ATTI

DELLA

SOCIETÀ TOSCANA

DI

SCIENZE NATURALI

RESIDENTE IN PISA

MEMORIE - SERIE A

VOL. LXXX - ANNO 1973

ARTI GRAFICHE PACINI MARIOTTI - PISA - 1973

INDICE

MEMORIE

TARDI A., VITTORINI S. - Le acclività delle vulcaniti del Monte Amiata e i loro rapporti con i caratteri geolitologici . . . . . Pag. 1

CRESCENTI U., GIANNELLI L., MARTINEZ DIAZ C., SALVATORINI G. - Tentativo di correlazione tra i piani Andalusiano e Messiniano . . . . . » 17

CAPORUSSO A. M., GIACOMELLI G. P., LARDICCI L. - (+)(S)-3,4-dimethyl-1-pentyne and (+)(S)-3,4,4-trimethyl-1-pentyne: synthesis and enantiomeric purity . . . . . » 40

FERRARI G. A., MALESANI P. - Micromorphology and mineralogy of some acid brown soils (umbrepts) in the meadows of the Central calcareous Apennine (Abruzzo - Italy) . . . . . » 59

CAVAZZA S. - Su di una stima preliminare delle portate di magra del torrente Pesa . . . . . » 68

BROGINI A. L. - DECANDIA F. A., LAZZAROTTO A. - Studio stratigrafico e micropaleontologico del Cretaceo inferiore della Montagna dei Fiori (Ascoli Piceno - Teramo) . . . . . » 79

CREMONESI G., RADMILLI A. M., TOZZI C. - A proposito del Mesolitico in Italia » 106

TAVANI G. - Ipotesi sulla presenza di grossi frammenti di gneiss e di calcare nella «pietra leccese» della Puglia . . . . . » 121

PATACCA E., RAU A., TONGIORGI M. - Il significato geologico della breccia sedimentaria poligenica al tetto della successione metamorfica dei Monti Pisani . . . . . » 126

CERRINA FERONI A., PATACCA E., PLESI G. - La zona di Lanciaia fra il Cretaceo inferiore e l'Eocene inferiore . . . . . » 162

BESSI C., GRAZZINI M. - Indagine chimica-strutturale di minerali di serpentino: analisi in spettroscopia IR e in microscopia elettronica . . » 188

PELOSI P., GALOPPINI C. - Sulla natura dei composti mercurio-organici nelle foglie di tabacco . . . . . » 215

CECCONI S., RISTORI G. - Minerali argillosi di suoli derivati da diabase sotto differenti condizioni climatiche . . . . . » 221

BIGAZZI G., FORNACA RINALDI G. - Variazioni del contenuto di uranio nei sedimenti carbonatici di precipitazione chimica: possibili implicazioni paleoclimatiche . . . . . » 233

GIUSTI M., LEONI L. - X-ray determination of Ab content in K-feldspars . » 244

NOTINI P. - Stazioni preistoriche all'aperto in Garfagnana (Lucca) . » 249

COSPITO M., ZANELLO P., LUCARINI L. - Applicazione dell'elettrodo di mercurio a gorgogliamento alla voltammetria di ridisciolgimento anodico. Determinazione di zinco, cadmio, piombo e rame in acque naturali e di scarico industriale . . . . . » 266

CASOLI C. - Studi di idrogeologia carsica - 1° Considerazioni sulle diramazioni fossili presso quota —270 m nell'Antro di Corchia (Alpi Apuane - Lucca) . . . . . » 282

Elenco dei soci per l'anno 1973 . . . . . » 305

Norme per la stampa . . . . . » 311

Atti Soc. Tosc. Sci. Nat., Mem., Serie A, **80** (1973),
pagg. 215-220, ff. 2, tabb. 2.

