

Corso di Laurea triennale in sicurezza igienico-sanitaria

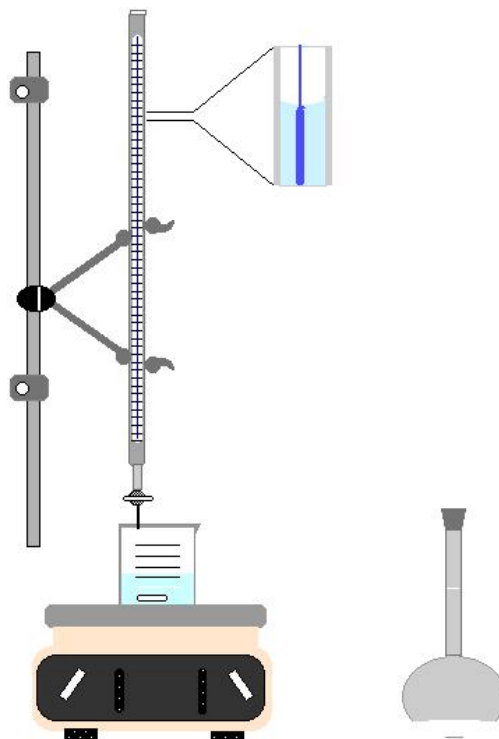
Nome:, Cognome:, matricola:

Esperienza di laboratorio di Chimica Generale e Fondamenti di Biochimica

Titolazione Acido base

Una titolazione acido-base consiste nel determinare la concentrazione di un campione di volume noto detto titolato (una soluzione di un acido o di una base di titolo incognito) misurando il volume di titolante (una soluzione di una base o di un acido di titolo noto) necessario per reagire stechiometricamente col campione in esame. Il raggiungimento dell'equivalenza stechiometrica ovvero il punto di equivalenza, corrisponde al volume di titolante per il quale il numero di moli di titolante e titolato si equivalgono. Esso si evidenzia con una variazione netta di pH seguita con pHmetro (punto di flesso di un andamento sigmoidale) o con il viraggio di un opportuno indicatore.

Schema: buretta, pinza a ragno, pipetta tarata a singola e doppia tacca, beaker, matraccio.



Titolazione di una soluzione di aceto

L'aceto è una soluzione acquosa contenente il 4-6% di acido acetico e altre sostanze organiche e inorganiche presenti in piccole quantità. Per grado di acidità s'intende il numero di grammi di CH_3COOH contenuto in 100 ml di aceto. Sebbene l'acidità del campione derivi anche dalla presenza di acidi diversi dall'acido acetico, viene tuttavia espressa come acido acetico, che è l'acido principale. La determinazione del contenuto di acido viene effettuata titolando con NaOH a titolo noto un campione diluito di aceto.

Benché l'aceto sia colorato (in particolare quello di vino rosso), la diluizione richiesta dal procedimento analitico attenua a tal punto il colore da non avere interferenze nel viraggio dell'indicatore.

Si supponga, ad es., di voler controllare il grado di acidità di un aceto dichiarato al 6%, cioè circa 1 M, usando come titolante una soluzione di NaOH 0.1 M. Volendo consumare circa 40 ml di soluzione 0.1 M di NaOH bisognerà prelevare 4 ml di aceto al 6%. Non è opportuno ricorrere a volumi piccoli poiché si commettono errori più elevati nella loro misura. A titolo di esempio, un prelievo effettuato con la buretta i decimi di ml vengono letti con certezza mentre sono incerti i centesimi. Ad es., per un prelievo di 4 ml l'errore di lettura vale: $0,01/4 * 100 = 0,25\%$. Se il prelievo è di 40 ml l'errore percentuale diventa 0,025%.

Verrà consegnato un matraccio da 100 mL di aceto commerciale diluito 1 a 10

Questa diluizione è già stata fatta dal personale tecnico.

Materiali e reagenti:

Buretta da 25 o 50 mL – pinza a ragno - aceto commerciale - Idrossido di sodio sol. 0.1 M – pHmetro/Fenolftaleina sol. alcolica 1 % - Vetreria- agitatore magnetico.

