

## 190. Ricerche sulla differenziazione al microscopio delle diverse qualità di amidi mediante colorazione metacromatica

di **Berto Bertoni.**

(25 V 49.)

*Parte generale.* Distinguere al microscopio qualità di amidi di piante diverse ma coi grani d'amido che si assomigliano, è un lavoro che richiede un esercizio lunghissimo, quale non sempre possono avere i chimici e i lavoratori dei laboratori. Si cerca di attenuare la difficoltà bagnando le farine o gli amidi, prima dell'osservazione, con liquidi differenti dall'acqua; l'alcole etilico, meglio ancora quello amilico e meglio ancora il reattivo di *Bellier* fatto di acqua, potassa caustica e glicerina, mettono bene in rilievo le striature concentriche del grano d'amido e rendono più visibile l'ilo. Il reattivo di *Bellier* ha tre gradazioni di forza: forte (5 g KOH + 15 cm<sup>3</sup> glicerina + 85 cm<sup>3</sup> acqua) dissolve in pochi minuti alla temperatura di 60° tutti gli amidi ad eccezione del solo amido di riso, permettendo così di riconoscerlo fra altri; medio (100 cm<sup>3</sup> del reattivo forte + 5 cm<sup>3</sup> glicerina) gonfia e dissolve a freddo in mezz'ora gli amidi delle papilionacee (piselli, fagioli, lenti) rendendo più comodo riconoscere gli altri amidi; debole (100 cm<sup>3</sup> del reattivo forte + 300 cm<sup>3</sup> acqua) fa apparire più chiari le striature e gl'ili<sup>1</sup>).

Il presente studio comincia col controllo dell'efficacia del metodo di *Eugen Unna* di Amburgo citato sulla detta *Z. Unters. Lebensm.*, agosto 1918. L'autore *Unna* cita diversi tentativi precedenti di metodi per distinguere gli amidi mediante una semplice colorazione: fra altri cita un metodo *Posner* e *Scheffer* (1917) per distinguere gli amidi nel pane K con la soluzione di *Giemsa* o con la miscela verde di metile + violetto di cresile; cita pure un metodo di *Schütz* e *Wein* con rosso neutro, azzurro di metilene e tionina; anche un metodo di *Blunk* col rosso di metacromo. — Non mi consta che uno di questi metodi sia comunque entrato nell'uso.

*Metodo secondo Eugen Unna.* Sia premesso che questo metodo riguarda soltanto le farine e i pani; una miscela di amidi senza il glutine che fa da adesivo al portaoggetti del microscopio, non sopporterebbe le colorazioni poichè si staccerebbe; anche i soliti adesivi per preparati microscopici, quali la gelatina fenicata, l'albumo d'uovo, rendono problematica la colorazione quando non finiscono addirittura per sciogliersi portando via anche gli amidi; i balsami sono inservibili; si aggiunga che il metodo *Unna* non sopporta riscaldamenti nemmeno per asciugare il preparato: difatti, già a 40 gradi gli amidi cominciano a gonfiarsi alterando la propria struttura interna. È allo studio un adesivo a freddo

<sup>1</sup>) Vedi per le pubblicazioni gli *Ann. Chim. anal. appl.* **12**, 224 (1907), gli *Ann. Falsific.* **4**, 569 (1911), così pure il riassunto sulla *Z. Unters. Lebensm.* **15**, 305 (1908) e **25**, 71 (1913).

per gli amidi non accompagnati da glutine. Seconda premessa che mi sembra utile ricordare, è che *Unna* partiva dal presupposto dell'esistenza di una sottilissima membrana amidacea, foderante ogni grano d'amido di qualsiasi specie; questa membrana, semipermeabile e meno permeabile dell'interno del grano d'amido permetterebbe un passaggio più o meno facile di un colorante piuttosto che di un altro, oppure obbligherebbe i diversi coloranti ad impiegare un tempo differente per un medesimo grado di colorazione; questa concezione non serve però per un controllo e uno studio del metodo di *Unna*, dato che non è indicato un fattore costante per la semipermeabilità della detta membrana.

Il metodo di *Unna* consiste nella combinazione di tre coloranti acidi (orceina, bleu acqua, eosina), di un colorante basico (safranina) e di un mordente acido, il bicromato di potassio; il glutine dovrebbe colorarsi in azzurro violetto, i resti di crusello le impurità e i lieviti in rosso di safranina, l'amido di patata pure in rosso di safranina, ma metacromatizzandolo in giallo scuro o in arancione, l'amido di segale con la stessa metacromasia ma in color bruno, l'amido di frumento in color rosso acceso; un perfezionamento importante fu la mordenzatura preventiva mediante una soluzione di acido fenico al 3% con lo scopo di modificare la permeabilità dell'epitelio dei grani d'amido.

