ATTI

DELLA

REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCXII.

1915

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXIV.

1° SEMESTRE.

ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1915

TABELLA 3.

	Su 100 parti di fosforo totale			
	Muscoli bianchi		Muscoli rossi	
	P. dei fosfatidi	P. inorganico	P. dei fosfatidi	P. inorganico
Tacchino . .	10,98	89,02	22,89	77,11
Gallo	10,66	89,34	21,87	78,13
Coniglio. . .	12,99	87,01	16,75	83,25

Chimica fisiologica. — *Sulla possibilità di titolare al formolo il gruppo aminico monosostituito degli aminoacidi* (1) Nota del dott. ANTONINO CLEMENTI, presentata dal Socio L. LUCIANI.

Un metodo il quale negli ultimi anni si è dimostrato di una grande fecondità nel campo della fisiologia e della chimica fisiologica, poichè ha contribuito a rischiarare alcuni dei problemi fondamentali riguardanti la costituzione della molecola proteica e delle sue pietre strutturali (aminoacidi) e la trasformazione che essi subiscono nell'organismo, è il metodo della titolazione al formolo, di Sörensen (2).

Il Sörensen nella elaborazione del suo metodo, si è fondato sulle ricerche di Schiff (3) il quale dimostrò che è possibile di determinare titrimetricamente la quantità dei gruppi aminici degli aminoacidi quando si escluda la funzione chimica basica del gruppo aminico stesso; ciò si ottiene quando ad una soluzione di aminoacidi venga aggiunta aldeide formica (formolo). La reazione ha luogo secondo la seguente equazione:

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CH.NH_2 + HCHO \\ | \\ CO.OH \end{array} \rightleftarrows \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CH.N = CH_2 + H_2O \\ | \\ CO.OH \end{array}$$

(alanina) (aldeide formica) — (combinazione metilenica dell'alanina) (acqua)

(1) Ricerche eseguite nell'Istituto di chimica fisiologica della R. Università di Roma.

(2) Sörensen, *Enzimstudien*. Biochemische Zeitschrift, 7 Band. Seite 45.

(3) Schiff, Ann. der Chemie - 310 - (1899) Ann. der Chemie - 319 (1901) Ann. der Chemie 325 (1902).

Questo esempio della alanina dimostra come l'idrogeno del gruppo aminico viene occupato da un gruppo metilenico, e la combinazione si comporta alla titolazione come un acido monovalente; se si ha un *diaminoacido*, come l'ornitina che possiede due amino-gruppi liberi, *allo stato di sale*, saranno due le molecole di formaldeide che reagiscono con essi, e l'aminoacido alla titolazione si comporterà come un acido divalente, mettendosi in evidenza la funzione acida anche del radicale acido del sale (1).

In questi casi, e in tutti quelli sinora studiati (anche di proteine ben individualizzate come le Protamine di Kossel (2)) il gruppo aminico NH_2 non presenta nessuno dei due idrogeni sostituiti. Però noi sappiamo che l'idrogeno del gruppo NH_2 può essere parzialmente o totalmente sostituito da un gruppo più o meno complesso, come ad es. da un metile, secondo lo schema $R-N<^{H}_{R}$; l'azoto aminico così parzialmente sostituito, ha un grande interesse fisiologico, perchè si riscontra anche nell'organismo in svariate sostanze come ad es. nella sarcosina.

Non è stato finora indagato nè da Schiff, nè da Sörensen, nè dagli altri autori, che hanno elaborato il metodo della titolazione al formolo, se il gruppo aminico degli aminoacidi, anche quando il suo idrogeno sia stato parzialmente sostituito, è capace di reagire colla formaldeide e quindi se anche in questo caso gli aminoacidi siano titolabili col metodo di Sörensen; tale problema presenta un evidente interesse chimico e fisiologico.