P. PELOSI, C. GALOPPINI (*)

SULLA NATURA DEI COMPOSTI MERCURIO-ORGANICI NELLE FOGLIE DI TABACCO

Riassunto — Vengono riferiti i risultati di una indagine sui composti mercurio-organici presenti in piante di tabacco cresciute in ambiente di vapori di mercurio. La separazione mediante estrazione con acqua e cromatografia su Sephadex G-15 ha fornito una frazione contenente la maggior parte del mercurio e gli amminoacidi cisteina, acido glutammico e glicina in semplici rapporti molari con il mercurio presente. La stessa frazione ottenuta da foglie di piante non trattate con mercurio conteneva solo piccole quantità dei tre amminoacidi.

Abstract — Tobacco plants, grown in the presence of mercury vapours have been shown to accumulate the element in their leaves up to more than 5,000 p.p.m. Separation of the organomercury compounds has been accomplished by water extraction of the lyophilized leaves, followed by gel chromatography on Sephadex G-15. The isolated fraction contained most of the mercury and only three amino acids, cysteine, glutamic acid and glycine in relevant amounts and in simple molar ratios with the mercury present, whereas the corresponding fraction obtained from non mercury treated plants contained only very small amounts of the three amino acids. Further purification and determination of the amino acidic sequence in the organo-mercury complex are in course of study.

1. Nel corso delle nostre ricerche sull'assorbimento del mercurio da parte delle piante erano stati riscontrati livelli eccezionalmente elevati del metallo in piante spontanee e coltivate della zona del Monte Amiata (GALOPPINI C. et Al. [1971, 1972]) ed era stato messo in evidenza come il mercurio veniva assorbito mediante l'apparato fogliare come elemento allo stato di vapore piuttosto che dal terreno attraverso le radici. Successivamente prove condotte in serra su piante di tabacco cresciute in ambiente arricchito di vapori di mercurio avevano mostrato che le piante assorbivano

(*) Istituto di Industrie Agrarie dell'Università di Pisa.
Lavoro eseguito con il contributo del C.N.R.

dosi crescenti del metallo fino a raggiungere una concentrazione di oltre 5.000 p.p.m. sul materiale secco, senza mostrare sintomi di tossicità. L'analisi amminoacidica delle proteine totali presenti nelle foglie di tabacco aveva inoltre messo in evidenza un aumento anormale di cisteina, acido glutammico e glicina parallelamente con il mercurio assorbito e in quantità ad esso direttamente correlabili (ANELLI G. et Al. [1973]).

Nel presente lavoro vengono riferiti i risultati di una serie di ricerche dirette alla separazione ed identificazione dei composti mercurio-organici presenti nelle foglie di tabacco.

2. Piante di *Nicotiana tabacum* var. Kentucky sono state coltivate in due serre di plastica, in una delle quali erano state poste alcune bacinelle contenenti mercurio metallico. Numerosi campioni di foglie sono stati raccolti a vari intervalli di tempo fino ad un massimo di 70 giorni dall'inizio della prova, sia dalle piante trattate con vapori di mercurio sia da quelle non trattate. Le foglie sono state liofilizzate, ridotte in polvere fine e conservate a —20°C. Il livello del mercurio nel campione raccolto al termine della prova era di 5.675 p.p.m., mentre era inferiore a 1 p.p.m. nel campione di controllo (ANELLI G. et Al. [1973]).

L'estrazione dei composti contenenti mercurio dalle foglie di tabacco liofilizzate è stata saggiata con vari solventi organici, ma in nessun caso la quantità di mercurio estratto è risultata superiore allo 0,1%. L'estrazione con tampone citrico-fosfato e con acqua, invece, porta in soluzione oltre il 60% dei composti mercurio-organici presenti, come è riportato nella tabella 1.