Esecuzione dell'esperienza:

Metodo 1

Il procedimento dell'esperienza può essere suddiviso in due parti, la prima consistente nelle operazioni di taratura del pH-metro e la seconda nella vera e propria titolazione. Le operazioni iniziali riguardano esclusivamente lo strumento e consistono nella pulizia dell'elettrodo, che si trova immerso in una soluzione di stoccaggio a base di KCl con funzione di stabilizzazione della membrana costituente l'elettrodo. La pulizia deve essere eseguita con acqua distillata e tamponamento con carta assorbente, evitando di strofinare la membrana per non causare sovratensioni. La taratura viene effettuata dopo aver impostato la temperatura della soluzione, ponendo dapprima l'elettrodo nella soluzione con pH 7 e impostando la lettura come primo valore di taratura (*slope*). Solo dopo una nuova pulizia, l'elettrodo è stato posto nella soluzione a pH 4. Quest'ultima lettura è stata impostata come secondo valore di taratura (*offset*) e lo strumento ha così memorizzato due termini noti attraverso i quali può "costruirsi" una retta di taratura.

Si preleva, mediante pipetta tarata, un campione di 25 mL di aceto di una soluzione di aceto commerciale diluita in rapporto 1 : 10. Si riempie la buretta con la soluzione 0.1 M di idrossido di sodio; si raggiunge la tacca corrispondente allo 0 o un altro volume, è bene annotare il punto da cui si parte. Si procede alla titolazione, facendo defluire la soluzione goccia a goccia, agitando il liquido (con ancoretta magnetica nel beaker).

Viene registrato il valore di pH per ogni aggiunta di NaOH ed i valori vengono riportati in una tabella e su carta millimetrata. Successivamente verrà costruito il grafico al computer del pH in funzione delle aggiunte di titolante. Dal grafico si dovrà ottenere un andamento sigmoidale, dovrà evidenziarsi un punto di flesso corrispondente alla formazione dello ione acetato. E' inoltre possibile, facendo la derivata prima del sigmoide individuare un massimo corrispondente al punto di equivalenza, in questo modo sarà più facile e precisa l'individuazione del punto di equivalenza.

Note:

Metodo 2

Si preleva, mediante pipetta tarata, un campione di 25 mL di aceto di una soluzione di aceto commerciale diluita in rapporto 1 : 10. Si aggiungono 3 o 4 gocce di fenolftaleina sol. 1 % quale indicatore; la soluzione resta incolore perché siamo in ambiente acido. Si riempie la buretta con la soluzione 0.1 M di idrossido di sodio; si raggiunge la tacca corrispondente allo 0 o un altro volume, è bene annotare il punto da cui si parte.

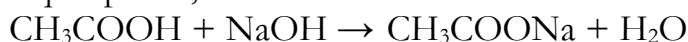
Si procede alla titolazione, facendo defluire la soluzione goccia a goccia, agitando il liquido (con ancoretta magnetica nel beaker). Al punto di viraggio dell'indicatore (appena si colora stabilmente di rosa pallido) si chiude il rubinetto della buretta e si annota la quantità di soluzione titolante (in mL) consumata.

Si ripete e si fa media dei volumi.

Note:

Esempio di calcolo

Titolante consumato da 0 a 25 mL, tutto l'acido acetico presente nell'aceto di vino è stato, a quel punto, neutralizzato dall'idrossido di sodio secondo la reazione:



Secondo tale reazione una mole di CH_3COOH viene neutralizzata da una mole di NaOH . Al punto di equivalenza, segnalato dal viraggio dell'indicatore o determinato graficamente, il numero di moli presenti nella quantità di idrossido di sodio consumato è uguale al numero di moli di acido acetico presente nei 25 mL di aceto diluito prelevato.

Supponendo di aver impiegato 25 mL di NaOH sol. 0.1 M per titolare il campione di 100 mL di soluzione di acido acetico diluita, calcoliamo le moli presenti nei 25 mL di soluzione 0.1 M. Nota la formula $n \text{ moli} = M \cdot V$ (M = molarità, V = volume **in litri**) si ha:

$$n \text{ moli} = 0.1 \cdot 0.025 = 0.0025$$

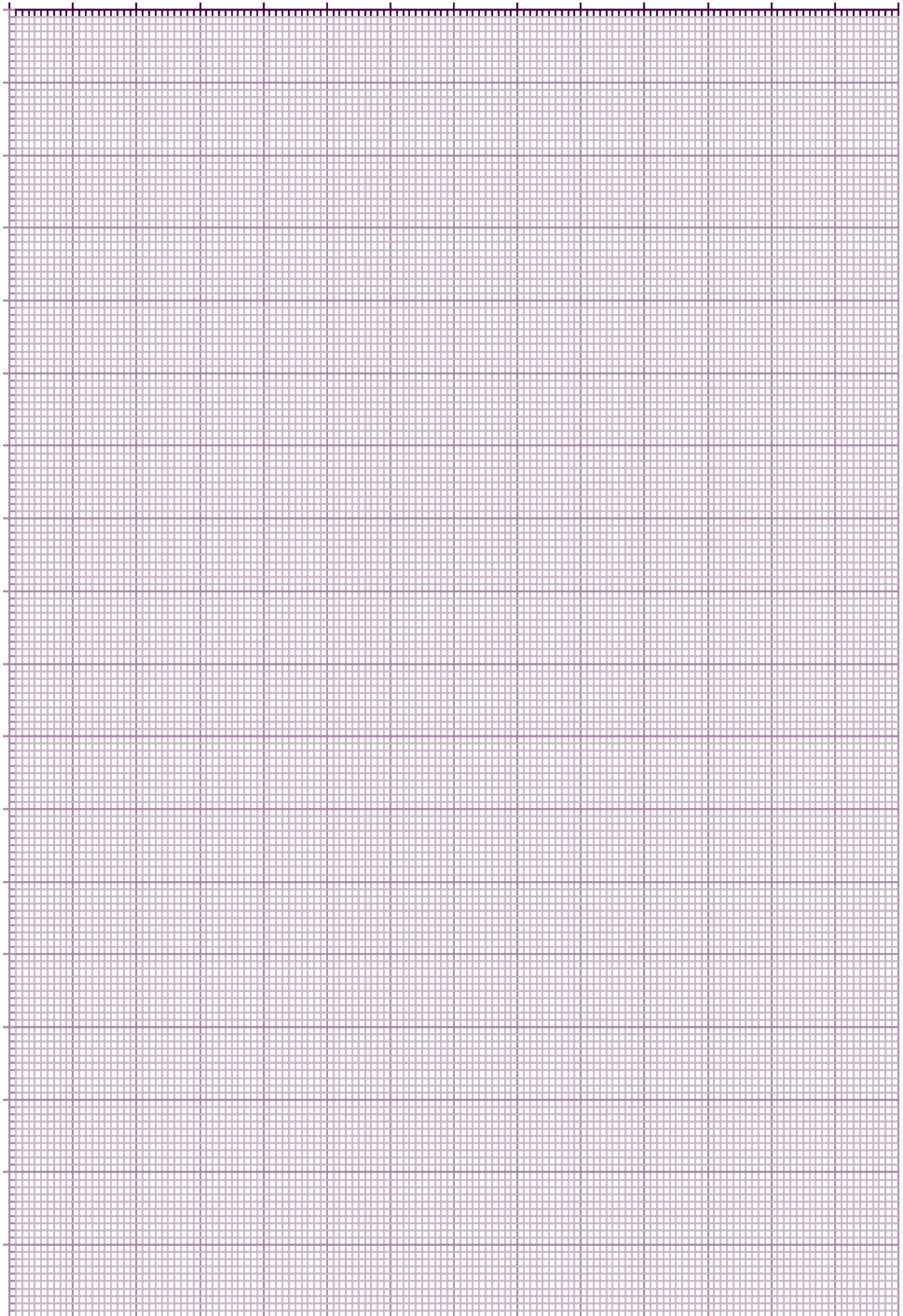
Ovvero, 0.0025 moli di NaOH nei 25 mL di soluzione 0.1 M.

Per definizione questo numero corrisponde al numero di moli di CH_3COOH presenti nei 25 mL di aceto diluito in analisi. Da questo valore si può quindi risalire al titolo in molarità dell'acido acetico diluito. Poiché l'acido acetico era stato diluito 1 :10, il titolo di quello commerciale è 10 volte maggiore.