Io mi sono proposto di risolverlo, e a tal'uopo ho sperimentato *sulla sarcosina* (*metilglicocolla*), la quale rappresenta l'aminoacido monosostituito più semplice, avente la formula di struttura

$$\begin{array}{l} CH_2 . N<^{H}_{CH_3} \\ | \\ CO . OH \end{array}$$

(metilglicocolla)

Essa, come è noto, insieme col nucleo guanidinico, prende parte alla costituzione della molecola della creatina e della creatinina, che si riscontra in svariati tessuti dell'organismo e nell'urina; per azione della barite sulla creatina e anche sulla teobromina e caffeina, si ha formazione di sarcosina.

La sarcosina è stata da me sottoposta all'analisi secondo le modalità indicate per la titolazione al formolo da Sörensen (3). Sperimentalmente ho così proceduto:

(1) Clementi Antonino, *Ricerche sull'arginasi: un nuovo metodo titrimetrico per le ricerche dell'arginasi*. Rendiconti della R. Accademia dei Lincei, Classe di scienze fisiche e naturali, vol. XXIII, serie 5ª, 2° sem. 1911.

(2) Kossel und Gaurillow, *Weitere Untersuchungen über die freien Amido gruppen der Proteinstoffe. Zeitschr. f. Phys. Chemie, Bd. 81, s. 174.*

(3) Sörensen (loc. cit.); Jessen-Hansen, *Die Formoltitration*. Handbuch der Biochemischen Albeitsmetoden. 6 Band. Seite 262.

1ª *Analisi* — Gr. 0,0891 di metilglicocolla (peso molecolare 89,1) vengono sciolti in 10 cc. di acqua distillata; la soluzione risulta, così, $^1/_{10}$ n. Si aggiungono 20 cc. della miscela di formolo, preparata secondo le indicazioni di Sörensen, e altrettanti se ne aggiungono alla soluzione di controllo rappresentata da 10 cc. di acqua distillata bollita (la soluzione di sarcosina si scolora; quella di controllo acquista un colore rosa, leggermente più intenso). Subito si comincia la titolazione diretta, mediante NaOH $\frac{n}{5}$, e si giunge alla sopratitolazione fino a 6 cc. di NaOH $\frac{n}{5}$; si rititola con HCl $\frac{n}{5}$, e si ottengono le cifre riportate nella Tabella I:

TABELLA I.

SOSTANZA analizzata	Colore dell'indicatore adoperato (Fenolftaleina)	Quantità adoperata di NaOH $\frac{n}{5}$ in cc. nella titolazione diretta	Quantità adoperata di HCl $\frac{n}{5}$ in cc. per la rititolazione	Quantità di NaOH $\frac{n}{5}$ calcolata in base ai dati ottenuti mediante la rititolazione con HCl $\frac{n}{5}$
Soluzione di controllo Acqua 10 cc.				
Miscela di Formolo 20 cc.	Rosa pallido. .	0,00	—	—
	Rosso evidente	0.10	—	—
	Rosso intenso .	0,20	—	—
	Sovratitolazlone	0,30		
	Rosso intenso .	—	0,15	0,15
	Rosso evidente	—	0,20	0,10
Soluzione di Sarcosina $\frac{1}{10}$ n 10 cc.				
Miscela di Formolo 20 cc.	Effiorescenza rosa inferiore al rosa pallido del controllo.	3,30	—	—
	Rosa pallido come il controllo.	3,80	—	—
	Rosso evidente	4,50	—	—
	Rosso intenso .	4,90	—	—
	Sovratitolazione	6,00		
	Rosso intenso	—	1,05	*4,95*
	Rosso evidente	—	1,40	*4,60*
	Rosa pallido .	—	2,15	3,85
	Rosa più pallido del controllo. .	—	2,50	3,50

Dalle cifre ottenute per la titolazione della soluzione di sarcosina sottraendo le cifre ottenute per la titolazione della prova di controllo, risulta che, per titolare 10 cc. di sarcosina $^1/_{10}$ n, sono necessarii cc. 4,5 di NaHO $^1/_5$ n per raggiungere il colore rosso evidente della fenolftaleina (secondo stadio di Sörensen) e cc. 4,8 di NaOH $^1/_5$ n per raggiungere il colore rosso intenso della fenolftaleina (terzo stadio di Sörensen).

