chloressigsäure, von denen eine Serie dargestellt wurde, charakteristisch ist;

b) dass diese Verbindungen « in vitro » die Triosephosphatdehydrogenase des Muskelgewebes der *P. americana* und der *M. domestica* blockieren, « in vivo », ähnlich wie in den Vertebrata, eine Kontrakturparalyse auslösen und dass ein Parallelismus zwischen der Inhibition des Enzyms und dem Tötungsprozentsatz besteht;

c) dass die untersuchten Substanzen durch das Hautskelett eindringen und die Lähmung der dem Penetrationspunkt nächstgelegenen Muskelgruppen bewirken und, dass sie wenn sie zwischen die « urotergiti » inokuliert werden, den Stillstand der Pulsationen des Rückengefäßes, welches so wie die Skelettmuskeln in Kontraktur verfällt, verursachen; die Jodessigsäure verursacht den Stillstand von Präparaten des Rückengefäßes innerhalb ungefähr 30' in Verdünnung 1:1000,

innerhalb 90' in Verdünnung 1:5000 und innerhalb 120' in Verdünnung 1:10000;

d) dass diese Substanzen die Kontrakturparalyse des isolierten und mit Kaliumchlorid gereizten Vorderdarm von *P. americana* und *Cybister lateralimarginalis* verursachen;

e) dass die Jodessigsäure in einer Dose von 900 µg/g ungefähr 19% des Koenzyms A des Muskels von *P. americana* blockiert, während eine gleiche Dose fast die gesamte Triosephosphatdehydrogenase desselben Muskels blockiert.

Weiterhin wurden die Umwandlungen der mit C¹⁴ markierten, in *P. americana* inokulierten Bromessigsäure studiert. Die chromatographische Untersuchung des Blutes welches der Schabe nach der Inokulierung entnommen wurde hat erwiesen, dass die Bromessigsäure innerhalb 45' verschwindet während andere radioaktive Verbindungen, deren Menge mit der Zeit zunimmt, auftreten. Die Autographien einiger elektrophoretischer Trennungen deproteinisierter Extrakte der behandelten Schaben haben die Anwesenheit von 5 elektronegativen und 2 elektropositiven Komponenten erwiesen; einer der elektronegativen Komponenten der in beträchtlicher Menge auftrat wies dieselbe Migrationsgeschwindigkeit des S-Karboxymethylglutathions auf.

Es wurde schliesslich versucht durch eine entsprechende Selektion in zwei Stämmen von *M. domestica*, einer chlorderivatenempfindlichen, einer bereits resistenten, eine grössere Tolleranz gegenüber der Chloraussigsäure zu erhalten; nach 51 bzw. 53 Generationen konnte in keinem der beiden Stämme eine Zunahme der Tolleranz festgestellt werden.

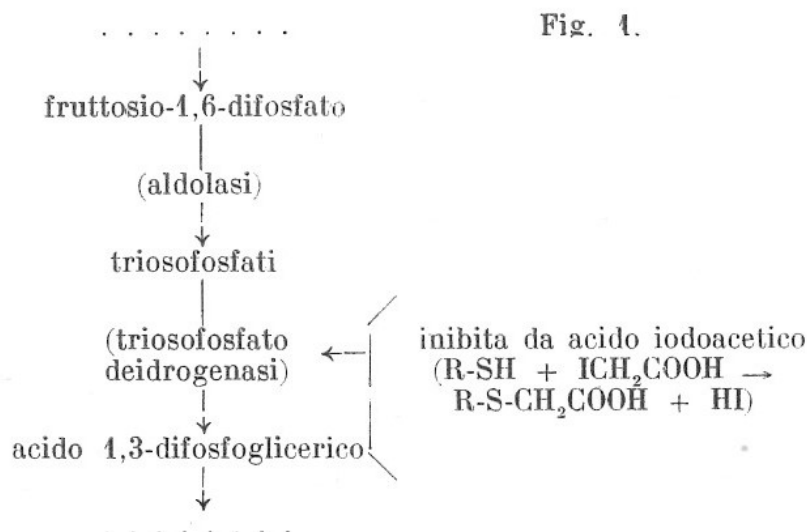
In Italia il problema della resistenza agli insetticidi, sorto già nel 1947, aveva raggiunto nel 1954 ⁽¹⁾ grande importanza pratica sia nel campo dell'igiene che nel campo dell'agricoltura. Profondo interesse suscitava in special modo la mosca domestica nel campo della medicina preventiva ⁽²⁾. Difatti si era allora nell'assoluta impossibilità di mantenere sotto controllo questa specie con i mezzi chimici allora conosciuti: in alcune zone, come in provincia di Latina, si era giunti ad un livello molto alto di resistenza verso tutti gli insetticidi clorurati.

Era necessario indirizzare allora le ricerche verso nuovi gruppi di sostanze che non solo fossero attive verso i ceppi già resistenti ai prodotti clorurati, ma che per di più non inducessero in breve una nuova resistenza.

Rivolgemmo allora la nostra attenzione verso quelle sostanze, ini-

bitrici di processi biochimici vitali, che non fossero state ancora studiate a fondo nel campo entomologico e che avessero potuto rappresentare un punto di partenza per nuove ricerche nel campo degli insetticidi.

Fra le varie sostanze, l'acido iodoacetico colpì la nostra attenzione per le seguenti sue caratteristiche: a) secondo quanto già noto, l'azione tossica dell'acido iodoacetico per i vertebrati, dovuta principalmente alla inibizione della triosofosfatodeidrogenasi (TPD) (fig. 1), è di natura irreversibile; b) le caratteristiche di tossicità dell'acido iodoacetico sono pro-



prie anche degli acidi bromo- e cloroacetico; c) esiste la possibilità di preparare un numero altissimo di iodo-, bromo-, e cloroacetati che conservano le stesse caratteristiche di tossicità; d) la tossicità di queste sostanze per i mammiferi è dello stesso ordine di grandezza di quella degli insetticidi clorurati (v. Tabella I).

TABELLA I

Tossicità per via orale degli acidi iodo-, bromo- e cloroacetico (sali di Na) e di alcuni noti insetticidi sui vertebrati.