Supponendo, a questo punto, che la soluzione di acido acetico commerciale abbia titolo 1 M è possibile trasformare il valore da concentrazione molare in concentrazione in g/L moltiplicando la molarità espressa in moli/l per la massa molecolare relativa dell'acido acetico (circa 60) in grammi:

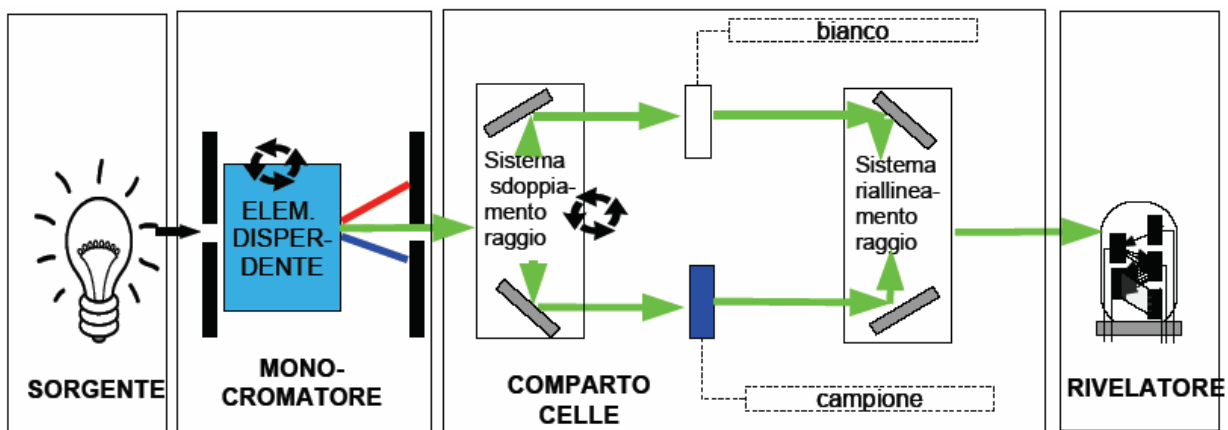
$$1 \text{ moli/L} \cdot 60 \text{ g} = 60 \text{ g/L}$$

Nel caso specifico, essendo la densità di CH_3COOH ca. = 1, la concentrazione in peso/peso è di 60 g/1000 g cioè del 60 ‰, ovvero il 6 % p/p atteso.



Gli strumenti usati per misurare l'assorbimento di radiazioni da parte di soluzioni sono detti **spettrofotometri**. In linea di principio uno spettrofotometro è costituito da:

- una sorgente, cioè una lampada che emette radiazioni nell'intervallo spettrale di misura
- un monocromatore, che seleziona le lunghezze d'onda in arrivo dalla sorgente
- un compartimento celle o cuvette, in cui è posto il campione
- un rivelatore, che misura l'intensità della radiazione
- un elaboratore dati che fornisce i valori delle misure di assorbimento.



Spettrofotometro a doppio raggio.

Il raggio proveniente dal monocromatore di intensità I_0 (l'intensità è il numero di fotoni che incidono sul campione nell'unità di tempo) passando attraverso la cuvetta con il campione emergerà da esso con una intensità $I < I_0$, in quanto una parte della radiazione incidente è stata assorbita.

Si definisce **trasmissione** e si indica con T il rapporto:

$$T = I/I_0$$

Si definisce **assorbimento** e si indica con A:

$$A = -\log T$$

Sostituendo a T la sua espressione si ricava che:

$$A = \log I_0/I$$

SPETTRO DI ASSORBIMENTO

La misura da parte dello strumento dell'assorbimento al variare della lunghezza d'onda porta ad un grafico che si chiama spettro di assorbimento. L'assorbimento di radiazioni di energia opportuna è associato con transizioni specifiche di elettroni di valenza nella molecola (da orbitali di legame e di non legame a orbitali di antilegame). Dato che i livelli sono quantizzati, sembrerebbe ovvio

aspettarsi che solo la radiazione di lunghezza d'onda corrispondente al ΔE tra i due livelli sia assorbita e che lo spettro di assorbimento sia costituito da linee o righe di larghezza infinitesima. In realtà lo spettro di assorbimento si presenta con la forma di una banda, dovuta a interazioni tra lo stato eccitato e l'ambiente (es. il solvente): inoltre poiché ad ogni stato elettronico sono associati numerosi livelli vibrazionali, quando la molecola passa dallo stato elettronico fondamentale ad uno eccitato, in realtà si promuovono anche transizioni dai livelli vibrazionali associati al livello elettronico fondamentale, ai livelli vibrazionali associati al livello elettronico eccitato. Dal momento che lo spettrofotometro non è capace di discriminare a sufficienza fra i diversi tipi di transizione, lo spettro di assorbimento è l'insieme di tutti gli assorbimenti che accompagnano la transizione elettronica ed assume la forma di una banda allargata.

