
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GRAZIA CASERTA, VINCENZO ALBERGONI

Ricerche sugli Ubichinoni dei Molluschi

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 37 (1964), n.3-4, p. 197-202.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_37_3-4_197_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Biochimica. — *Ricerche sugli Ubichinoni dei Molluschi* (*). Nota di GRAZIA CASERTA e VINCENZO ALBERGONI, presentata (**) dal Socio L. CALIFANO.

È stato recentemente accertato che nei tessuti dei Molluschi, oltre gli enzimi piridinici e flavinici, sono presenti tutti gli enzimi ferroporfirinici della catena respiratoria, i quali partecipano al trasporto degli elettroni dal substrato all'ossigeno molecolare [1]. In considerazione delle proprietà enzimatiche recentemente riconosciute agli Ubichinoni (Coenz. Q), era interessante ricercare se e quali omologhi di questa nuova classe di sostanze sono presenti nei tessuti dei Molluschi. È noto che le prime ricerche sulla distribuzione degli Ubichinoni hanno indicato che, mentre gli omologhi superiori (Ubichinoni-50 e 45) sono presenti nei Vertebrati inferiori e nei Mammiferi, gli omologhi con catena laterale isoprenica più corta (Ubichinoni-35 e 30) sono caratteristici, salvo alcune eccezioni, dei microrganismi e dei batteri [2]. Le nostre ricerche sulla presenza degli Ubichinoni negli Invertebrati indicano tuttavia che l'omologo superiore (50) ha una diffusione assai maggiore, essendo l'unico composto della serie presente in diversi gruppi di organismi invertebrati marini e terrestri [3]. Dal punto di vista dell'evoluzione biochimica degli Ubichinoni sembrerebbe pertanto che l'omologo (50) o Coenzima Q₁₀ rappresenti la regola, mentre gli omologhi inferiori, che possono anche comparire qua e là sia nei Vertebrati che negli Invertebrati [4] siano invece da considerare eccezioni, la cui presenza deve forse essere ricercata in modificazioni particolari della biosintesi di queste sostanze.

MATERIALE E METODI. — Per questo studio sono state usate specie rappresentative di diverse classi di Molluschi Cefalopodi, Gasteropodi e Lamellibranchi. In alcuni casi è stato preso il corpo *in toto* dell'animale, in altri casi organi e tessuti. Il materiale era sempre prelevato dall'animale vivo e conservato a — 20° C fino al momento dell'uso. Nessuna modificazione del contenuto in Ubichinoni è stata riscontrata in seguito alla conservazione del materiale a freddo anche per alcune settimane. In ogni caso il materiale era saponificato con potassa alcoolica per un'ora in presenza di pirogallolo (KOH 10% in etanolo a 95%; 150 gr KOH e 8 gr pirogallolo per ogni 100 gr di tessuto). L'insaponificabile era estratto tre volte con 50 ml di etere di petrolio; gli estratti riuniti e lavati con acqua fino a neutralità, disidratati con solfato di sodio anidro e filtrati, erano portati a

(*) Lavoro eseguito nel Reparto di Fisiologia e Biochimica della Stazione Zoologica Napoli e nell'Istituto di Fisiologia generale dell'Università di Sassari.

(**) Nella seduta del 14 marzo 1964.

secchezza mediante evaporazione sotto vuoto. Il residuo, diversamente colorato a seconda del materiale usato, era ridisciolti in etanolo e lasciato a freddo (4° C) per una notte. Cristallizzano in tal modo gli steroli che vengono allontanati mediante centrifugazione. Dall'epatopancreas di *Octopus* in queste condizioni si separa invece una fase oleosa, densa, che si allontana per gravità. L'estratto era portato a secchezza sotto vuoto e ripreso in etanolo per le prime analisi spettrofotometriche.

L'analisi cromatografica degli estratti in etere di petrolio veniva eseguita su colonna di allumina Merck (20 gr, altezza 15 cm) precedentemente lavata con HCl, poi con acqua fino a neutralità, essiccata a 120° C, indi mescolata con acqua al 5 %. L'eluzione era eseguita con miscele di etere ed etere di petrolio (E/P = 2, 4, 15 e 50 %) e infine con etere e con metanolo. Tutte le frazioni erano analizzate spettrofotometricamente, prima e dopo trattamento con boridride, mediante lo spettrofotometro autoregistratore DK-2. Le frazioni aventi proprietà in comune erano combinate insieme, portate a secchezza e usate per ulteriori analisi. Come è noto, gli ubichinoni sono eluiti generalmente con miscele E/P al 4 % (talvolta compaiono anche nelle frazioni corrispondenti al 2 %), mentre il tocoferolo e il tocoferilchinone escono con le frazioni corrispondenti al 2 % e al 50 % rispettivamente. La determinazione quantitativa degli Ubichinoni presenti è stata fatta in base alla variazione della densità ottica a 275 m μ osservata fra lo spettro della forma ossidata e quello della forma ridotta.