Sostanze	LD ₅₀ in mg Kg	Animali in esperimento
Acido cloroacetico	255 ⁽¹⁾ , 165 ⁽¹⁾	topo
» »	76 ⁽¹⁾	ratto
» »	80 ⁽¹⁾	cavia
Acido bromoacetico	100 ⁽²⁾	topo
Acido iodoacetico	83 ⁽²⁾	»
DDT	250 ⁽³⁾	ratto
Lindane	125 ⁽¹⁾	»
Chlordane	500 ⁽³⁾	»
Aldrin	50 ⁽³⁾	»
Dieldrin	65 ⁽⁴⁾	»
Toxaphene	150 ⁽⁴⁾	»
Parathion	10 ⁽³⁾	»

⁽³⁾ WOODARD J.; ⁽⁴⁾ MORRISON J.; ⁽⁵⁾ TILEMANS E. e DORMAL S.

Dalla ricerca bibliografica risultò che alcuni derivati degli acidi cloro- e bromoacetico erano stati in passato indicati come insetticidi ⁽⁶⁾ (senza che però la loro tossicità fosse mai stata messa in relazione con il loro comune meccanismo di azione tossica).

Dai nostri primi esperimenti risultò che: a) gli acidi iodo-, bromo- e cloroacetico ed alcuni loro esteri avevano rilevante azione insetticida di contatto; b) l'azione insetticida era di egual misura sia per i ceppi di *M. domestica* sensibili che per quelli resistenti ⁽⁷⁾; c) la tossicità verso *M. domestica* era dello stesso ordine di grandezza di quella del DDT (v. Tabella II).

TABELLA II

Azione insetticida di alcuni noti insetticidi organici e dell'acido cloroacetico, a una concentrazione di 1g/m² su carta, sulle femmine di un ceppo sensibile di M. domestica.

Sostanze	N. individui	Mortalità
Lindane	130	100
Piretro (1)	100	20
Chlordane	100	34
DDT	110	72
Acido cloroacetico	100	60

(1) Estratto al 25%. Alla fine del periodo di contatto, tutti gli individui erano abbattuti; durante le 24 h seguenti l'80% si erano ripresi.

Questi primi risultati ci portarono a formulare un programma di ricerche più esteso, anche in vista del fatto che in quel periodo la Fondazione Rockefeller aveva concordato con l'Istituto Superiore di Sanità un piano triennale di studi sul problema della resistenza della mosca domestica. Nell'ambito di questo piano continuarono le nostre ricerche che furono orientate verso tre direzioni: a) studio del meccanismo di azione degli acidi iodo-, bromo-, e cloroacetico e derivati ^(*) sugli insetti; b) selezione di ceppi di mosche domestiche verso l'acido cloroacetico; c) preparazione di esteri dell'acido cloroacetico e valutazione del loro potere insetticida.

(*) D'ora in poi tali acidi e i loro esteri verranno indicati come « alchilanti alo-genati ».

MECCANISMO D'AZIONE.

Per studiare l'azione degli alchilanti alogenati sulla triosofosfato-deidrogenasi (TPD), ci siamo serviti di un metodo colorimetrico per il dosaggio della attività TPDasica negli estratti totali, usando il 2,6-diclorofenolindofenolo come accettore di idrogeno ed il fruttosio-1,6-difosfato come substrato ⁽⁸⁾ (avendo accertata la presenza di aldolasi, che, come noto, non viene inibita dall'acido iodoacetico).

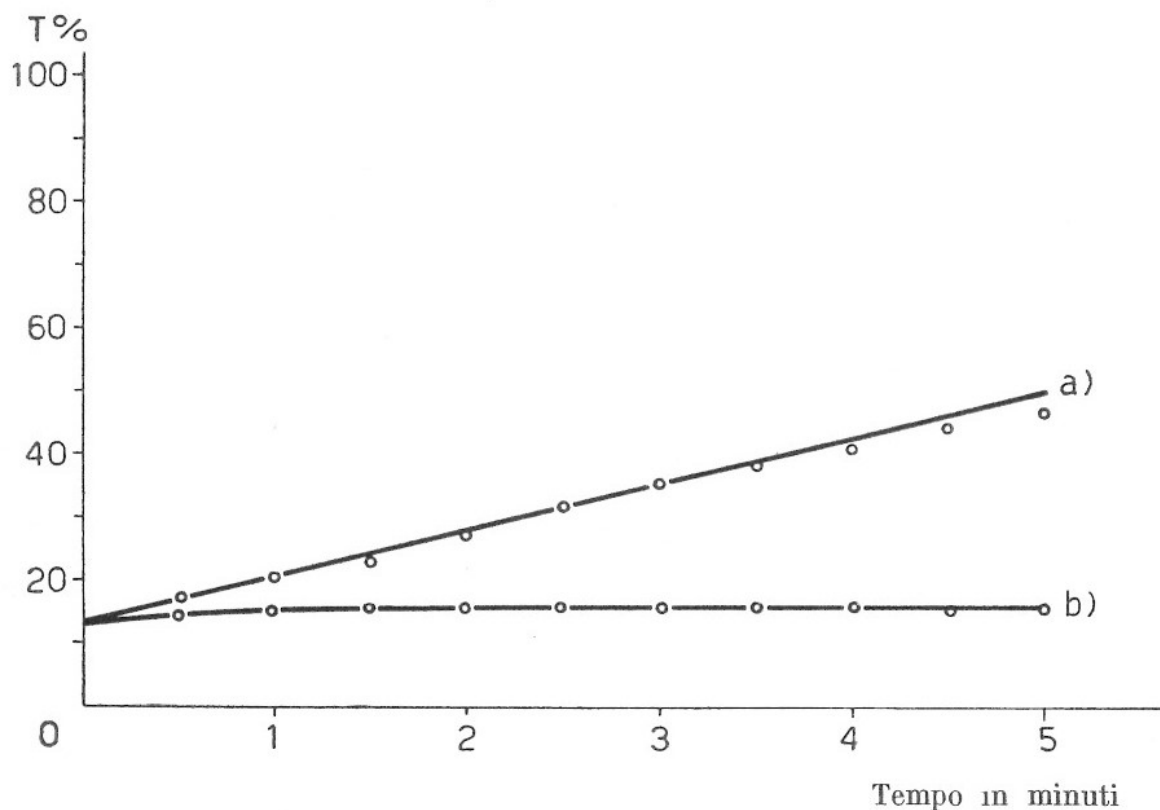


Fig. 2. - Azione in vivo dell'acido iodoacetico sulla TPD nella *P. americana*: a) andamento della reazione enzimatica di estratti di coxe, b) idem dopo inoculazione di acido iodoacetico, 1 mg/g di blatta.