LEGGE DI LAMBERT-BEER

Per una radiazione monocromatica, l'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione della specie assorbente. Infatti, se una radiazione di una certa frequenza è assorbita da una molecola, più numerose sono le molecole, maggiore sarà l'assorbimento della radiazione di quella frequenza.

Nello spettrofotometro il campione è contenuto in una cella (o cuvetta) di dimensioni accuratamente note. La distanza percorsa dalla radiazione attraverso la cella è detta *cammino ottico* (L).

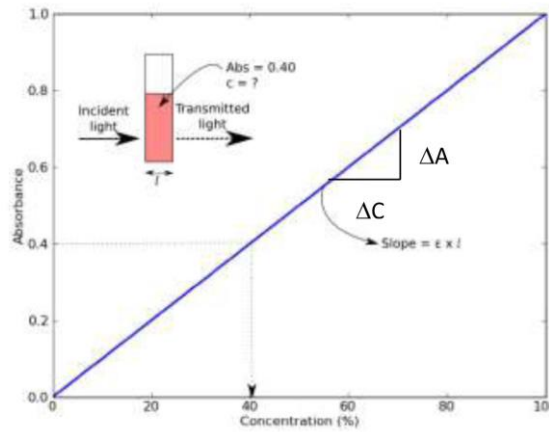
Pertanto, l'assorbanza è direttamente proporzionale sia alla concentrazione della specie assorbente (c) sia al cammino ottico (L) secondo la seguente relazione:

$$A = \log I_0/I = \epsilon c L$$

ϵ è il coefficiente di estinzione molare e la sua unità di misura dipende da quelle di c e di L . Così, dato che l'assorbanza è adimensionale, se "c" è la concentrazione molare di specie assorbente ed "L" è espresso in cm, l'unità di misura di ϵ è $M^{-1} cm^{-1}$. Il coefficiente di estinzione molare è una proprietà della specie chimica che assorbe e non dipende dalla concentrazione ma dipende invece dalla lunghezza d'onda della radiazione assorbita.

Sulla base di quanto detto finora, gli spettri di assorbimento di soluzioni di una stessa sostanza in concentrazioni diverse avranno la medesima forma e posizione ma i valori di assorbanza saranno crescenti all'aumentare della concentrazione della specie assorbente.

Fissato un valore di lunghezza d'onda, la legge di Lambert Beer afferma che c'è una relazione lineare tra A e c . Perciò se si graficano i valori di assorbanza misurati alla stessa lunghezza d'onda in funzione della concentrazione di sostanza che li ha determinati si ottiene una retta passante per l'origine degli assi (in assenza di sostanza assorbente, l'assorbanza è nulla).



$$Y = m X$$

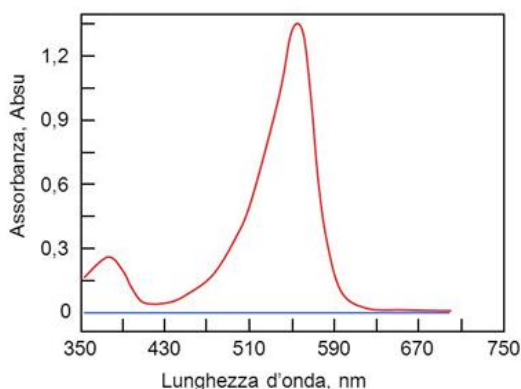
$$A = \epsilon L c$$

Dal confronto tra le due equazioni si vede che la pendenza della retta $m = \epsilon L$ e dato che il cammino ottico è solitamente pari a 1 cm, m fornisce il valore numerico di ϵ a quella lunghezza d'onda. Una volta noto ϵ , è possibile determinare la concentrazione incognita di una soluzione di quella sostanza da una semplice misura di assorbanza.

ESPERIENZA DI LABORATORIO 1

CALCOLARE IL COEFFICIENTE DI ESTINZIONE MOLARE DELLA FENOLFTALEINA IN AMBIENTE BASICO PARTENDO DA SUE SOLUZIONI A TITOLO NOTO E UTILIZZANDO LA LEGGE DI LAMBERT-BEER

Spettro di assorbimento della fenolftaleina 10mg/l
In condizioni acide (-----) e basiche (-----)



La Fenolftaleina, noto indicatore acido-base, ha un colore rosa intenso in ambiente basico. Naturalmente, è necessario che in tutte le soluzioni che si devono preparare l'ambiente sia basico; ciò garantisce che il colore e quindi lo spettro di assorbimento non cambino.