Facendo il calcolo dell'azoto che così viene titolato, rispetto a quello che teoricamente dovrebbe essere titolato, si ottengono le cifre riportate nella Tabella II:

TABELLA II.

SOSTANZA adoperata per l'analisi	INDICATORE adoperato	QUANTITÀ ADOPERATA di NaOH $\frac{N}{5}$		*Osservazioni*
		in cc.	in °/₀ del calcolato	
10 ccm. di soluzione $\frac{1}{10}n$ di *sarcosina* (metilglicocolla)	Fenolftaleina (colore rosso evidente) . . (2° stadio)	4,50	90,0	—
	Fenolftaleina (colore rosso intenso) . . . (3° stadio)	4.80	96,0	—

Il risultato ottenuto in questa analisi dimostra, che la *sarcosina reagisce positivamente con la formaldeide, e nella titolazione eseguita secondo il metodo di Sörensen, si comporta come un acido monobasico.*

2ª *Analisi* — Gr. 0,1782 di sarcosina vengono sciolti in 20 cc. di acqua distillata. La soluzione risulta, così, $^1/_{10}$ n. Si aggiungono 20 cc. di miscela di formolo preparata secondo le indicazioni di Sörensen, e altrettanti se ne aggiungono alla soluzione di controllo (20 cc. di acqua distillata bollita): la soluzione di sarcosina si scolora; quella di controllo acquista una colorazione rosa, leggermente più intensa. Subito si comincia la titolazione diretta mediante NaOH $\frac{n}{5}$, e si a sovratitola fino a 11 cc.; quindi si rititola con H Cl $\frac{n}{5}$, si ottengono così le cifre indicate nella Tabella III.

TABELLA III.

SOSTANZA analizzata	Colore dell'indicatore adoperato (fenolftaleina)	Quantità adoperata di NaOH $\frac{n}{5}$ in cc. nella titolazione diretta	Quantità adoperata di HCl $\frac{n}{5}$ in cc. per la rititolazione	Quantità di NaOH $\frac{n}{5}$ calcolata in base ai dati ottenuti mediante la rititolazione con HCl $\frac{n}{5}$
Soluzione di controllo Acqua 10 cc.				
Miscela di Formolo 20 cc.	Rosa pallido. .	0,0	—	—
	Rosso evidente	0,1	—	—
	Rosso intenso.	0,3	—	—
	Sovratitolazione	0,50		
	Rosso intenso.	—	0,20	0,30
	Rosso evidente	—	0,40	0,10
Soluzione di sarcosina $\frac{n}{10}$ 20 cc.				
Miscela di Formolo 20 cc.	Efflorescenza rosa inferiore al rosa pallido del controllo.	6,50	—	—
	Rosa pallido come il controllo.	7,60	—	—
	Rosso evidente	*9,00*	—	—
	Rosso intenso	*9,70*	—	—
	Sovratitolazione	11,00		
	Rosso intenso	—	1,30	*9,70*
	Rosso evidente	—	1,90	*9,10*
	Rosa pallido. .	—	3,20	7,80
	Rosa più pallido del controllo .	—	4,10	6,90

Dalle cifre ottenute nella titolazione della soluzione, sottraendo le cifre ottenute nella titolazione della prova di controllo, risulta che, per titolare 20 cc. di sarcosina $^1/_{10}$ *n*, sono necessarî cc. 9 di NaOH $^1/_5$ *n* per raggiungere il colore rosso evidente della fenolftaleina (secondo stadio di Sörensen), e cc. 9,4 di NaOH $^1/_5$ *n* per raggiungere il colore rosso intenso della fenolftaleina (terzo studio di Sörensen).

Facendo il calcolo dell'azoto che così viene titolato rispetto a quello che teoricamente dovrebbe risultare, si ottengono le cifre visibili nella seguente tabella:

TABELLA IV.

