

ATTI  
DELLA  
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCXI.

1914

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXIII.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1914

Ecologia vegetale. — *Di uno speciale tipo di isolatore per evitare la fecondazione incrociata nelle barbabietole madri.* Nota del dott. OTTAVIO MUNERATI, presentata dal Socio R. PIROTTA.

Patologia vegetale. — *La flagellosi delle Euforbie in Italia.* Nota del dott. ARRIGO VISENTINI, presentata dal Socio B. GRASSI.

Chimica fisica. — *Proprietà chimiche e chimico-fisiche dei muscoli e dei succhi muscolari.* Nota V: *Sul contenuto in acqua, in azoto totale ed in azoto estrattivo, dei muscoli striati bianchi e rossi.* Nota di G. QUAGLIARIELLO, presentata dal Corrispondente F. BOTTAZZI.

Chimica-fisica. — *Ricerche chimico-fisiche sui liquidi animali: Sulla curva di forza neutralizzatrice dell'urina.* Nota IX di G. QUAGLIARIELLO ed E. D'AGOSTINO, presentata dal Corrispondente F. BOTTAZZI.

Le Note precedenti saranno pubblicate nel prossimo fascicolo.

Chimica biologica. — *Ricerche sull'arginasi: un nuovo metodo titrimetrico per la ricerca dell'arginasi.* Nota I del dott. ANTONINO CLEMENTI <sup>(1)</sup>, presentata dal Socio L. LUCIANI.

L'arginasi, scoperta da Kossel e Dakin <sup>(2)</sup> nell'anno 1904, è uno dei più interessanti fermenti idrolitici che noi conosciamo, non solo dal punto di vista chimico, poichè agisce sopra una delle più importanti pietre strutturali della molecola proteica, ma anche dal punto di vista fisiologico, poichè in seguito alla sua azione la molecola dell'arginina, idrolizzandosi, dà origine a due corpi che occupano un posto di singolare importanza fra le sostanze cataboliche azotate dell'organismo animale e cioè all'urea e all'ornitina.

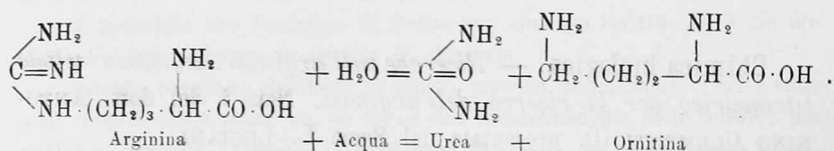
<sup>(1)</sup> Ricerche eseguite nell'Istituto di fisiologia dell'Università di Heidelberg, diretto dal prof. Albrecht Kossel.

<sup>(2)</sup> Kossel und Dakin, Zeitschr. für. Physiol. Chemie, Bd. 41, S. 321, an. 1904.

Kossel e Dakin scoprirono l'arginasi nel succo ricavato colla pressa di Büchner dal fegato del cane e del vitello. In ricerche posteriori gli stessi autori (1) trovarono l'arginasi presente nel succo pressato dei reni, della mucosa intestinale, del timo e delle ghiandole linfatiche. Nella milza e nel sangue l'arginasi non fu nettamente riconoscibile. Essa infine mancava assolutamente nei muscoli e nel secreto pancreatico. Dopo le ricerche di Kossel e Dakin, furono fatte poche ricerche sull'arginasi. Shiga (2) trovò l'arginasi nel fermento del lievito; Kiesel (3) in diverse piante; Riesser (4) poté stabilire che l'arginasi è capace di separare dalla d-1-arginina l'1-arginina, ed idrolizzare solamente la d-arginina; questa ristrettezza di cognizione è dovuta alle difficoltà specialissime che presenta lo studio di questo fermento.

Mi è sembrato che lo studio sistematico sulla distribuzione dell'arginasi in tutte le classi di vertebrati, non ancora da alcuno tentato, potesse versare nuova luce sull'importanza fisiologica di questo fermento; mi proposi perciò di ricercare l'arginasi in una prima serie di ricerche nel fegato, in una seconda serie di ricerche negli altri organi, reni principalmente, delle diverse classi di vertebrati. Per raggiungere più facilmente questo scopo, ho prima, seguendo il consiglio del mio maestro prof. A. Kossel, elaborato un nuovo procedimento, il quale, con minori quantità di arginina e in tempo più breve che non il metodo della precipitazione col nitrato d'argento di Kossel e Dakin, permette la ricerca dell'arginasi.