Materiali e strumenti:

- Spettrofotometro UV-Visibile
- Cuvetta di quarzo (vicino allo strumento; lavare con spruzzetta con etanolo alla fine delle misure del proprio gruppo)

Sul bancone:

- Soluzione madre di Fenolftaleina 5×10^{-4} M (tubo falcon da 15mL) da diluire secondo tabella con miscela acqua/etanolo
- 5 tubi eppendorf da 2mL
- Micropipette P1000 e P100 con relativi puntali
- Miscela acqua/etanolo 1:1 (tubo falcon da 50mL)
- Soluzione di NaOH 0.1M (bicchierino sul bancone)

Procedimento:

- Tenendo presente che le moli di fenolftaleina prelevate sono date dal prodotto: $M_{iniziale} * V_{iniziale}$. dato che le moli di fenolftaleina prelevate sono esattamente quelle presenti nella soluzione diluita si può scrivere la seguente uguaglianza:

$$M_{iniziale} * V_{iniziale} = M_{finale} * V_{finale}$$

Da qui si può calcolare M_{finale} di ciascuna diluizione di Fenolftaleina. Scrivere le concentrazioni così calcolate nella seguente tabella.

Soluzione	Volume di soluzione 5×10^{-4} M da prelevare (V_{iniziale})	Volume di H ₂ O/EtOH	Concentrazione (M_{finale})	Assorbanza Misurata (A)
B	0 ml	2 mL		
1	0.1 ml	1.9 mL		
2	0.2 ml	1.8 mL		
3	0.4 ml	1.6 mL		
4	0.8 ml	1.2 mL		

- Preparare i cinque campioni in tubi eppendorf da 2mL: un bianco (con solo H₂O/EtOH) e le quattro soluzioni diluite di Fenolftaleina utilizzando la soluzione madre 5×10^{-4} M (M_{iniziale}) di Fenolftaleina come soluzione concentrata di partenza e seguendo le istruzioni contenute nella tabella. Prelevare con una micropipetta adatta il volume di soluzione madre indicato, trasferirlo nell'eppendorf e portare a volume con miscela acqua/etanolo (H₂O/EtOH). NB potete anche mettere prima l'H₂O/EtOH e poi la fenolftaleina concentrata.