TABELLA 1 - *Estrazione dei composti del mercurio dalle foglie di tabacco.*

Solvente	Condizioni	Mercurio estratto %
Etere di petrolio 30-50°C, Etere etilico, Benzene, Cloroformio, Etanolo 95%	12 h in estrattore continuo	<0,1
Etanolo 85%	30' a riflusso	<0,1
Tampone citrico-fosfato, pH 4	agitazione 2 h a temp. ambiente	63
» » » pH 6	id.	67
» » » pH 8	id.	69
Acqua (pH 6,4)	id.	78

Accertato che l'efficacia della estrazione acquosa è superiore a quella effettuata con tutti gli altri solventi saggiati, la preparazione dell'estratto contenente la maggior parte dei composti mercurio-organici è stata eseguita con il seguente procedimento: 1 g di liofilizzato è stato rifluito con 100 ml di etanolo all'85% per 30 minuti, quindi, dopo filtrazione, il residuo è stato agitato con 100 ml di acqua per 5 minuti a temperatura ambiente. La durata ottimale dell'estrazione con acqua è stata determinata in base ad una serie di prove preliminari.

La soluzione acquosa così ottenuta è stata concentrata sotto vuoto a 5 ml e cromatografata su gel di Sephadex. Si è fatto uso di una colonna di cm 2,5 x 60 riempita con Sephadex G-15 «coarse» e di una colonna di cm 2,0 x 60 riempita con Sephadex G-50 «fine». Come eluente è stata adoperata acqua nel caso della G-15 e soluzione di KCl 0,1 M nel caso della G-50. Sono state raccolte frazioni di 5 ml e su ciascuna è stata effettuata l'analisi del mercurio mediante assorbimento atomico senza fiamma (LINSTEDT G. [1970]). La separazione su G-15 dei composti contenenti mercurio, riportata in figura 1a, ha dato tre picchi distinti, ma la maggior parte del mercurio è presente nel primo picco con il massimo a 100 ml di eluito, molto vicino al limite superiore di esclusione della colonna. Le frazioni relative al primo picco della G-15 sono state cromatografate su G-50 (figura 2) e hanno dato di nuovo un unico picco con il massimo a 150 ml di eluito, lontano dal limite superiore di esclusione della colonna, ciò indicando che la maggior parte dei composti mercurio-organici solubili in acqua è costituita da sostanze a peso molecolare simile e relativamente basso. Allo scopo di valutare l'ordine di grandezza del peso molecolare, la colonna G-15 è stata tarata con citocromo C, glutatione ossidato (G-S-S-G), glutatione ridotto (G-SH), acido glutammico (Glu) e cisteina (Cys), nonché con complessi glutatione-mercurio (G-S-Hg-S-G) e cisteina-mercurio (Cys-S-Hg-S-Cys). I volumi di eluizione, rispetto al peso molecolare in scala logaritmica, sono riportati in figura 1.

Il peso molecolare approssimato delle sostanze contenenti mercurio presenti nel primo picco è compreso tra 1.500 e 2.000, nella ipotesi che si tratti di composti di natura amminoacidica, come è suggerito dai risultati delle precedenti ricerche.

L'estratto acquoso da 1 g di liofilizzato è stato trattato con mg 10 di cisteina ed eluito successivamente su colonna G-15 allo scopo di avere un'indicazione sulla natura dei legami mercurio-organici. In queste condizioni si è ottenuto un nuovo picco a 200 ml di eluito