Il mio nuovo metodo si basa su questo principio: Per l'azione idrolitica dell'arginasi la molecola dell'arginina viene scomposta in una molecola di urea, e in una molecola di ornitina secondo questa equazione.



poichè la molecola di ornitina contiene due gruppi aminici, e la molecola di arginina un gruppo aminico e un gruppo guanidinico liberi, così, teoricamente, si deve dedurre che un metodo, il quale permette di determinare quantitativamente il numero dei gruppi aminici e non quello dei gruppi guanidinici liberi, deve essere praticamente adatto per riconoscere l'azione dell'arginasi sulla molecola dell'arginina.

(1) Kossel und Dakin, Zeitschr. für Physiol. Chemie, Bd. 42, S. 181, an. 1904.

(2) Shiga K., Zeitschr. für Physiol. Chemie, Bd. 42, S. 502, an. 1904.

(3) Kiesel, Zeitschr. für Physiol. Chemie, Bd. 75, S. 143, an. 1911.

(4) Riesser, Zeitschr. für Physiol. Chemie, Bd. 49, S. 210, an. 1906.

Un metodo, il quale teoricamente, soddisfa a queste condizioni, è il metodo della titolazione al formolo di Sørensen, che come risulta dalle ricerche dello stesso Sørensen (<sup>1</sup>), permette di determinare quantitativamente il numero dei gruppi aminici liberi e non dei gruppi guanidinici. Prima di procedere all'applicazione di questo metodo per la ricerca dell'arginasi ho stabilito sperimentalmente dei fatti i quali per l'applicabilità del metodo alla ricerca dell'Arginasi sono un presupposto necessario, e cioè che nella titolazione al formolo secondo il metodo di Sørensen, i sali di arginina, la quale contiene un gruppo guanidinico, un gruppo aminico e un gruppo carbossilico, si comportano come acidi monovalenti; l'urea, d'altra parte, la quale contiene due gruppi guanidinici, dopo aggiunta di formolo si comporta come un corpo neutrale; i sali di ornitina infine, la quale contiene due gruppi aminici, si comportano come acidi divalenti (tav. I, II, III).

TAV. I.

*Titolazione al formolo dell'urea dopo l'azione dell'arginasi.*

(Le provette, dopo aggiunta di 5 ccm. di toluolo, furono poste nella stufa a 37°) dal 27 giugno al 1° luglio 1913	Quantità di Na OH $\frac{n}{5}$ adoperata per la titolazione al formolo, in ccm.
Urea (soluz. $\frac{n}{10}$ ) ccm. 10 + acqua distillata ccm. 3 . . .	0,1
Urea (soluz. $\frac{n}{10}$ ) ccm. 10 + estratto acquoso di fegato di vitello ccm. 3 . . . . .	1,0
Urea (soluz. $\frac{n}{10}$ ) ccm. 10 + estratto di fegato di vitello ccm. 3 (bollito) . . . . .	0,2
Acqua distillata ccm. 10 + estratto di fegato di vitello ccm. 3 . . . . .	0,8

Da questa esperienza risulta: 10 ccm. di una soluzione  $\frac{n}{10}$  di urea, dopo un'azione dell'arginasi della durata di 4 giorni, presenta alla titolazione al formolo un aumento, rispetto alla titolazione eseguita prima dell'azione dell'arginasi, uguale a ccm. 0,1.

*L'urea quindi, sia prima sia dopo l'azione dell'arginasi, si comporta, rispetto alla titolazione al formolo, come un corpo neutrale.*

(<sup>1</sup>) Sørensen, Biochemische Zeitschr, Bd. 7, 43, an. 1907; Berichte der deutsche chemische Gesellschaft, 43, I, 643, an. 1910.

TAV. II.

