Istituto di Biochimica applicata della Università'Sassari
(Direttore Prof. E. Leone)

Sulla composizione chimica del "Corpo bianco" di alcuni cefalopodi *

di
E. Farina

Argomento di particolare interesse, oggetto di indagine da parte di svariati ricercatori é la composizione chimica del *corpo bianco* dei cefalopodi.

Di tale organo fin'ora ben poche notizie si hanno sia per quanto riguarda la funzione fisiologica, che la composizione chimica.

Il BOLOGNARI (1) che di recente s'è interessato di tale problema, mediante tecniche istologiche, istochimiche e di microscopia elettronica ha stabilito che in tali organi sono presenti basi puriniche e piú precisamente guanina e xantina.

Ma come é facilmente comprensibile tale tipo di ricerche non é strettamente specifico sulla precisa natura dei composti in esame, per cui ho ritenuto opportuno studiare l'argomento facendo uso di tecniche piú sensibili quali sono quelle della elettroforesi e cromatografia su carta.

Parte sperimentale

PRELEVAMENTO DELL'ORGANO Sono stati sempre adoperati *Octopus vulgaris* di grossa taglia (4 :5 kg di peso) ai quali, dopo essere stata praticata una profonda incisione nella arcata

---

* Comunicación 6-7 a las V Jornadas Bioquímicas Latinas. Barcelona, mayo 1959.

sopraciliare, venivano asportati gli occhi; si metteva in tal modo in evidenza una massa bianca gelatinosa costituente appunto l'organo in esame.

Il peso di tali corpi bianchi non ha mai superato 1 gr.

OMOGEINIZZAZIONE Dopo il prelevamento l'organo era omogeneizzato con NaOH 0,1 N. e dopo centrifugazione il soprannatante veniva raccolto e sottoposto a deproteinizzazione.

DEPROTEINIZZAZIONE E' stata eseguita con HClO_4 portando il liquido a una concentrazione finale in acido del 4 %.

PURIFICAZIONE DELL'ESTRATTO Dopo aver eliminato mediante centrifugazione il precipitato proteico il liquido era portato a pH neutro mediante aggiunta di piccole quantità di soluzione di KOH al 20 %. Veniva quindi lasciato in frigorifero a -2°C . per 30' onde facilitare la precipitazione del KClO_4 formatosi, che veniva dopo eliminato per centrifugazione.

Il liquido così ottenuto veniva quindi diviso in due parti, la prima porzione veniva analizzata direttamente, mentre la rimanente porzione veniva sottoposta ad ulteriore purificazione prima di essere esaminata.

Per tale purificazione l'estratto veniva prima acidificato con H_2SO_4 fino a concentrazione 0,1 N. e quindi addizionato di sol. di AgNO_3 fino a conc. finale 0,01 N. Dopo centrifugazione il liquido soprastante era eliminato mentre il precipitato veniva estratto con piccole quantità di HCl 0,1 N. le quali combinate e neutralizzate erano in seguito sottoposte ad analisi.

In alcuni casi la decomposizione del sale d'argento é stata anche effettuata mediante trattamento del precipitato, sospeso in H_2O , con H_2S .

Si centrifugava quindi il liquido per eliminare il precipitato di Ag_2S formatosi e si faceva passare una corrente d'aria per eliminare l' H_2S ancora presente. Dopo filtrazione il liquido era pronto per l'indagine cromatografica ed elettroforetica.

CROMATOGRAFIA SU CARTA.

La cromatografia é stata eseguita impiegando quasi sempre la carta Whatman n1 e talvolta la n4. La posizione dei composti sulla carta dopo lo sviluppo del cromatogramma veniva individuata con lampada «Mineralight» a raggi u.v. I cromatogrammi piú interessanti sono stati anche fotografati, a tale scopo e stata seguita la tecnica di MARKAM e SMITH (2-3) impiegando come sorgente di raggi u.v. la stessa lampada precedentemente citata.