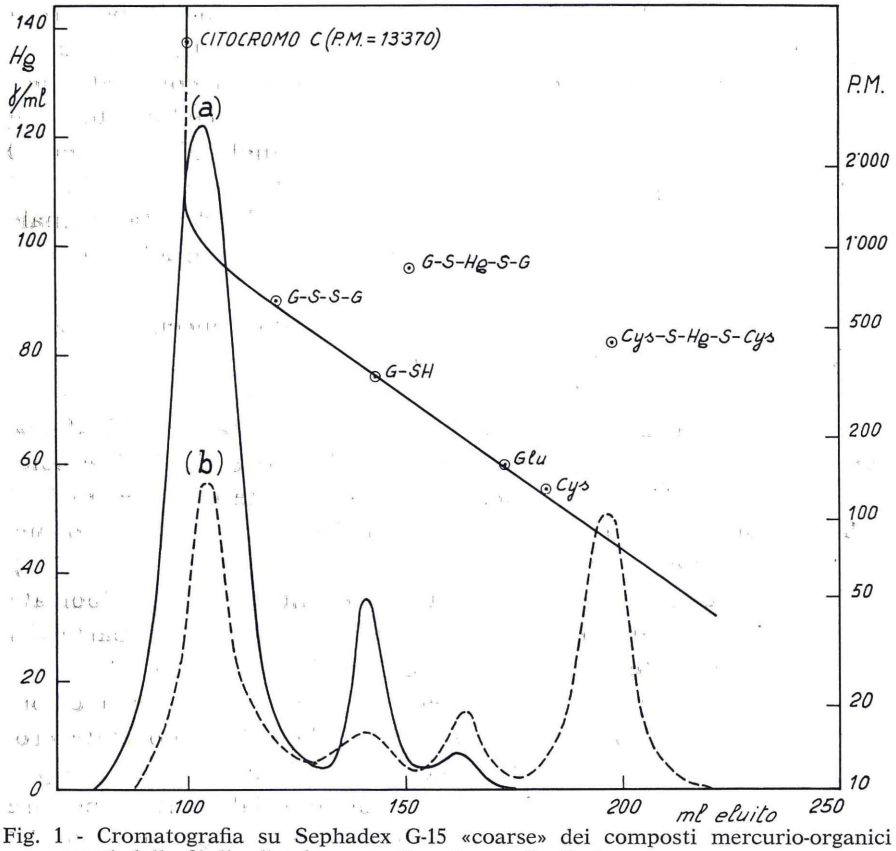

Fig. 1 - Cromatografia su Sephadex G-15 «coarse» dei composti mercurio-organici estratti dalle foglie di tabacco e di sostanze di riferimento.
a) estratto acquoso da 1 g di liofilizzato
b) idem con aggiunta di mg 10 di cisteina.

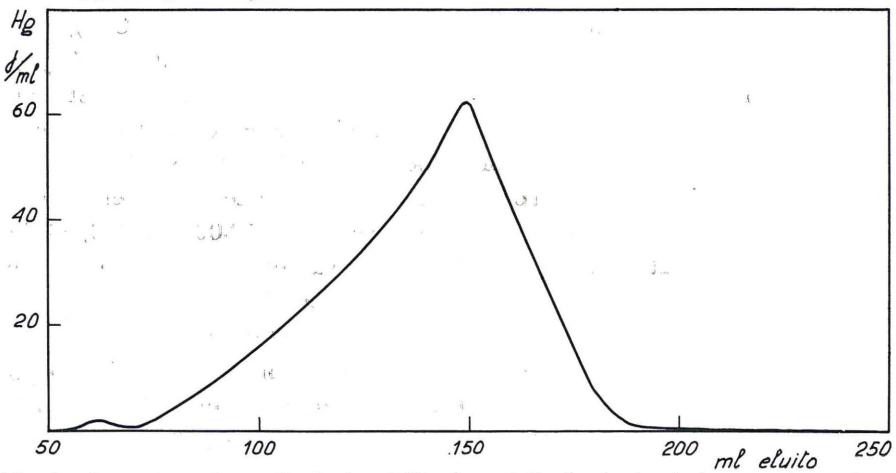

Fig. 2 - Cromatografia su Sephadex G-50 «fine» delle frazioni relative al primo picco della G-15.

(fig. 1b) corrispondente esattamente alla posizione del complesso cisteina-mercurio. Ciò lascia presumere che i legami dei composti mercurio-organici idrosolubili presenti nella pianta siano più deboli di quelli formati dal mercurio con la cisteina, anche se verosimilmente in ambedue i casi il mercurio è legato ai gruppi sulfidrilici della cisteina.