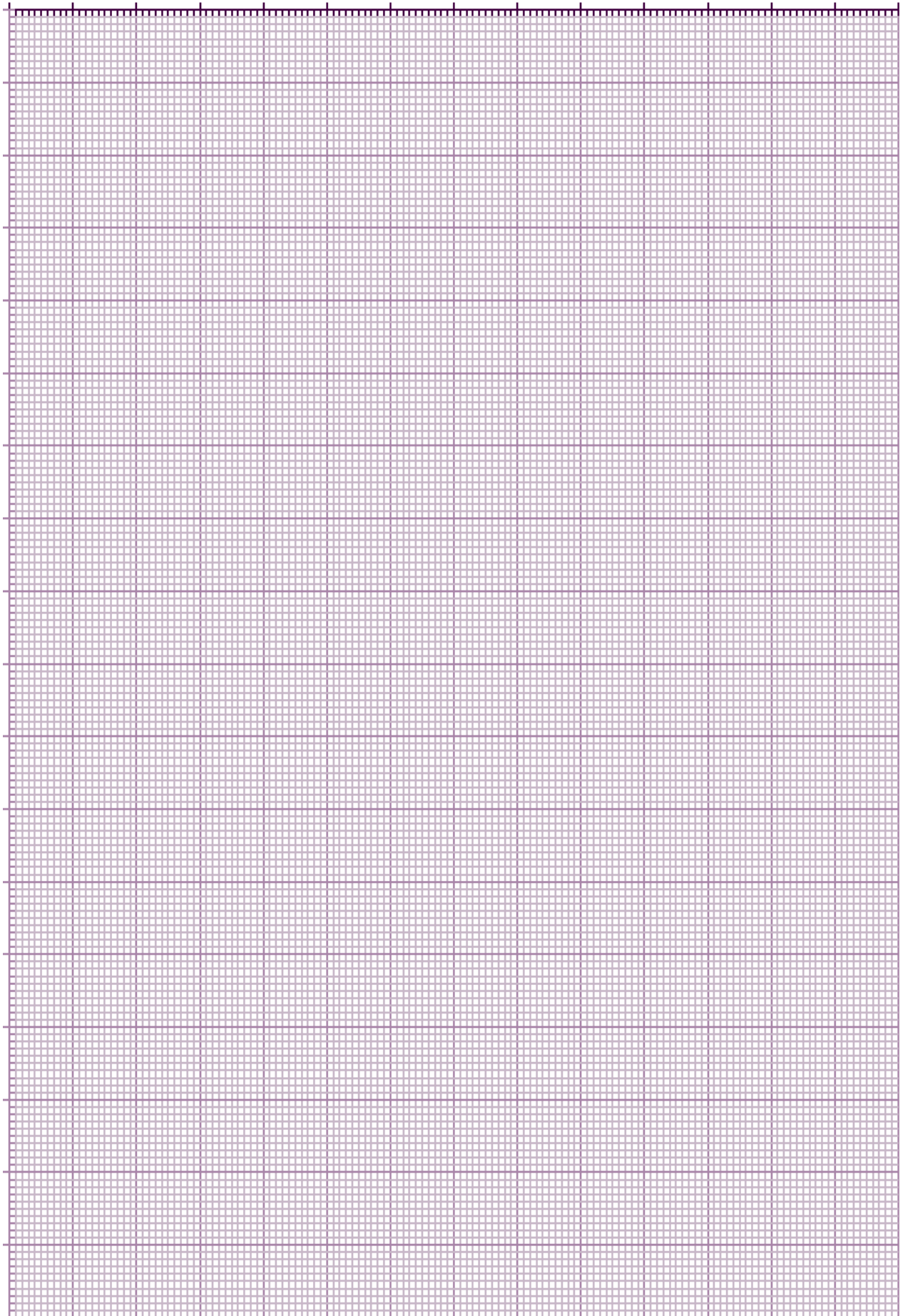
- Dato che la Fenolftaleina è colorata in soluzione basica, si aggiungano ad ogni soluzione 30 μ L di NaOH 0.1 M (NON VANNO CONSIDERATI NEL V_{finale}). Mescolare bene la soluzione invertendo l'eppendorf più volte.

- Spostarsi nella stanza strumenti con i campioni e trasferire nella cuvetta di quarzo tutto il contenuto di ciascuna eppendorf usando la micropipetta P1000. Iniziare con la soluzione B e fare il bianco allo spettrofotometro. NB non serve lavare la cuvetta tra campione e campione se si parte dal meno concentrato.

- Partendo dalla soluzione di Fenolftaleina meno concentrata misurare lo spettro di assorbimento (tra 300 e 600 nm, già impostato) di tutte le altre soluzioni (premere tasto play ricordando di chiudere lo sportello del compartimento cuvette prima di ogni misura). Dallo spettro ottenuto individuare a quale lunghezza d'onda si ha il massimo di assorbimento (contrassegnato da una bandierina dove appaiono due numeri: il primo è la lunghezza d'onda, il secondo è l'Assorbanza). Riportare in tabella i valori di A (e la lunghezza d'onda) del picco di volta in volta ottenuti. NB alla successiva misura i valori vengono sovrascritti, quindi registrarli subito!

- Usando i valori di concentrazione e A della tabella disegnare un grafico su carta millimetrata (o al computer usando il file Excell su Moodle): valori di assorbanza (asse Y) in funzione delle concentrazioni delle soluzioni (asse X).

- Dato che la legge di Lambert-Beer prevede proporzionalità diretta tra A e concentrazione, se si è operato in modo accurato e preciso si ottiene una retta passante per l'origine. Si trovi l'equazione della retta e si determini il valore di ϵ , sapendo che le cuvette che stiamo usando hanno un cammino ottico (L) di 1cm. Un calcolo pratico può essere fatto conoscendo assorbanza e concentrazione di due punti della retta (dove si evidenzia linearità della retta). La pendenza della retta si otterrà dal rapporto tra la differenza dei valori di assorbanza (ΔA) e la differenza dei valori di concentrazione (ΔC). La pendenza della retta corrisponderà al coefficiente di estinzione molare per quella lunghezza d'onda e per un cammino ottico di 1 cm.