La figura 2 illustra l'andamento della reazione enzimatica con (a) estratti di coxe di *P. americana* normali (si nota una rapida decolorazione del 2,6-diclorofenolindofenolo) e con (b) estratti di coxe di *P. americana* dopo inoculazione di 1 mg/g di acido iodoacetico (non si nota alcuna decolorazione).

Il rapporto esistente tra mortalità e inibizione dell'attività TPDasica è stato messo in evidenza su gruppi di mosche domestiche trattate per contatto con dosi crescenti di acido cloroacetico. I risultati sono illustrati nella figura 3 ove (a) rappresenta la mortalità percentuale e (b) l'inibizione percentuale della TPD a varie concentrazioni di acido cloroacetico

per contatto. La curva di inibizione enzimatica è parallela ma più bassa di quella di mortalità.

Accertata l'inibizione della TPD da parte degli alchilanti alogenati (*), si è voluto studiare l'effetto che tali sostanze potevano avere sulla succinodeidrogenasi e sul Coenzima A (già identificato da WOLF e WILLIAMS nel 1953 ⁽¹⁰⁾ in larve ed adulti di *P. cecropia*) ambedue legati al metabolismo ossidativo dei carboidrati e la cui attività dipende da gruppi tiolici.

Con il metodo di SELIGMAN e RUTENBURG ⁽¹¹⁾, (formazione di « formazan » per riduzione di derivati di tetrazolio incolori, in presenza di

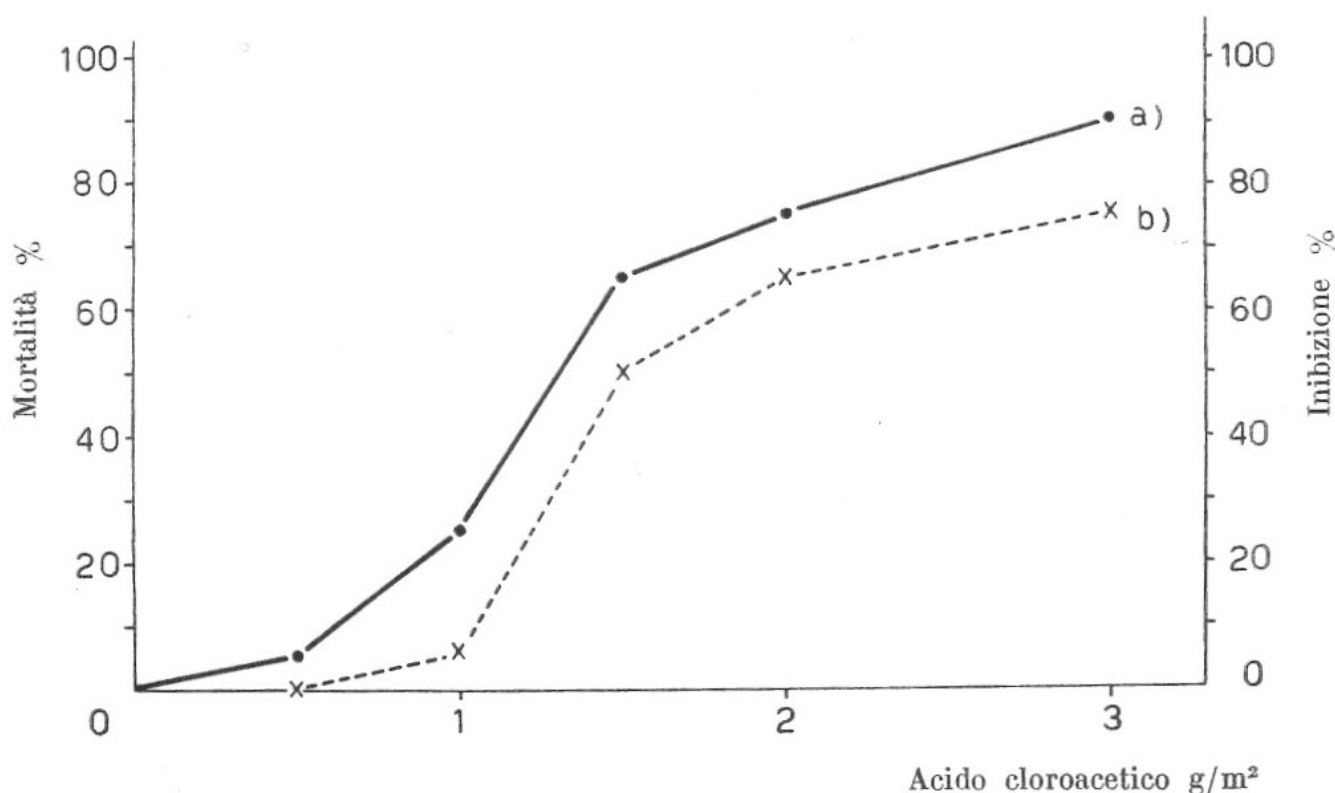


Fig. 3. - Rapporto fra percentuale di mortalità e percentuale di inibizione TPDasica in *M. domestica* (R-Sardegna) a contatto con varie concentrazioni di acido cloroacetico: a) mortalità percentuale, b) inibizione TPDasica percentuale.

succinato) si è potuto stabilire ⁽¹²⁾ che l'acido iodoacetico, inoculato a dosi di 1 mg/g in *P. americana*, non determina alcuna inibizione della attività succinodeidrogenasica nei muscoli delle coxe, mentre la stessa dose, come su riportato, determina la completa inibizione della TPD.

Per quanto riguarda il CoA, per i cui dosaggi si è usato il metodo di « acetilazione della solfanilammide » come è riportato da NOVELLI ⁽¹³⁾, si è stabilito che a dosi di 900 µg/g l'acido iodoacetico inibisce solo il 19%

(*) CHEFURKA ⁽⁹⁾ nel 1954 trovò che l'acido iodoacetico, in vitro, non inibiva la TPD di *M. domestica* alle concentrazioni che inibiscono la TPD di vertebrato.

circa del contenuto di coenzima A dei muscoli delle coxe di *P. americana*. (V. Tab. III). Quindi, molto probabilmente, nella intossicazione da alchilanti alogenati, l'inibizione del CoA ha minore importanza che non l'inibizione della TPD (¹⁴).

TABELLA III

Contenuto in CoA delle coxe di P. americana prima e dopo inoculazione di acido iodoacetico. Unità/g di materiale fresco.