SOSTANZA adoperata per l'analisi	INDICATORE adoperato	QUANTITÀ ADOPERATA di NaCH $\frac{n}{5}$ in cc.	in °/₀ del calcolato	*Osservazioni*
20 ccm. di soluzione $\frac{1}{10}n$ di *sarcosina* (metilglicocolla)	Fenolftaleina (colore rosso evidente) . . (2° stadio)	9,00	90,00	
	Fenolftaleina (colore rosso intenso). . . (3° stadio)	9,40	94,00	

I risultati ottenuti in questa analisi dimostrano che *la sarcosina reagisce positivamente colla formaldeide, e nella titolazione secoudo il metodo di Sörensen, si comporta come un acido monobasico.*

Dato il comportamento di acido monobasico della sarcosina nella titolazione al formolo, come risulta dalle esperienze surriferite, si deduce che la sarcosina e l'aldeide formica reagiscono fra loro secondo la seguente equazione:

$$\begin{array}{l} CO.OH \\ | \\ CH_2.N<^{CH_3}_{H} \\ \\ CH_2.N<^{H}_{CH_3} \\ | \\ CO.OH \end{array} + HCHO = \begin{array}{l} CO.OH \\ | \\ CH_2.N<^{CH_3} \\ \quad\quad CH_2 \\ CH_2.N<_{CH_3} \\ | \\ CO.OH \end{array} + H_2O$$

(sarcosina) (formaldeide) (combinazione metilenica della sarcosina) (acqua)

dove due molecole si sarcosina si uniscono a una molecola di formaldeide dando luogo alla combinazione metilenica della sarcosina, più una molecola di acqua; la funzione acida del carbossile delle due molecole di sarcosina viene così messa in evidenza e si lascia determinare quantitativamente coll'idrato di sodio.

Se rispetto al risultato finale la sarcosina, analogamente alla glicocolla, si comporta come un acido monobasico, vi è una lieve differenza nel comportamento della glicocolla e, rispettivamente, della sarcosina, nel senso che le cifre ottenute nella titolazione al formolo, della sarcosina, sono più basse di quelle che si ottengono nella titolazione della glicocolla. Infatti, mentre, ad es., per titolare fino al secondo e al terzo stadio 10 cc. di soluzione $^1/_{10}$ n

di glicocolla, Sörensen impiegò un numero di cc. di $Ba(OH)_2$ $\frac{n}{5}$ corrispondenti al 99 % del calcolato, per titolare 10 cc. di sarcosina $^1/_{10}$ n fino al secondo stadio io ho impiegato 4,5 cc. di NaOH $^1/_5$ n corrispondenti al 90 % del calcolato; e per raggiungere il terzo stadio della colorazione della fenolftaleina, ne ho impiegati 4,8 corrispondenti al 96 % del calcolato.

Come si vede, il comportamento della sarcosina si avvicina di più a quello osservato da Sörensen per l'alanina ed altri aminoacidi, che non a quello della glicocolla. Gli stessi fattori già invocati da Sörensen si possono invocare per spiegare questo comportamento della sarcosina. Anzitutto il fatto che il sistema, il quale si origina durante la titolazione con NaOH,

$$\begin{array}{l} CO.OH \\ | \\ CH_2.N<^{CH_3}_{H} \\ \\ CH_2.N<^{H}_{CH_3} \\ | \\ CO.OH \end{array} \begin{array}{l} + \; NaOH \\ \\ + \; HCHO \\ + \; NaOH \end{array} \rightleftarrows \begin{array}{l} CO.ONa \\ | \\ CH_2.N<^{CH_3} \\ \qquad\quad CH_2 \\ CH_2.N<_{CH_3} \\ | \\ CO.Na \end{array} \begin{array}{l} + \; H_2O \\ + \; H_2O \\ + \; H_2O \end{array}$$