*Manualità del metodo secondo Unna.* Da 5 a 10 g della farina da osservare si aggiungono ad un eccesso della soluzione di acido fenico al 3%; si agita per sciogliere i grucchi e si lascia in riposo per 24 ore. Un pochino della farina così trattata si striscia su un portaoggetti per microscopio e si lascia asciugare a freddo e in modo completo (tempo circa  $\frac{1}{2}$  ora).

Soluzioni coloranti: *N.° 1*, bleu acqua g 1,0, orceina g 1,0, acido acetico puro g 5,0, glicerina g 20, alcoole 86% vol. cm<sup>3</sup> 50, acqua quanto basta per portare la soluzione al volume di 100 cm<sup>3</sup>. *N.° 2*, g 1,0 di eosina solubile in alcoole in 100 g di alcoole al 60% vol. *N.° 3*, soluzione di safranina (meglio safranina Grüber) all'1% in acqua. *N.° 4*, soluzione di bicromato di potassio 0,5 % in acqua.

Colorazione. 1 cm<sup>3</sup> della soluzione 1 riceve l'aggiunta di sei gocce della soluzione 2 e con questa miscela si colora il preparato per almeno 10 minuti. Si lava il preparato con acqua e si colora per 20 a 30 minuti a freddo con la soluzione 3. Si lava con acqua e si mordenza per 20 a 30 minuti con la soluzione 4. Ancora si lava con acqua, poi con alcoole per allontanare l'acqua; al caso si schiarisce il preparato con xilolo, poi si mettono balsamo e coprioggetto e si osserva al microscopio.

*Risultati del metodo secondo Unna.* È straordinariamente difficile riescire a colorare con quattro sfumature nette e contrastanti una farina di mistura, con amidi di frumento, segale e patata oltre ai resti di crusello. Entrano in giuoco, per rendere irregolare la possibilità di buona riuscita, la densità del preparato, la durata delle colorazioni che va da 20 a 30 minuti, la temperatura del locale di lavoro, la durata delle lavature con acqua; l'ultima lavatura con alcoole e xilolo scolora e schiarisce in modo rapido e irregolare. Le 24 ore di attesa per la prima mordenzatura all'acido fenico sono già lunghe per un'osservazione al microscopio: pure ho visto che tre giorni non sono di troppo e anzi migliorano il preparato; dopo tre giorni comincia una resinificazione dell'acido fenico con colorazione bruna della miscela. La densità del preparato è poi importante a tal segno da rendere necessario indovinare il modo di ottenere sul portaoggetti uno striscio in cui si vedano i grani di amido possibilmente numerosi, ma senza mai toccarsi e tanto meno sovrapporsi, dato che già il semplice contatto fra due grani d'amido può trasfondere una parte della colorazione differenziale dall'uno nell'altro. Inoltre, la durata della colorazione è partico-

larmente sensibile per la safranina in confronto con gli altri coloranti: ho avuto risultati migliori mischiando i coloranti 1 e 2 in parti eguali per rafforzare l'effetto colorante dell'eosina in confronto alla safranina.

*Primi esperimenti per il perfezionamento del metodo secondo Unna.* Abbrevierò i miei risultati senza presentare tavole statistiche degli esperimenti.

La mordenzatura con l'acido fenico si lascia abbreviare al periodo di 24 ore prescritto da *Unna* se si scioglie l'acido fenico al 3% in alcole al 60%; conservare la soluzione in luogo fresco. La miscela fra i coloranti 1 e 2 si faccia in parti eguali: l'eosina è un colorante che il bicromato ossida facilmente ed un esperimento con iodeosina, più ossidabile dell'eosina stessa e che il bicromato ossida completamente in pochi minuti rendendola in colore, servì di controprova. La schiarita finale con alcole si tenga il più breve possibile e si tralasci quella col xilolo; si sorvegli invece, magari con qualche osservazione intermedia al microscopio, la colorazione progressiva con la safranina. Finora succede sempre che i piccoli grani d'amido restano incolori o quasi, quando i grani grossi sono colorati giusti; questo rende difficile o impossibile stabilire al microscopio una percentuale approssimativa per una miscela; inoltre, i grani piccoli restano in gran parte avvolti dalla massa scura e violetta del glutine, sfuggendo all'osservazione e al conteggio. Esperimenti con pane di mistura diedero risultati ben diversi da quelli pubblicati da *Unna*, poichè i grani d'amido gonfiati dal calore umido del forno perdono le proprietà colorabili differenziali; probabilmente *Unna*, che pubblicò nel 1918, fece le prove con pane di mistura infornato molto umido e in pagnotta grossa (così si faceva in Germania col pane K) e in questo caso il centro della pagnotta non raggiunge nel forno una temperatura superiore agli 80 gradi, ed anche per breve tempo se c'è da fare economia di combustibile.