Individui normali	Individui inoculati	
	180 µg di ICH ₂ COOH/g	900 µg di IOH ₂ COOH/g
11,4	9,5	9,2
11,5	9,4	—

Nel corso delle ricerche sulla succinodeidrogenasi e sul CoA, abbiamo notato alcuni fatti che ci sembrano degni di menzione. I muscoli delle coxe di *P. americana* presentano tra di loro notevole diversità di pigmentazione giallobruna (citocromo). E' stato messo in evidenza che i muscoli più intensamente pigmentati mostrano una massima attività succinodeidrogenasica, mentre i muscoli non pigmentati non ne mostrano alcuna. (V. figura 4).

Inoltre è stato osservato che tra i muscoli molto pigmentati e quelli non pigmentati vi è una notevole differenza nel contenuto di CoA, come risulta dalla tabella IV (¹⁵).

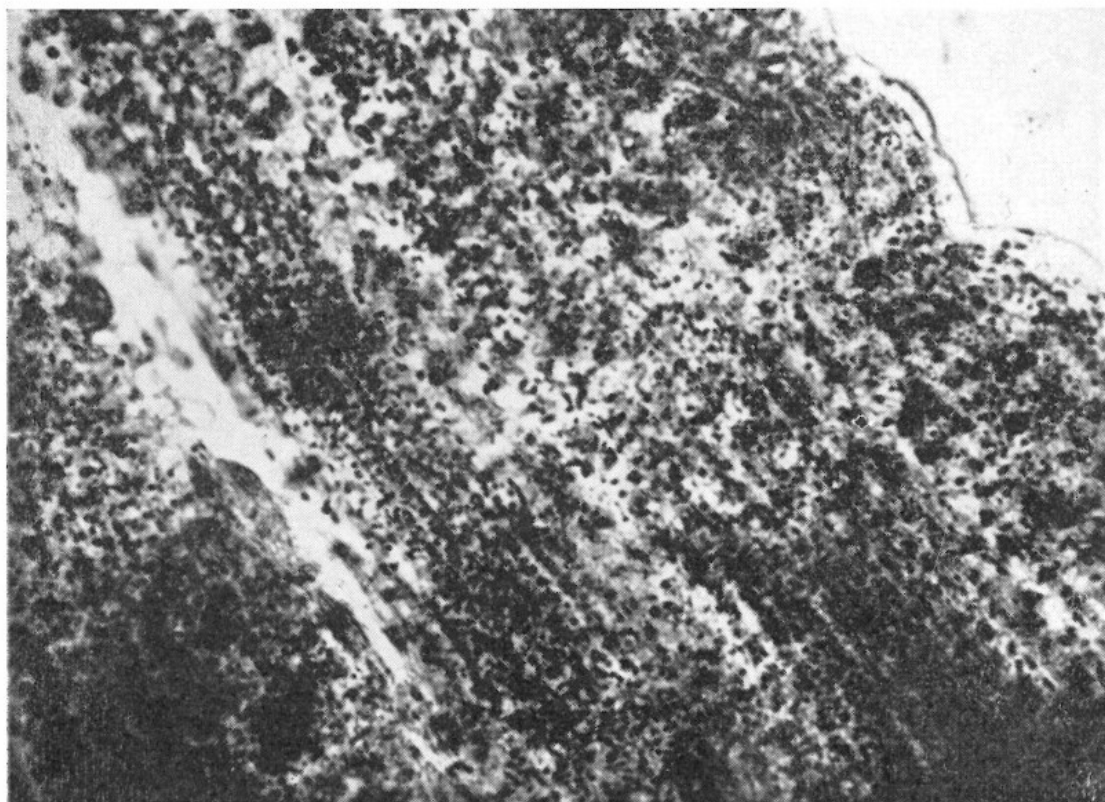
TABELLA IV

Contenuto in CoA del materiale fresco (P. americana) in Unità/g.

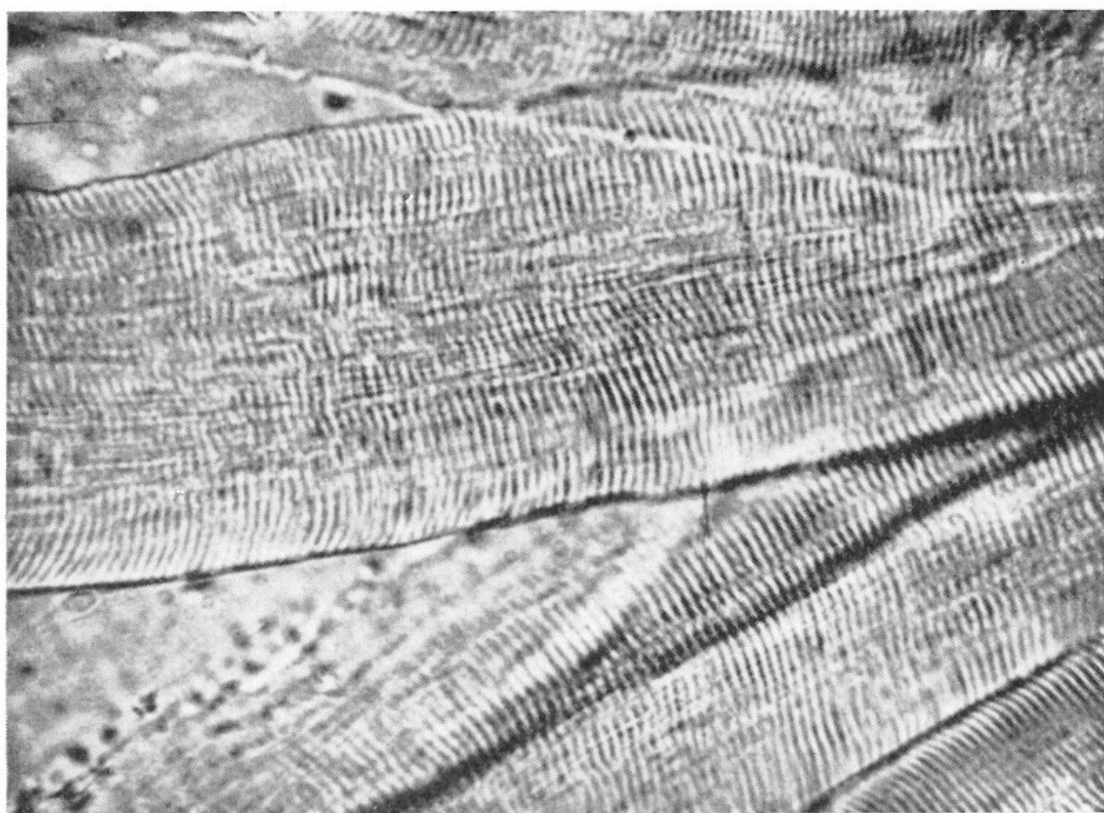
Coxe in toto	Muscoli bianchi della coxa	Muscoli rossi della coxa
11,4	6,1	28,0

Riassumendo, nei muscoli più pigmentati esiste un maggior contenuto di succinodeidrogenasi, di CoA, e di citocromo. Ne deriva, quindi, che in tali muscoli esiste un metabolismo ossidativo molto attivo legato alla loro funzione specifica.