L'identificazione dei composti chinonici è stata eseguita mediante il saggio colorimetrico di Craven [5] e mediante cromatografia su carta [6] in presenza di omologhi puri di Ubichinoni, di tocoferolo e di tocoferilchinone. L'Ubichinone-50 è stato preparato in laboratorio dal cuore di bue secondo il metodo di Crane et al. [7] e il tocoferilchinone dal tocoferolo secondo Karrer e Geiger [8].

RISULTATI.

Octopus vulgaris. - Sono stati usati il muscolo del mantello e l'epatopancreas. Come in tutti gli altri casi descritti in appresso, l'insaponificabile di questi organi è ricco in steroli che per la maggior parte cristallizzano a freddo, ma che talvolta è assai difficile rimuovere completamente. I risultati della cromatografia su colonna sono riportati nella Tabella I. Si ottengono diverse frazioni di cui alcune soltanto presentano spettri caratteristici prima e dopo trattamento con boridride. Le frazioni 1 e 2 contengono tocoferolo e ubichinone rispettivamente. Quest'ultimo è stato ulteriormente identificato mediante i saggi colorimetrici e cromatografici come l'omologo 50 (Coenz. Q₁₀). In nessuna frazione è stata riscontrata la presenza di tocoferilchinone.

Molti esperimenti sono stati eseguiti anche in condizioni diverse con l'epatopancreas di *Octopus* nel tentativo di dimostrare la presenza di composti chinonici in quest'organo. Nessuna delle frazioni ottenute dalle colonne cro-

matografiche rivela spettrofotometricamente la presenza di ubichinone. Tutte le frazioni erano anche portate a secchezza e analizzate ulteriormente. In nessun caso è stata riscontrata in esse la presenza di ubichinoni.

L'epatopancreas di *Octopus* contiene invece tocoferolo e tocoferilchinone.

TABELLA I.

Cromatografia su colonna dell'insaponificabile di muscolo di Octopus vulgaris.

N. frazioni	Eluente	SPETTRO	
		Max oss.	Max rid.
1	E/P 2 %	286	286
2	4 %	272,5	290
3	15 %	259-271-282-295	
4	50 %		
5	Etere		
6	Metanolo		

Aplysia limacina. - Di questa specie sono stati analizzati i muscoli della radula e dello stomaco e l'epatopancreas. Dall'insaponificabile dei muscoli sia della radula che dello stomaco si ottengono, mediante cromatografia su colonna, frazioni che rivelano la presenza di tocoferolo e di ubichinone. Quest'ultimo è l'omologo 50 ed è presente in quantità maggiori nella radula che nello stomaco (0,82 e 0,35 mg per 100 gr di tessuto fresco rispettivamente). In nessuna delle frazioni è stata riscontrata la presenza di tocoferilchinone.

Dall'insaponificabile dell'epatopancreas di *Aplysia* si ottengono, mediante cromatografia su colonna, sei frazioni che, essiccate e ridisciolte in etanolo presentano spettri caratteristici (Tabella II). In nessun caso, tuttavia, si osservano variazioni dello spettro dopo trattamento con boridride, il che fa ritenere che nessuna frazione contenga ubichinone. Ciò è confermato dalla cromatografia su carta. È presente però tocoferolo. Inoltre la cromatografia su carta della frazione 4 (quella cioè che è eluita con etere al 50 %) rivela la presenza di un composto il cui Rf è alquanto maggiore di quello dell'omologo 50 usato come standard. Questo composto, per le ragioni suddette non può essere però ubichinone e nessun tentativo di identificazione è stato fatto.

Ostrea edulis e *Mytilus galloprovincialis.* - Come è stato detto precedentemente, è stato usato tutto il corpo di queste specie di Lamellibranchi, dopo rimozione della conchiglia e lavaggio con acqua di mare. L'insaponificabile

che si ottiene da questo materiale contiene una gran quantità di pigmenti che si separano mediante cromatografia su colonna ed escono con le varie frazioni rendendone difficile l'analisi spettrofotometrica e colorimetrica. Mediante cromatografia su carta, tuttavia, è stato possibile dimostrare la presenza in entrambe le specie esaminate di tocoferolo e di ubiquinone. Quest'ultimo migra esattamente come l'omologo 50 e la macchia di esso si sovrappone a quella del composto usato come controllo.

TABELLA II.

Cromatografia su colonna dell'insaponificabile di epatopancreas di Aplysia limacina.

N. frazioni	Eluente	SPETTRO	
		Max oss.	Max rid.
1	E/P 2 %	292	292
2	4 %	261	261
3	15 %	250-259-261-282-291	
4	50 %	259-281	
5	Etere		
6	Metanolo		

CONCLUSIONI.

