

Laboratorio di Biochimica

Modulo del Corso di “Laboratorio di Chimica e Biochimica”

Laurea in Scienze e Tecnologie Biologiche
a.a. 2020-2021



Esperienze di laboratorio

(ciascuna esperienza avrà la durata di 3 ore)

Esperienza 1:

Docente: prof. **Alessandro Tossi**

1. Introduzione al laboratorio di biochimica:

- Attrezzature e strumentazioni. Sicurezza nel lab. biochimico.
- Preparazione di soluzioni. Concentrazione. Diluizioni seriali.

2. Soluzioni tampone e pH.

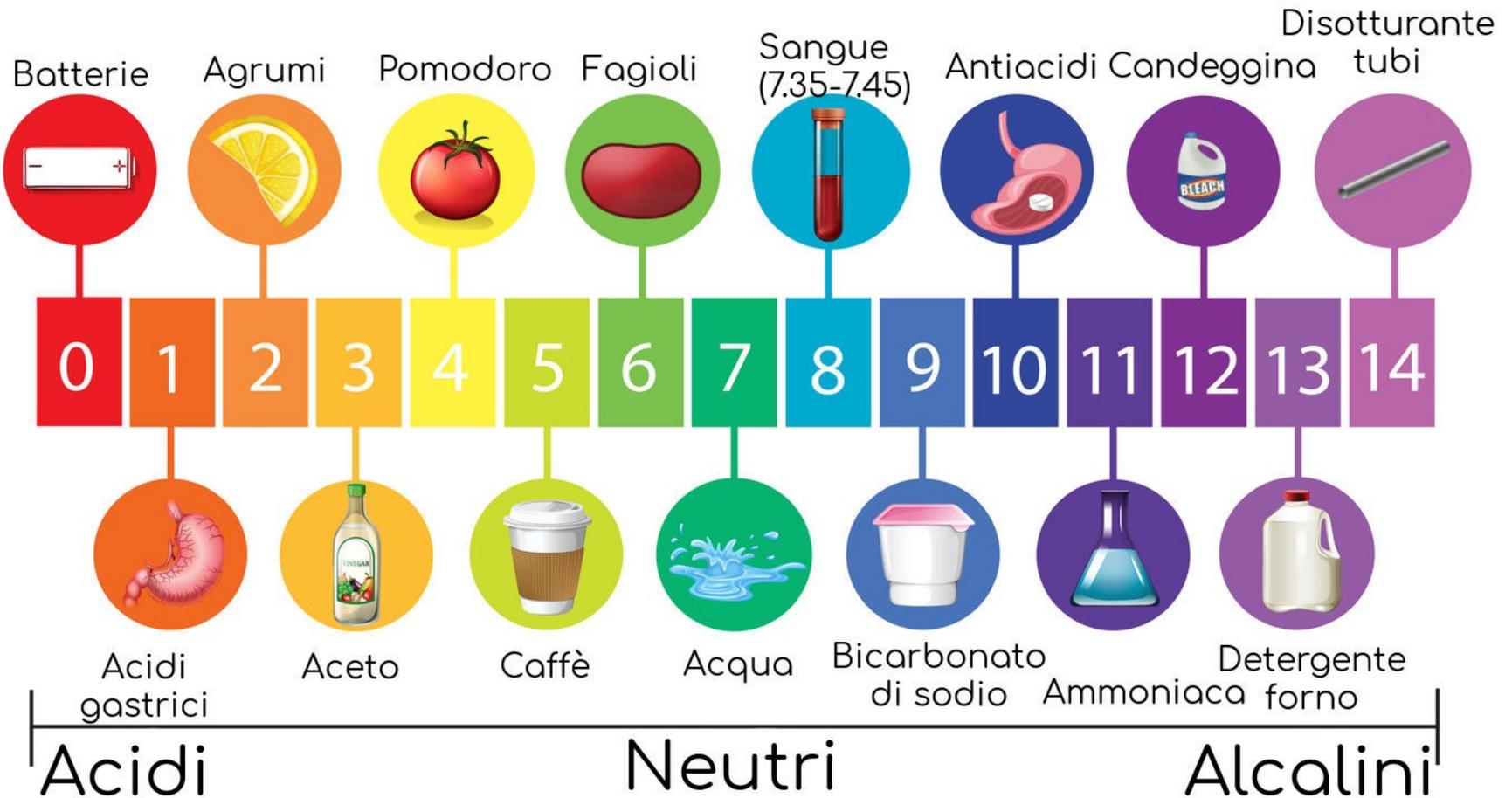
pH e soluzioni tampone

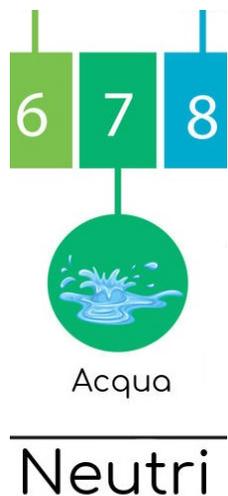


La scala del pH – Forza degli acidi e delle basi – L'importanza del pH per il funzionamento degli enzimi – pH di una soluzione tampone – scelta e preparazione di un sistema tampone – Esempi di tamponi – Utilizzo del pHmetro