Per meglio comprendere il meccanismo di azione degli alchilanti alogenati, ci è sembrato opportuno studiare il destino di tali sostanze inoculate in *P. americana* (¹⁶).



A



B

Fig. 4. - A: Branca toracica dell'estensore ventrale del troncantere con granuli di formazan formati durante 50' di contatto con il liquido di Seligman e Rutenburg a 37°C. $\times 384$. B: Estensore dorsale del troncantere, trattato come sopra, nel quale non si nota formazione alcuna di granuli di formazan. $\times 384$.

Ci siamo serviti di acido bromoacetico-2- C^{14} , determinando la distribuzione della radioattività nei vari organi e tessuti dopo l'intossicazione dell'insetto. Nella figura 5 è riportato l'andamento nel tempo della radioattività del sangue di individui maschi di *P. americana* inoculati con

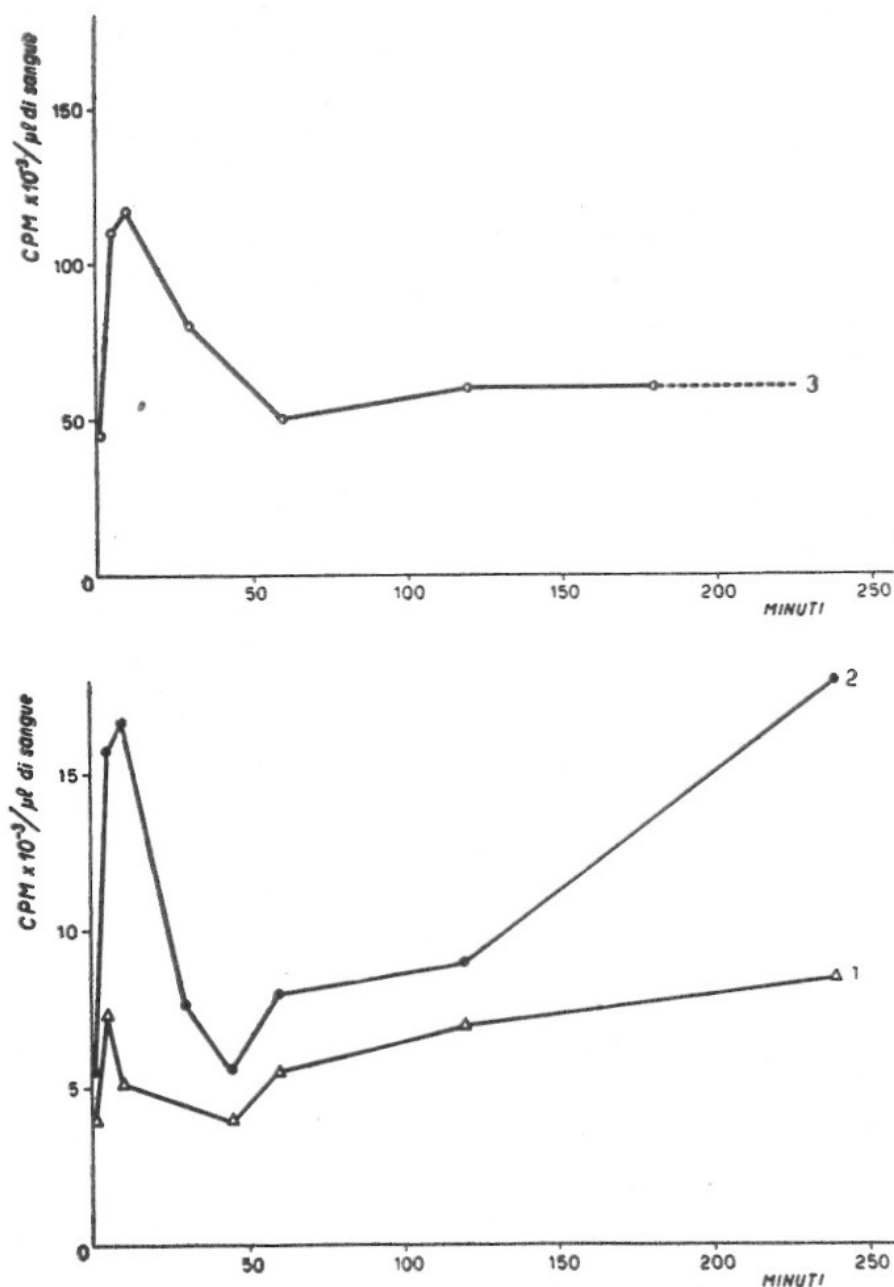


Fig. 5. - Andamento nel tempo della radioattività del sangue di individui di *P. americana* inoculati con μg 90 (tracciato 1), μg 180 (2) e μg 360 (3) di acido bromoacetico-2- C^{14} .

90, 180 e 360 $\mu\text{g/g}$ di acido bromoacetico marcato con C^{14} . Si nota che la radioattività è in rapporto diretto con la dose inoculata e che raggiunge il massimo di intensità fra 5-10' dal momento della inoculazione per poi cadere rapidamente sino a raggiungere un minimo dopo 30-60'. Nel corso delle successive tre ore si ha un nuovo aumento della radioattività.

TABELLA V

Distribuzione della radioattività nei vari organi e tessuti di maschi di *P. americana* inoculati con acido bromoacetico-2-C¹⁴. I valori della radioattività sono espressi in cpm/mg di materiale secco.

Organi e tessuti	Dosi inoculate individuo		
	90 µg	180 µg	360 µg
Vaso dorsale	600	1200	3000
Corpi grassi	440	1400	3000
Catena ganglionare ventrale	400	1000	2000
Esoscheletro	220	800	1200
Ingluvie	190	500	1 00
Muscoli metatoracici	150	300	700
Muscoli mesotoracici	150	300	600
M. della coxa (molto pigm.)	90	200	600
M. della coxa (poco pigm.)	70	200	540
M. della coxa (non pigm.)	60	150	350
Ghiandole accessorie	60	120	250
Colon	500	600	800
Tubi Malpighiani	1500	1500	2000
Feci del retto	—	—	1070

Nella tabella V sono riportati i valori della radioattività in vari organi e tessuti prelevati da *P. americana* 4 ore dopo l'inoculazione. Si nota, nella maggior parte dei casi, un rapporto diretto fra entità della dose inoculata e i valori della radioattività riscontrata. Fanno eccezione il colon e i tubi Malpighiani, per i quali i valori della radioattività rimangono pressochè costanti con l'aumentare della dose, quasi che in essi con la dose più bassa, già abbiano reagito tutti i gruppi tiolici presenti nei loro tessuti.