*Titolazione al formolo del solfato di arginina.*

Sostanza adoperata per l'analisi	Indicatore adoperato	Quantità di soluzione adoperata, in ccm.	Quantità di Na OH $\frac{n}{5}$ necessario per la titolazione	
			in ccm.	in % del calcolato
La soluzione di arginina, neutralizz. con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> contiene, in 10 ccm., gr. 0,0594 di N (de- terminato col metodo di Kjeldahl): cioè gr. 0,1845 di arginina. La soluzione è $\frac{n}{9,43}$ .	Fenoltaleina (colore rosso chiaro)	10	5,15	97,1
	Fenoltaleina (color rosso intenso)	10	5,25	99,0

Da questa esperienza risulta: *Il solfato di arginina si comporta, nella titolazione al formolo, come un acido monovalente* (Sørensen, nelle sue ricerche, trovò un analogo comportamento pel cloruro di arginina. Per titolare 10 cc.m di una soluzione  $\frac{n}{10}$  di cloruro di arginina, Sørensen impiegò ccm. 4,95 di idrato di bario  $\frac{n}{5}$  sino al colore rosso chiaro della fenoltaleina (99 % del calcolato), e ccm. 5,05 fino al colore rosso intenso (101 % del calcolato).

TAV. III.

*Titolazione al formolo del solfato di ornitina.*

Sostanza adoperata per l'analisi	Indicatore adoperato	Quantità di soluzione adoperata, in ccm.	Quantità di Na OH $\frac{n}{5}$ necessaria per la titolazione	
			in ccm.	in % del calcolato
Gr. 0,0905 di solfato di ornitina (peso molecolare 181) vengono sciolti in 2 ccm. di acqua. Reazione leggermente acida; si neutralizza esattamente con NaOH e si diluisce fino a 10 ccm. La soluzione risulta, così, $\frac{n}{20}$ .	Fenoltaleina (colore rosso chiaro)	10	4,9	98
	Fenoltaleina (colore rosso intenso)	10	5,0	100



Da questa esperienza risulta: *Il solfato di ornitina si comporta alla titolazione al formolo, esattamente come un acido divalente*: infatti 10 cm. di una soluzione  $\frac{n}{20}$  di solfato di ornitina richiedono tanto Na OH  $\frac{n}{5}$  quanto ne richiedono 10 cm. di una soluzione  $\frac{n}{10}$  di cloruro di arginina, cioè il doppio di quanti ne richiederebbero 10 cm. di una soluzione  $\frac{n}{20}$  di cloruro di arginina (l'ornitina non è stata finora nè da Sørensen, nè da altri, sottoposta ad analisi).

Dalle ricerche su descritte si deduce: un sale di arginina dopo l'azione dell'arginasi, in seguito alla scomposizione della prima in urea e ornitina, deve comportarsi, dopo aggiunta di formolo, come un acido divalente e la attività dell'arginasi si può riconoscere dall'aumento (sino al raddoppiamento) del numero di cm. di Na OH  $\frac{n}{5}$  necessari per la titolazione al formolo del sale di arginina sottoposto all'azione del fermento.

Questo fondamentale principio teorico, che scaturisce dai fatti suesposti, trova una conferma nelle seguenti esperienze (tav. IV, V).

TAV. IV.

*Ricerche dell'Arginasi col metodo titrimetrico nel fegato di cane.*

5 febbraio 1914 9 " " " (in stufa a 37°; nella prova 2 <sup>a</sup> e 3 <sup>a</sup> furono aggiunti 5 cc <sup>3</sup> di toluolo)	Quantità adoperata di Na OH $\frac{n}{5}$		AZOTO				
	in cm.	in % del calcolato	N-aminico (Sørensen) in mgr.	N-totale			
				Sørensen in mgr.	Kyeldahl in mgr.		
Solfato di arginina ccm. 10	3,60	98,0	10,0	40,0	40,6		
Solfato di arginina ccm. 10; estratto acquoso di fegato ccm. 2 . . . . .	6,50	—					
Acqua distillata ccm. 10; estratto acquoso di fegato ccm. 2 . . . . .	0,30	—			in mgr.   in %		
Come Ornitina {	calcolato	7,20	—	Arginina {	aggiunta	126,1	100
	trovato	6,20	—		scomposta	91,0	72

10 cc.m della soluzione di solfato di arginina richiedevano per la neutralizzazione, dopo aggiunta di formolo, ccm. 3,60 di Na OH  $\frac{n}{5}$ ; sottoposti

per 4 giorni all'azione di estratto acquoso di fegato, dopo aggiunta di toluolo, essi richiedevano, per la titolazione al formolo ccm. 6,20 di  $\text{NaOH} \frac{n}{5}$  cioè si ebbe un aumento in seguito all'azione dell'arginasi di ccm. 2,60 corrispondenti all'arginina scomposta e all'ornitina formatasi.