I risultati di tutti gli esperimenti sono riportati nella Tabella III. Le specie usate per questo studio, anche se in numero assai limitato, sono abbastanza rappresentative per far ritenere che i tessuti dei Molluschi contengono Ubichinoni. Di tutti gli omologhi fino ad ora rinvenuti in natura, nei Molluschi è presente solo l'Ubichinone 50 o Coenzima Q₁₀ il quale pertanto ha una diffusione maggiore di quanto si ammetta generalmente. Come è stato già ricordato, l'Ubichinone 50 è anche l'omologo presente in tutti gli Echinodermi fino ad ora esaminati [3] e, secondo ricerche preliminari, in tutti i Celenterati e i Tunicati.

Le determinazioni quantitative indicano anche un costante parallelismo fra contenuto in ubiquinone e contenuto in citocromi dei tessuti esaminati. Ciò è stato anche riscontrato da diversi Autori nei tessuti dei Mammiferi ed è in accordo con l'ipotesi della partecipazione degli Ubichinoni ai processi della respirazione cellulare. I muscoli della radula di *Aplysia* che sono

i più ricchi in citocromi fra tutti i tessuti esaminati [1], sono anche quelli che hanno il maggior contenuto in Ubichinone 50. L'epatopancreas di *Octopus* e di *Aplysia* invece, in cui non è stato mai possibile dimostrare con metodi diretti la presenza di citocromi [1], pare anche sprovvisto di Ubichinone.

TABELLA III.

Presenza di Ubichinoni nei Molluschi.

SPECIE	MATERIALE	Tocoferolo (1)	Tocoferil- chinone (1)	UBICHINONE			
				(2)	(3)	(4)	(5)
Cefalopodi:							
<i>Octopus vulgaris</i>	Epatopancreas	+	+	—	—	—	0
	Muscolo	+	—	+	+	+	0,62
Gasteropodi:							
<i>Aplysia limacina</i>	Epatopancreas	+	—	—	? (6)		
	Radula	+	—	+	+	+	0,82
	Stomaco	+	—	+	+	+	0,35
Lamellibranchi:							
<i>Ostrea edulis</i>	Corpo <i>in toto</i>	+	—	+	+		0,26
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Corpo <i>in toto</i>	+	—	+	+		0,28

(1) Identificato spettrofotometricamente e cromatograficamente.

(2) Identificazione spettrofotometrica.

(3) Identificazione cromatografica.

(4) Identificazione colorimetrica: saggio di Craven. In tutti quei casi in cui le frazioni cromatografiche erano ancora fortemente colorate, il saggio di Craven non è stato usato per l'identificazione.

(5) mg per 100 gr di tessuto fresco.

(6) Dopo riduzione con boridride compare una macchia il cui Rf non corrisponde a nessuno degli omologhi naturali degli Ubichinoni.

Tutti i tessuti dei Molluschi contengono tocoferolo. Il composto di ossidazione di questa sostanza, il tocoferilchinone, è stato invece riscontrato soltanto nell'epatopancreas di *Octopus vulgaris*. Come è noto, è stato suggerito che questo composto chinonico, in presenza di acido fosforico, potrebbe partecipare alle fosforilazioni ossidative [9]. Data la grande facilità con cui il tocoferilchinone può formarsi dal tocoferolo anche durante i processi di estrazione [4], potrebbe darsi tuttavia che questo composto non sia un prodotto naturale dell'epatopancreas di *Octopus*.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] A. GHIRETTI-MAGALDI, A. GIUDITTA e F. GHIRETTI, « J. Cell. Comp. Physiol. », 52, 389 (1958); GHIRETTI F., A. GHIRETTI-MAGALDI, e L. TOSI, « J. Gen. Physiol. », 42, 1185 (1959); L. TOSI e F. GHIRETTI, « Arch. Biochem. and Biophys. », 93, 399 (1961);
- [2] R. RUEGG et al. « Helv. Chim. Acta », 42, 2616 (1959); R. L. LESTER e F. L. CRANE, « J. Biol. Chem. », 234, 2169 (1959); P. S. SASTRY, J. JAYARAMAN e T. RAMASARMA, « Nature », 186, 577 (1961); A. T. DIPLOCK et al., « Nature », 186, 554 (1960).
- [3] G. CASERTA e F. GHIRETTI, « Experientia », 293, 1079 (1962); G. CASERTA, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 35, 117 (1963); G. CASERTA e F. GHIRETTI, « Boll. Soc. it. Biol. Sper. », 39, 2072 (1963).
- [4] G. CASERTA, G. NARDI e F. GHIRETTI, « Experientia », 20, 347 (1964).
- [5] R. CRAVEN, « J. Chem. Soc. », 1605 (1931).
- [6] R. L. LESTER e T. RAMASARMA, « J. Biol. Chem. », 234, 672 (1959).
- [7] F. L. CRANE et al., « Biochim. Biophys. Acta », 32, 73 (1959).
- [8] P. KARRER e A. GEIGER, « Helv. Chim. Acta », 23, 455 (1940).
- [9] J. BOUMAN, E. C. SLATER, H. RUDNEY e J. LINKS, « Biochim. Biophys. Acta », 29, 456 (1958).