è reversibile, e l'aumento del numero degli idrossilioni della soluzione fa ritardare il decorrere della reazione da sinistra a destra; d'altra parte si aggiunga il fatto, del comportamento diverso, rispetto all'indicatore fenolftaleina, dell'acqua e degli acidi forti da una parte, e delle soluzioni di acidi deboli, come sono le combinazioni metileniche, dall'altra. Ciò sembra stare in rapporto, secondo le ricerche di Sörensen, con una diversa concentrazione degli idrogenioni: così che, *nel caso della sarcosina* come nel caso dell'alanina rilevato da Sörensen, si ha *un passaggio lento da uno stadio all'altro della colorazione della fenolftaleina*, laddove per la soluzione di controllo bastano in genere da 0,1 a 0,2 cc. di NaOH $\frac{n}{5}$ per fare passare la concentrazione degli idrogenioni da 10^{-8} $10^{-8,4}$ (primo stadio) a $10^{-8,7}$ $10^{-8,8}$ (secondo stadio) e 10^{-9} $10^{-9,1}$ (terzo stadio).

Le conclusioni generali che si ricavano dalle presenti ricerche, sono le seguenti:

1°) *Il gruppo aminico degli aminoacidi, anche se monosostituito, reagisce colla aldeide formica.*

2°) *La reazione avviene tra una molecola di aldeide formica e due molecole dell'aminoacido monosostituito, legandosi il metilene a due atomi di* N, *secondo lo schema:*

$$\begin{array}{l} R-N<^{R}_{H} \\ R-N<^{H}_{R} \end{array} + HCHO = \begin{array}{l} R-N<^{R} \\ \qquad\quad CH_2 \\ R-N<_{R} \end{array} + H_2O$$

(aminoacido monosostituito) (formaldeide) (combinazione metilenica) (acqua)

3°) *L'amino acido monosostituito presenta il comportamento di un acido monobasico nella titolazione al formolo secondo il metodo di Sörensen.*

4°) *Per rilevare tale comportamento è necessario proseguire la titolazione fino a raggiungere il colore rosso intenso della fenolftaleina.*

Zoologia. — *A proposito delle spermatofore di Carybditeuthis maculata ritenute spugne parassite.* Nota preliminare di SILVIA MORTARA [1], presentata dal Socio B. GRASSI.

Avendo iniziato, per consiglio del prof. Grassi, uno studio su alcune specie di Cefalopodi abissali [2], voglio esporre in una breve Nota le osservazioni da me fatte sulle spermatofore nella *Carybditeuthis maculata*, riservandomi di pubblicare a suo tempo altre più estese ricerche con le tavole illustrative.

Nella femmina della *Carybditeuthis*, aprendo il mantello dal dorso e togliendo il gladio, ho trovato, in tutti gli individui da me osservati, caudalmente rispetto al muscolo collare, una speciale area pieghettata che fa parte della parete dorsale del sacco viscerale, ed ha la forma di un cerchio troncato nella parte posteriore. Su quest'area posa un corpo tondeggiante, che ha forma press'a poco di una lente piana dorsalmente, convessa ventralmente, e che con una porzione del suo contorno aderisce completamente al margine posteriore dell'area stessa. Questo corpo, se non viene levato accuratamente, può apparire bucherellato come un favo. Accurate osservazioni mi hanno mostrato che esso è contenuto entro una specie di saccoccia, la quale ha una parete ventrale formata dall'area pieghettata, di cui ho parlato, e una parete dorsale formata da una porzione del mantello. Le due pareti sono congiunte l'una all'altra posteriormente.

Ho voluto in particolare modo studiare questo corpo, descritto come *una spugna acalcarea* da chi prima di me l'ha osservato [3], e mi sono facilmente persuasa, già dalle dilacerazioni, che si tratta invece di *un insieme di spermatofore*, deposte evidentemente dal maschio durante l'accoppiamento.

La ricerca bibliografica [4] e lo studio istologico hanno convalidato le mie osservazioni.

[1] Lavoro eseguito nel laboratorio di Anatomia comparata della R. Università di Roma.

[2] Ringrazio il dott. Cotronei che mi ha guidata nella ricerca.

[3] A. Vivanti, assistente all'Istituto zoologico della R. Università di Pavia, diretto dal prof. Mazzarelli (*Contributo alla conoscenza dei Cefalopodi abissali del Mediterraneo*, nell'Arch. zool. ital., vol. VII, 1914).

[4] Racovitza, Arch. Zool. Exper., t. II, S. 3.