La scala del pH

Valori indicativi





pH =7 pH NEUTRO – COME DERIVA?



$$K_c = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+] [\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]^2} = 3,264 \times 10^{-18}$$

- La tendenza dell'acqua alla dissociazione è ridotta (solo 1 molecola ogni 555.000.000).
- $[\text{H}_2\text{O}]$ è quindi considerata costante.
- A 25°C in 1L d'acqua ci sono $1000/18=55,5$ moli , quindi $[\text{H}_2\text{O}] = 55,5\text{M}$

$$[\text{H}_3\text{O}^+] \times [\text{OH}^-] = K_c \times [\text{H}_2\text{O}]^2 = K_w$$

$$K_w = 3,264 \times 10^{-18} \times (55,5)^2 = 10^{-14} \text{ M}^2$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = [\text{OH}^-] = \sqrt{10^{-14}} = 10^{-7} \text{ M} \quad \text{pH} = -\log[\text{H}_3\text{O}^+] = -\log 10^{-7} = 7$$

NB K_w = costante di auto-ionizzazione dell'acqua o prodotto ionico dell'acqua

$[H_3O^+]$	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	10^{-13}	10^{-14}
pH	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
$[OH^-]$	10^{-14}	10^{-13}	10^{-12}	10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^0



Una soluzione è ACIDA se

$$[H_3O^+] > 10^{-7} \text{ M (pH} < 7)$$

$$[H_3O^+] > [OH^-]$$

Una soluzione è BASICA se

$$[H_3O^+] < 10^{-7} \text{ M (pH} > 7)$$

$$[H_3O^+] < [OH^-]$$

$$-\log K_w = pK_w = 14$$

$$pH + pOH = 14$$

$$pH = 14 - pOH$$

Consideriamo un generico acido HA. In acqua si disassocia:



$$K_a = \frac{[\text{A}^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{HA}]}$$

costante di dissociazione acida

Un generica Base B, in acqua si associa con un protone:



$$K_b = \frac{[\text{BH}^+][\text{OH}^-]}{[\text{B}]}$$

costante di dissociazione basica

Ka e Kb determinano la FORZA di un acido o di una base

Consideriamo un acido che consociamo bene, l'acido acetico.

In acqua si disassocia:



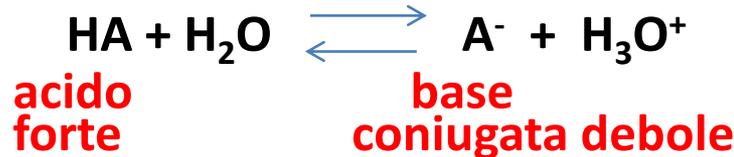
$$K_a = \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]} = 1,8 \times 10^{-5} \text{ M}$$

Il K_a permette di porre la **FORZA ACIDA** dell'acido acetico in relazione a quella di altri acidi (o basi)

Acido	Formula	K_a
acido perclorico	HClO ₄	molto grande
acido iodidrico	HI	molto grande
acido bromidrico	HBr	molto grande
acido cloridrico	HCl	molto grande
acido solforico	H ₂ SO ₄	molto grande
acido nitrico	HNO ₃	molto grande
acido idronio	H ₃ O ⁺	55
acido iodico	HIO ₃	1,7 · 10 ⁻¹
acido ossalico	H ₂ C ₂ O ₄	5,9 · 10 ⁻²
acido solforoso	H ₂ SO ₃	1,5 · 10 ⁻²
acido fosforico	H ₃ PO ₄	7,5 · 10 ⁻³
acido lattico	C ₃ H ₆ O ₃	8,4 · 10 ⁻⁴
acido citrico	H ₃ C ₅ H ₅ O ₇	7,1 · 10 ⁻⁴
acido nitroso	HNO ₂	4,6 · 10 ⁻⁴
acido fluoridrico	HF	3,5 · 10 ⁻⁴
acido formico	CH ₂ O ₂	1,8 · 10 ⁻⁴
acido benzioco	C ₆ H ₅ COOH	6,5 · 10 ⁻⁵
acido acetico	C ₂ H ₄ O ₂	1,8 · 10 ⁻⁵
acido carbonico	H ₂ CO ₃	4,3 · 10 ⁻⁷
acido solfidrico	H ₂ S	9,1 · 10 ⁻⁸
ione diidrogenofosfato	H ₂ PO ₄ ⁻	6,2 · 10 ⁻⁸
acido ipodoroso	HClO	3,0 · 10 ⁻⁸
acido borico	H ₃ BO ₃	7,3 · 10 ⁻¹⁰
acido cianidrico	HCN	4,9 · 10 ⁻¹⁰
acido idrogenocarbonato	HCO ₃ ⁻	5,6 · 10 ⁻¹¹
acido idrogenosolfuro	HS ⁻	1,1 · 10 ⁻¹²
acido idrogenofosfato	HPO ₄ ²⁻	2,2 · 10 ⁻¹³
acqua	H ₂ O	1,8 · 10 ⁻¹⁶

forza crescente degli acid

- Un acido è tanto più forte quanto più incrementa [H₃O⁺]
- Li valore della K_a è tanto più grande quanto più l'acido è forte
- L'acido acetico è relativamente debole in questa scala relativa di forza acida
- La forza dell'acido dipende dalla forza di legame H-A