E' da notare anche che i muscoli scheletrici presentano una bassa radioattività e che i valori di questa sono in rapporto diretto con il loro grado di pigmentazione.

Si sono anche separati con elettroforesi su carta i prodotti di reazione tra sostanze contenenti gruppi tiolici ed acido bromoacetico, presenti negli estratti totali di blatta deproteinizzati. Come si nota nella figura 6, le autoradiografie delle strisce hanno messo in evidenza 7 componenti, due dei quali elettropositivi.

L'identificazione di tali composti è attualmente in corso. Il componente presente in maggior quantità (n. 1 striscia C) presenta la stessa velocità di migrazione dell'S-carbossimetilglutazione.

Nel corso dei nostri esperimenti è stato messo in evidenza che gli alchilanti alogenati provocano negli insetti una paralisi in contrattura dei muscoli scheletrici, analogamente a quanto si verifica nei vertebrati.

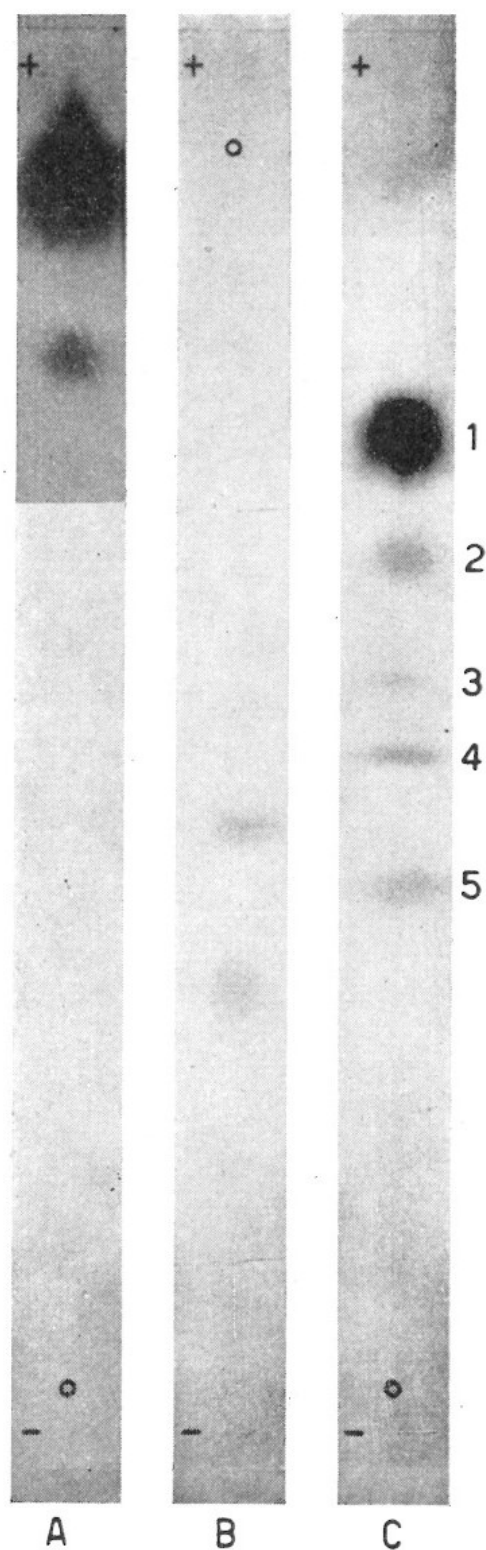


Fig. 6. - Autoradiografie delle elettroforesi su carta di estratti di individui di *P. americana* inoculati con μg 180 di acido bromoacetico-2- C^{14} . A: soluzione di acido bromoacetico-2- C^{14} . B: estratto di *P. americana*, componenti elettropositivi. C: estratto di *P. americana*, componenti elettronegativi.

Il vaso dorsale risponde all'avvelenamento da acido iodoacetico nello stesso modo dei muscoli scheletrici.

Quando gli alchilanti alogenati vengono inoculati attraverso i tergiti, essi provocano dapprima l'arresto del vaso dorsale e quindi la para-