L'arginina aggiunta (calcolata dall'N) era = 126,1 mmgr.; l'arginina scomposta (calcolata dall'aumentato N aminico) era = 91,0 mmgr. Il 72% dell'arginina aggiunta fu idrolizzata dall'arginasi.

TAV. V.

*Ricerche dell'Arginasi col metodo titrimetrico nel fegato di vitello.*

23 giugno 1914	Quantità adoperata di $\text{NaOH} \frac{n}{5}$		AZOTO				
	31 " "	in ccm.	in % del calcolato	N- aminico (Sørensen) in mgr.	N- totale		
Sørensen in mgr.				Kyeldahl in mgr.			
Solfato di arginina ccm. 10	3,40	97,58	9,5	38,0	39,0		
Solfato di arginina ccm. 10; succo di fegato ottenuto con la presa di Büchner, ccm. 1 . . . . .	6,80	—					
Acqua distillata ccm. 10; succo di fegato ottenuto colla pressa di Büchner, cc. . . . .	00,5	—				in mgr.   in %	
Come Ornitina	calcolato	6,80	—	Arginina	aggiunta	121,1	100
	trovato	6,75	—		scomposta	118,2	97

10 cc.m della soluzione di solfato di arginina richiedevano per la neutralizzazione, dopo aggiunta di formolo, ccm. 3,40 di  $\text{NaOH} \frac{n}{5}$ ; sottoposti per 7 giorni all'azione (dopo aggiunta di toluolo) di succo preparato dal fegato colla pressa di Buchner richiedevano per la titolazione al formolo cc.m 6,75  $\text{NaOH} \frac{n}{5}$ : cioè si ebbe un aumento di 3,35 ccm.  $\text{NaOH} \frac{n}{5}$  corrispondente all'arginina scomposta e all'ornitina formatasi. L'arginina adoperata (calcolata dall'N totale Kyeldahl) era mmgr. 121,1; l'arginina scomposta (calcolata dall'aumento dell'N aminico) era mmgr. 118,2. Il 97% dell'arginina aggiunta fu idrolizzata dall'arginasi.

Le conclusioni di carattere generale che scaturiscono dai risultati delle ricerche surriferite sono le seguenti:

1<sup>a</sup>) L'azione dell'arginasi si può riconoscere mediante la determinazione quantitativa del nuovo gruppo aminico libero che si origina per la scomposizione idrolitica dell'arginina in urea e ornitina.

2<sup>a</sup>) Le considerazioni teoriche e i dati sperimentali intorno al comportamento dell'arginina, dell'ornitina e dell'urea rispetto alla titolazione al formolo, dimostrano che quest'ultimo metodo è un metodo appropriato per determinare quantitativamente e titrimetricamente l'azione idrolitica dell'arginasi.

3<sup>a</sup>) I risultati che si ottengono mediante l'applicazione di questo metodo per la ricerca dell'arginasi, confermano il principio fondamentale suesposto, e dimostrano che l'azione dell'arginasi si rileva dall'aumento sino al raddoppiamento del numero di cem. di  $\text{NaCH}_2\text{CO}_2$  necessari per la titolazione al formolo della soluzione del sale di arginina adoperata.

4<sup>a</sup>) L'arginasi è presente non solo nel succo ricavato colla pressa di Büchner, come già rilevarono Kossel e Dakin, ma anche nell'estratto acquoso del fegato dei mammiferi.

*Fisiologia. — Ricerche sulla secrezione spermatica. La prostata e la raccolta del secreto prostatico del cane.* Nota III del dott. G. AMANTEA, presentata dal Socio L. LUCIANI.

*Fisiologia. — Sul metabolismo degli aminoacidi nell'organismo: I. Azione del tessuto muscolare sugli aminoacidi aggiunti nel sangue circolanti. — II. Azione del tessuto muscolare sugli aminoacidi aggiunti al liquido di Ringer circolante.* Nota di U. LOMBROSO, presentata dal Socio LUCIANI.

*Fisiologia. — Sull'adattamento degli anfibî all'ambiente liquido esterno mediante la regolazione della pressione osmotica dei loro liquidi interni: V. I fenomeni che si osservano negli animali immersi in soluzioni saline isotoniche ed ipotoniche. — VI. Importanza dei sacchi linfatici.* Nota di B. BRUNACCI, presentata dal Socio LUCIANI.

Queste Note saranno pubblicate nel prossimo fascicolo.