Le frazioni del primo picco separate per cromatografia su Sephadex G-15, corrispondenti ai volumi di eluito da 90 a 130 ml, sono state riunite e utilizzate per la determinazione della composizione amminoacidica. L'analisi è stata effettuata con Aminolyzer Optica previa ossidazione della cisteina ad acido cisteico (MOORE S. [1963]) e idrolisi della miscela con HCl 6 N a 110°C per 24 ore in fiala chiusa. Analogamente si è operato sulle foglie di tabacco di controllo senza mercurio. I risultati, raccolti nella tabella 2, mostrano che la cisteina, l'acido glutammico e la glicina sono i tre amminoacidi presenti in notevole quantità nel campione contenente mercurio.

TABELLA 2 - *Composizione amminoacidica delle frazioni da 90 a 130 ml di eluito separate per cromatografia su Sephadex G-15.*

Amminoacidi	Campione con Hg μ moli/g	Campione senza Hg μ moli/g
Cisteina	86,2	4,7
Acido glutammico	87,5	4,8
Glicina	30,7	4,8
Mercurio	15,0	0,0

Infatti la cisteina, l'acido glutammico e la glicina sono rispettivamente pari a 86,2 87,5 e 30,7 μ moli per grammo del campione di partenza, mentre nel campione di controllo tali amminoacidi sono presenti solo in piccola quantità (4,7-4,8 μ moli/g). Altri amminoacidi (ac. aspartico, serina, alanina) sono presenti in tracce e in totale non superano 2-3 μ moli/g. I campioni analizzati prima dell'idrolisi non contenevano amminoacidi liberi. Pertanto il risultato dell'analisi dei peptidi presenti nella prima frazione separata per cromatografia su Sephadex G-15 suggerisce che la cisteina, l'acido glutammico e la glicina debbono far parte dei composti mercurio-organici presenti nelle foglie di tabacco.

In base ai valori riportati nella tabella 2, i rapporti molari della cisteina, dell'acido glutammico e della glicina con il mercurio, possono essere espressi con buona approssimazione dai numeri interi 6, 6 e 2. Tali rapporti numerici sono stati confermati anche nel complesso mercurio-organico isolato per cromatografia su Sephadex G-15 da tre campioni di foglie di tabacco raccolte durante il trattamento con vapori di mercurio e contenenti 3.400, 4.325 e 4.820 p.p.m. del metallo. Anche il peso molecolare di un complesso di formula bruta $Hg(Cys)_6(Glu)_6(Gly)_2$ è in accordo con il valore indicato dalla cromatografia su Sephadex G-15.

La frazione separata per cromatografia su Sephadex G-15 contenente il complesso mercurio-organico idrosolubile estratto dalle foglie di tabacco è colorata in bruno e contiene ancora circa il 40% di sostanze di natura non ammino acidica. Non si può escludere che tali sostanze facciano parte del complesso mercurio-organico. Sono in corso ricerche dirette a purificare ulteriormente il complesso mercurio-organico e a stabilire la sequenza dei peptidi legati con il mercurio.

OPERE CITATE

ANELLI G., PELOSI P., GALOPPINI C. (1973) - Influence of mercury on the amino acidic composition of tobacco leaves. *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1579-1582.

GALOPPINI C., LOTTI G., PELOSI P. (1971) - Il mercurio nelle piante del Monte Amiata. *Agr. Ital.*, **26**, 302-309.

GALOPPINI C., PELOSI P. (1972) - Ulteriori indagini sulla distribuzione del mercurio nelle piante del Monte Amiata. *Agr. Ital.*, **27**, 29-33.

LINSTEDT G. (1970) - A rapid method for the determination of mercury in urine. *Analyst*, **95**, 264-271.

MOORE S. (1963) - On the determination of cystine as cysteic acid. *J. Biol. Chem.*, **238**, 235-237.

(*ms. pres. il 14 giugno 1973; ult. bozze il 10 dicembre 1973*)