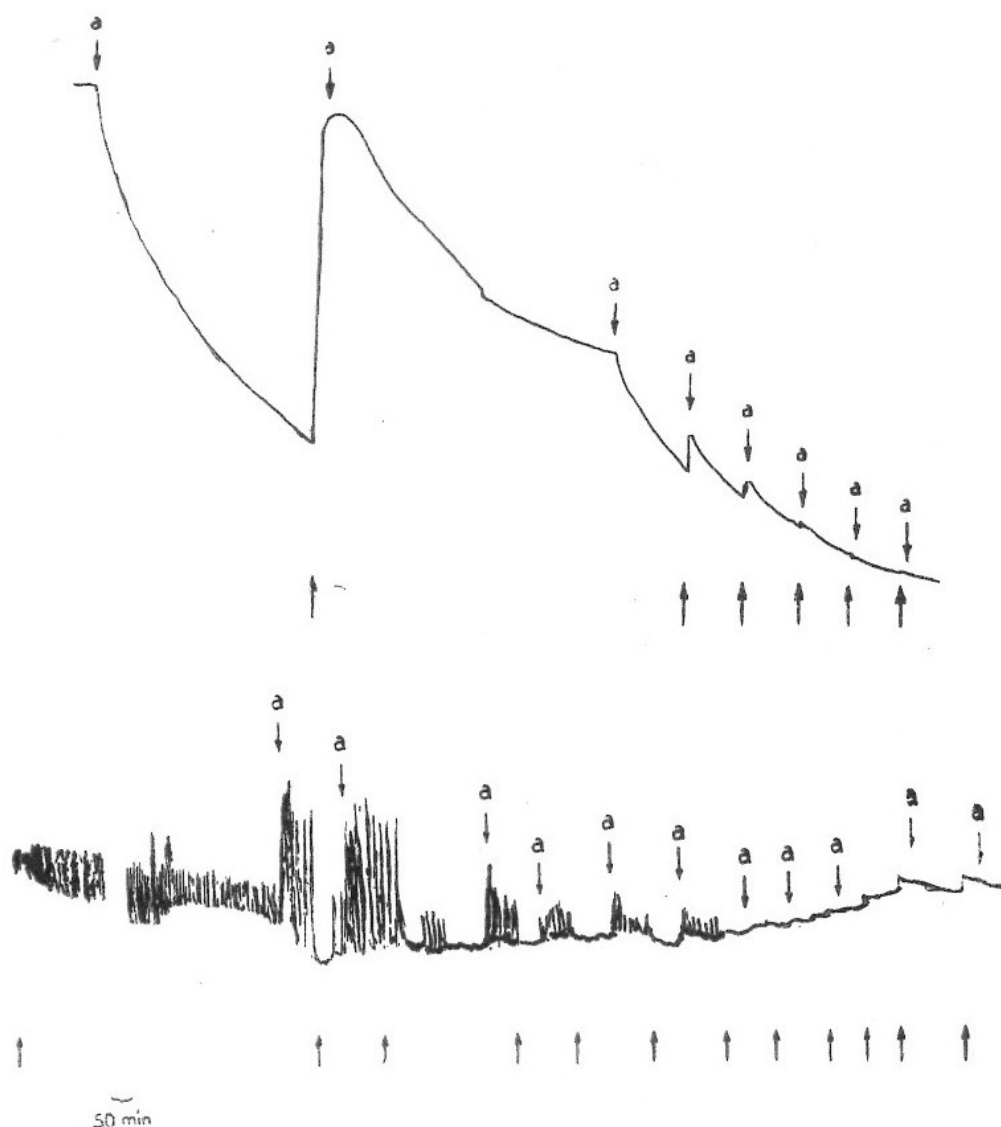


Fig. 7. - a) Effetto dell'acido iodoacetico all'1:10.000 sull'intestino anteriore isolato di *P. americana* in seguito a stimolazioni con BaCl_2 . BaCl_2 al 2:1.000 ($\downarrow$ a); lavaggi con soluzione fisiologica + acido iodoacetico alla concentrazione dell'1:1.000 ($\uparrow$). b) Effetto dell'acido iodoacetico all'1:10.000 sull'intestino anteriore isolato di *C. lateralis*, in seguito a stimolazioni con BaCl_2 . BaCl_2 al 2:1.000 ($\downarrow$ a); lavaggi con soluzione fisiologica + acido iodoacetico alla concentrazione dell'1:10.000 ($\uparrow$).

lisi in contrattura dei muscoli scheletrici, mentre quando penetrano per contatto dai tarsi provocano dapprima la paralisi in contrattura dei muscoli scheletrici e poi l'arresto della attività cardiaca. Perciò il blocco della attività cardiaca dipende dal punto di penetrazione del tossico rispetto al vaso dorsale.

Anche sulla muscolatura intestinale gli alchilanti alogenati provocano una paralisi in contrattura. I grafici della figura 7 mostrano l'effetto dell'acido iodoacetico sull'intestino anteriore isolato di blatta (*P. americana*) e di ditisco (*Cybister lateralimarginalis*). Nella blatta la contrattura segue un andamento opposto a quello prevedibile e cioè essa determina un abbassamento del tono muscolare anzichè un innalzamento; tale effetto « paradosso » sembra dovuto principalmente al prevalere della contrazione delle fibre muscolari circolari su quella delle fibre muscolari longitudinali (17).

SELEZIONE DI « M. DOMESTICA » CON ACIDO CLOROACETICO.

Al fine di determinare se fosse possibile ottenere un aumento della tolleranza verso l'acido cloroacetico in ceppi di *M. domestica*, abbiamo sottoposto una serie di generazioni a trattamenti con questa sostanza. Sono stati usati: un ceppo sensibile (S-Roma) ed un ceppo multi resistente (R-Sardegna) che risultava altamente resistente al chlordane e notevolmente resistente al DDT ed analoghi ed al lindano. Circa 300 maschi e 300 femmine di ogni generazione, separatamente e prima dell'accoppiamento, sono stati esposti all'azione per contatto dell'acido cloroacetico in modo da avere una sopravvivenza del 40% circa sia delle femmine che dei maschi. Tutti i sopravvissuti furono usati per ottenere la generazione successiva. I risultati sono riportati nella tabella VI. Da essa ri-

TABELLA VI

Sensibilità all'acido cloroacetico di femmine di M. domestica provenienti da ceppi selezionati verso questa sostanza, a livello di generazioni diverse.

Ceppo di <i>M. domestica</i>	Generazione	LD ₅₀ per l'acido cloroacetico, g m ⁻¹
S-Roma	prima della selezione	1,25
»	F ₁	1,25
»	F ₁₀	1,50
»	F ₂₇	1,50
»	F ₅₄	2,20
R-Sardegna	prima della selezione	1,40
»	F ₁	1,40
»	F ₁₂	1,60
»	F ₂₈	1,65
»	F ₃₀	2,40
»	F ₅₄	2,25

sulta che dopo 55 generazioni non si ha un sensibile aumento della tolleranza all'acido cloroacetico nei due ceppi.

Questi risultati fanno supporre che in *M. domestica* i caratteri fisiologici responsabili della suscettibilità verso gli alchilanti alogenati presentino una notevole omogeneità genetica; questo può trovare conferma