Furono adoperati i seguenti sistemi di solventi :

- 1) Isopropanolo 179 ml. H₂O 139 ml. HCl conc. ml. 141 (4) discendente
- 2) n-propanolo 75 ml. NH₄OH 28 % ml. 1,5 H₂O ml. 23,5 (5) ascendente
- 3) n-propanolo 75 ml. ac. acetico glac. 1,5 ml. H₂O 23,5 ml. (6) ascendente
- 4) ac. isobutirrico 40 ml. H₂O 20,8 ml. NH₄OH 25 % 0,04 ml. (7) discendente
- 5) Na₂HPO₄ 5 % saturato con alcool iso-amilico, fase alcolica e acquosa (8) discendente
- 6) KH₂PO₄ 5 % saturato con alcool iso-amilico, fase alcolica e acquosa (9) ascendente
- 7) n-butanolo-urea 10 % (10) ascendente.
- 8) n-butanolo, ac. acetico, H₂I 50 : 40 : 10 discendente.

Le analisi cromatografiche effettuate con questi solventi hanno costantemente evidenziato la presenza di almeno due componenti, che dal comportamento rispetto ai composti puri esaminati contemporaneamente, e soli, o in miscuglio mostrano lo stesso comportamento dei due nucleosidi purinici adenosina e guanosina.

Ad ulteriore conferma di quanto detto è stata eseguita anche una separazione di questi due componenti, mediante cromatografia dell'estratto concentrato di corpi bianchi. Queste due frazioni eluite con H₂O sono state ulteriormente analizzate cromatograficamente e sottoposte ad altri saggi (spettro u.v. fosforo inorganico, riboso, ecc.). Tali saggi hanno ancora una volta confermato la presenza dell'adenosina e guanosina.

Anche l'elettroforesi su carta ha portato alle stesse conclusioni.

A tal fine è stata impiegata la carta Whatman 3MM in strisce di 13 × 45 cm. immerse in puffer di ac. acetico-acetato d'ammonio 0,05M. pH 5, con un gradiente di 15 V. per cm. ed una intensità di corrente di 15-20 mA. La tecnica era quella di MARKAM e SMITH (11) con un passaggio di corrente di circa 4 h.

Anche l'idrolisi con HCl 0,5N degli estratti di corpi bianchi ha confermato i precedenti risultati.

Si può quindi concludere che, in base ai dati di queste prime ricerche, nei corpi bianchi di *Octopus vulgaris* sono presenti in grande quantità adenosina e guanosina.

Le ricerche proseguono onde poter dare dei dati quantitativi sulle concentrazioni e ulteriormente confermare questi primi risultati.

Riassunto

Da alcuni AA. [GAZAI e B. GORAZE, BOLOGNARI (1)] sono state descritte particolari formazioni all'interno del corpo bianco dei cefalopodi, le quali sono caratterizzate da reazioni chimiche ed istochimiche tipiche dei composti pirinici. Una identificazione conclusiva di tali composti non è stata però ancora raggiunta, e di conseguenza manca anche qualunque dato di ordine quantitativo.

Nella presente comunicazione vengono riferiti i primi risultati ottenuti applicando le tecniche analitiche appropriate, con particolare riguardo a quelle di cromatografia ed elettroforesi su carta ai corpi bianchi di vari cefalopodi in esame.

Summary

On the chemical composition of the white bodies of some cephalopoda

Some authors (CAZAL and BOGORAZA, BOLOGNARY) have described particular formations in the white bodies of cephalopoda, which are characterized by chemical and histochemical reactions typical of purinic compounds. A conclusive identification of these compounds has not been obtained up till the present and consequently there are no quantitative data.

In the present communication the first results are reported, obtained by applying the appropriate analytic techniques, specially with paper chromatography and paper electrophoresis on the white bodies of the various cephalopoda examined.

Bibliografía

- (1) BOLOGNARI, A. *BOLL : S.I.B.S.*, **27**, 898, 1951 e **35**, 35, 1959.
- (2) MARKAM, R., SMITH, J. : *Bioc. J.*, **45**, 294, 1949.
- (3) MARKAM, R., SMITH, J. : *Bioc. J.* **52**, 552, 1952.
- (4) WYATT, R. : *Bioc. J.*, **48**, 584, 1951.
- (5) AMES, B., MITCHELL, H. K. : *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 252, 1952.
- (6) AMES, B., MITCHELL, H. K. : *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 252, 1952.
- (7) LOFGREN, G. : *Acta. Chem. Scand.*, **6**, 1030, 1952.
- (8) CARTER, L. : *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1766, 1950.
- (9) CARTER, L. : *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1766, 1950.
- (10) EMANUEL, C. F. : *Zeit. Vergl. Physiol.*, **39**, 477, 1956-57.
- (11) MARKAM, R., SMITH, J. : *Bioc. J.*, **52**, 552, 1952.