Ho pensato di cominciare gli esperimenti con la scelta del primo mordente: i polifenoli, come il pirogallolo, la rescorcina e lo stesso acido tannico hanno già dato risultati migliori che con l'acido fenico. Indi si guarderà l'effetto della durata dell'azione del miglior mordente trovato.

Indi si faranno confronti fra le durate delle colorazioni nelle varie fasi. Ritengo opportuno rinunciare agli esperimenti con coloranti analoghi a quelli proposti da *Unna*, dato che la qualità dei coloranti è senza dubbio già stata provata. Potrà essere utile cercare un fissatore o secondo mordente meno ossidante del bicromato, come potrebbe esserlo un cromato leggermente alcalino, un cromito, un mordente a base di ferro o di tartaro emetico o di cloruro di stagno. Ci sarà poi da controllare l'efficacia del metodo così perfezionato su qualità di amido diverse da quella provate da *Unna*: importanti quelle oggi in uso in vari prodotti dietetici, come l'amido di mais, di maranta, di avena, di riso; non minore importanza potrebbero presentare i prodotti „predigeriti“ con amidi vaporizzati delle farine per bambini. Per una stima quantitativa di una miscela con diversi amidi, mi pare indispensabile il confronto con miscele già conosciute, meglio se con l'aiuto di un microscopio di paragone: tuttavia, in presenza di due amidi soli, penso che il conteggio con la camera di *Türk*, quella per dosare le scorze di cacao, possa riescire buona.

I lavori di cui sopra furono eseguiti per cominciare al Laboratorio Cantonale di Igiene in Lugano, indi proseguiti al domicilio dell'autore.

*Riassunto.*

Fu ripreso e studiato il metodo proposto da *E. Unna* nel 1918 per la colorazione differenziale di farine con amidi di vegetali differenti. Indicate le manchevolezze del sistema originale si propone un metodo progressivo di perfezionamento mediante miglioramento separato delle diverse operazioni; speciale cura alla scelta dei mordenti. Si annuncia che i primi perfezionamenti sono già riesciti e si richiama l'attenzione sul vantaggio che presenterà un metodo *Unna* reso rapido, pratico e sicuro per il controllo delle farine e del pane di mistura, come pure dei prodotti dietetici contenenti amidi.

Via Tesserete 33, Lugano.

**191. Dosage du radiofer 59 dans les matières biologiques**

par **Ch. Haenny, A. Jaccottet et R. Mayer.**

(30 V 49)

**1. Purification, contrôle de pureté, propriétés du radiofer.**

L'action des neutrons rapides sur le cobalt 59 donne lieu à la formation de radiofer 59 dont la période varie, suivant les auteurs, de 44 à 50 jours, ainsi qu'à celle de radiocobalts de périodes beaucoup plus longues. Si le cobalt contient du soufre comme impureté, ce qui est fréquent, il se forme en même temps du radiophosphore de période relativement courte (14,5 jours). Nous avons tout d'abord éliminé les traces gênantes de radiocobalt et de radiophosphore qui pouvaient contaminer le radiofer, en utilisant à cet effet, soit la séparation du fer et du cobalt par précipitation des hydroxydes en milieu tamponé<sup>1)</sup> soit la méthode de *Rothe*<sup>2)</sup> appliquée comme nous l'indiquons par la suite, celle-ci permettant de séparer le fer, à la fois du phosphore et du cobalt. De petites quantités d'un sel de cobalt et de phosphate servent d'entraîneur. La mesure de la période du radiofer 59 permet de s'assurer du succès des opérations précédentes et constitue en même temps une des meilleures vérifications du bon fonctionnement de l'ensemble des appareils de mesure de la radioactivité. Nous avons utilisé des compteurs de *Geiger* et *Müller* avec fenêtres de mica en bout de 2—4 mg/cm<sup>2</sup>. Nous nous sommes arrangés de manière à travailler avec des quantités de radiofer assez importantes pour que les mesures soient rapides tout en donnant une erreur probable beaucoup plus petite que les

<sup>1)</sup> *F. P. Treadwell*, Manuel de Chimie analytique, t. II; *Marcel Boll*, Paris, Dunod, 1943, p. 147.

<sup>2)</sup> *G. Charlot* et *D. Bézier*, Méthodes modernes d'analyse quantitative minérale, Masson & Cie, Paris 1945, p. 303; *G. Charlot*, Bl. 4, 1235 (1937).