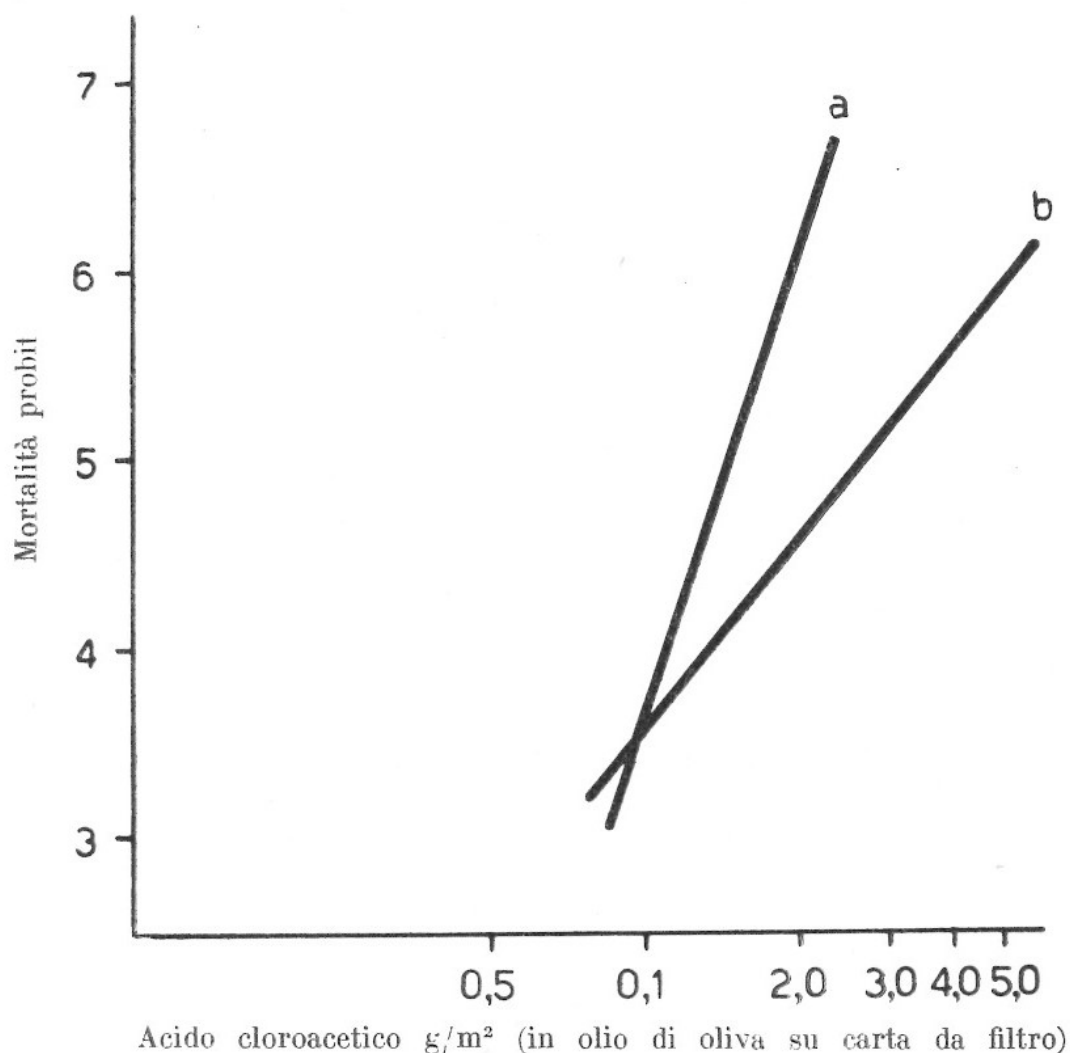


Fig. 8. - Rette di regressione probit/log-dose per l'acido cloroacetico (a) e per il DDT (b) nel ceppo sensibile (S—Roma) di *M. domestica*.

indiretta nella grande inclinazione della curva $ld/probit$ che si ottiene con l'acido cloroacetico, e il cui valore angolare ($= 8$) è notevolmente più alto di quello ricavato ($= 3,5$) dalla curva $ld/probit$ ottenuta con il DDT per lo stesso ceppo di *M. domestica* nelle medesime condizioni sperimentali (v. figura 8).

VALUTAZIONE DEL POTERE INSETTICIDA DI ALCUNI ESTERI DELL'ACIDO CLOROACETICO.

Abbiamo preparato una serie di esteri dell'acido cloroacetico aventi bassa tensione di vapore e privi di funzioni idrofile (¹⁸). Di tali esteri,

irrorati su muro alla dose di 5 g/m², è stato saggiato il potere insetticida. Dei 22 prodotti provati alcuni hanno mostrato una notevole azione insetticida, ma il solo cloroacetato di 2,4,6-triclorofenile ha mostrato una azione residua della durata di solo pochi giorni; la rapida perdita della attività residua è dovuta alla sua relativamente alta volatilità. D'altronde i prodotti meno volatili hanno mostrato una azione insetticida irrilevante.

Concludendo, da quanto messo in evidenza dalle nostre ricerche, gli alchilanti alogenati presentano indubbiamente caratteristiche degne di nota: la loro azione di contatto, la loro tossicità per i ceppi resistenti, la loro bassa tendenza ad indurre « resistenza ». Tuttavia un buon insetticida per l'impiego pratico deve avere anche una lunga azione residua. Nessuno dei prodotti da noi preparati può considerarsi a questo riguardo un insetticida adatto per l'impiego pratico. Considerando però le pressochè illimitate possibilità di sintesi nel campo degli alchilanti alogenati, è auspicabile che la ricerca continui in questo campo nello intento di ottenere prodotti che abbiano tutte le caratteristiche di buoni insetticidi.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Parassitologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) MOSNA E. - Riv. Parass., 12: 27 (1951).
- (²) CORBO S. - Riv. Parass., 12: 37 (1951).
- (³) WOODARD J. - J. Indust. Hyg. Tox., 23: 78 (1944).
- (⁴) MORRISON G. - J. Pharm., 86: 336 (1946).
- (⁵) TILEMANS E. e DORMAL S. - Parasitica (Gembloux), 8: 64 (1952).
- (⁶) FREAR D. E. H. - A Catalogue of Insecticides and Fungicides. Waltham, Mass., U.S.A. (1947).
- (⁷) BETTINI S. e BOCCACCI M. - Riv. Parass., 13: 165 (1952).
- (⁸) BETTINI S. e BOCCACCI M. - Riv. Parass., 16: 13 (1955).
- (⁹) CHEFURKA W. - Enzymologia, 17: 73 (1954).
- (¹⁰) WOLFF B. e WILLIAMS C. M. - Anat. Records, 117: 542 (1953).
- (¹¹) SELIGMAN A. M. e RUTENBURG A. M. - Science, 113: 317 (1951).
- (¹²) BETTINI S. e BOCCACCI M. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 17: 188 (1954).
- (¹³) NOVELLI D. - Methods of Biochemical Analysis, Vol. II, pg. 201 (1955).
- (¹⁴) BETTINI S. e BOCCACCI M. - J. Eco. Entom., 49: 554 (1956).
- (¹⁵) BOCCACCI M. e BETTINI S. - Experientia, 12: 432 (1956).
- (¹⁶) BETTINI S., BOCCACCI M. e ROSSI C. - Riv. Parass., 16: 103 (1955).
- (¹⁷) NATALIZI G., BETTINI S. e BOCCACCI M. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 20: 410 (1957).
- (¹⁸) BOCCACCI M. e BETTINI S. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 19: 1237 (1956).