ESPERIENZA DI LABORATORIO 2

CALCOLARE LA CONCENTRAZIONE PROTEICA DI UN CAMPIONE IGNOTO UTILIZZANDO IL METODO INDIRETTO DI BRADFORD

Il metodo di Bradford si basa sull'azione del colorante Coomassie brilliant blue G250 che, nella sua forma anionica, si lega specificamente ad amminoacidi basici formando un complesso con A massima a 595nm (blu). Nella sua forma cationica, invece, il Coomassie ha un massimo di A a 470nm (marroncino). Nel metodo di Bradford il Coomassie Brilliant Blue G-250 è sciolto in una soluzione contenente etanolo e acido fosforico. Quando si aggiunge la proteina, il colorante reagisce con i gruppi ionizzabili della proteina; la proteina perde la sua conformazione nativa ed espone le sue parti idrofobiche che possono anch'esse interagire con le parti apolari del colorante. Questa interazione favorisce la formazione di legami ionici tra i gruppi amminici della proteina, carichi positivamente, e i gruppi anionici del colorante, che è così stabilizzato nella forma anionica. È la forma anionica (BLU) del colorante, stabilizzata dalla interazione con la proteina, che viene misurata nel saggio spettrofotometrico.

Materiali e strumenti:

- Spettrofotometro UV-Visibile
- Cuvette di plastica usa e getta

Sul bancone:

- Soluzione madre di BSA 0.1mg/mL.
- Tubi eppendorf da 1.5mL
- Micropipette P1000 e P100 con relativi puntali
- Acqua deionizzata (tubo falcon da 50mL)
- Miscela di Bradford (tubo falcon da 50mL coperto da stagnola)
- Campione proteico a concentrazione incognita (tubo eppendorf da 1.5mL contrassegnato con X)

Procedimento:

-Numerare le provette da 1.5mL (B, 1-6, S1, S2).

-Allestire una retta di taratura con BSA preparando le soluzioni a concentrazione nota crescente (da 0 a 10 µg) di proteina standard (BSA, bovine serum albumin). Per velocizzare le misure allo spettrofotometro preparare anche i due campioni a concentrazione incognita S1 ed S2.

-Usare i volumi riportati in tabella (con le micropipette). Per l'allestimento dei campioni per la retta di taratura si utilizzano: una soluzione di BSA a concentrazione nota (0.1 µg/µL) e H₂O. Il

campione contenente 0 μg di BSA è il bianco (B) della misura. Per i campioni S1 ed S2 usare la soluzione contrassegnata con X e H_2O .

-Aggiungere ad ogni campione 0.9 mL di reagente Bradford (Brilliant Blue G + acido fosforico + etanolo) e mescolare bene. Aspettare 5 min che la reazione avvenga.

-Trasferire in una cuvetta di plastica (si può usare la stessa cuvetta per la retta di taratura) tutto il contenuto di ciascuna eppendorf usando la micropipetta P1000 partendo con B. Recuperare il liquido alla fine della lettura

AZZERARE CON IL B, quindi procedere con la lettura dei valori netti di Assorbanza a 595nm di ciascun campione entro 30 minuti dall'inizio della reazione.

-Cambiare cuvetta e fare la lettura dei due campioni S1 ed S2.

Provetta	BSA (μg)	Volume soluzione BSA 0.1mg/mL	Volume H_2O	Miscela Bradford	Assorbanza a $\lambda 595\text{nm}$
B	0	0	100 μL	0.9 mL	
1	1 μg	10 μL	90 μL	0.9 mL	
2	2 μg	20 μL	80 μL	0.9 mL	
3	4 μg	40 μL	60 μL	0.9 mL	
4	6 μg	60 μL	40 μL	0.9 mL	
5	8 μg	80 μL	20 μL	0.9 mL	
6	10 μg	100 μL	0 μL	0.9 mL	
	(μg)?	Soluzione FBS a concentrazione incognita (X)			
S1		10 μL	90 μL	0.9 mL	
S2		20 μL	80 μL	0.9 mL	

-Allestire la curva di taratura con le coppie di valori: X = μg proteina BSA; Y = assorbanza netta a 595 nm usando la carta millimetrata o al computer usando il file Excell su Moodle.

-Usando la pendenza della retta di calibrazione ottenuta con la BSA a concentrazioni note, calcolare la concentrazione in $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ delle proteine presenti nel campione incognito. Quindi, sostituendo i valori ottenuti nei campioni incogniti all'equazione $Y=mX$, troviamo i μg presenti in ciascun campione. Dividiamo i μg per i μL di campioni usati in ciascuna reazione e facciamo la media dei due risultati ottenuti.