- Per un **ACIDO FORTE** il legame è debole in soluzione acquosa.
- La base A⁻ ha una scarsa tendenza a riprendersi il protone e quindi è una **BASE CONIUGATA DEBOLE**

Relazione INVERSA tra la forza di un **ACIDO** e la sua **BASE CONIUGATA**

Acido		Base coniugata	
	Acido perclorico	HClO_4	Ione perclorato ClO_4^-
	Acido iodidrico	HI	Ione ioduro I^-
	Acido bromidrico	HBr	Ione bromuro Br^-
	Acido cloridrico	HCl	Ione cloruro Cl^-
	Acido solforico	H_2SO_4	Ione idrogeno solfato HSO_4^-
	Acido nitrico	HNO_3	Ione nitrato NO_3^-
	Ione idrossonio ^a	H_3O^+	Acqua ^a H_2O
	Ione idrogeno solfato	HSO_4^-	Ione solfato SO_4^{2-}
	Acido nitroso	HNO_2	Ione nitrito NO_2^-
	Acido acetico	CH_3COOH	Ione acetato CH_3COO^-
	Acido carbonico	H_2CO_3	Ione idrogeno carbonato HCO_3^-
	Ione ammonio	NH_4^+	Ammoniaca NH_3
	Ione idrogeno carbonato	HCO_3^-	Ione carbonato CO_3^{2-}
	Acqua	H_2O	Ione idrossido OH^-
	Metanolo	CH_3OH	ione metossido CH_3O^-
	Ammoniaca	NH_3	Ione ammido NH_2^-

Forza acida crescente

Forza basica crescente

SISTEMA TAMPONE

- Per un sistema in equilibrio sono presenti entrambe le specie HA e A-



- Se aggiungo una BASE FORTE (es: NaOH), HA sarà in grado di neutralizzare OH⁻
- Se aggiungo un ACIDO FORTE (es. HCl), la A⁻ sarà in grado di neutralizzare H⁺
- Si dice che il sistema ha un **POTERE TAMPONANTE**.

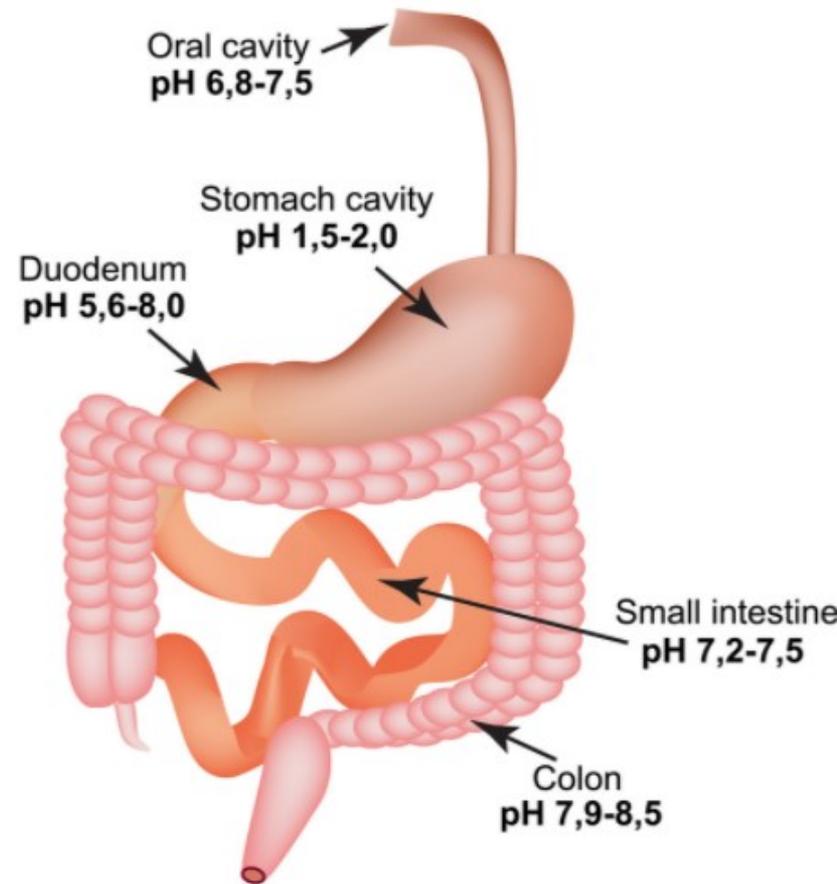
SOLUZIONE TAMPONE

- **Limita le variazioni di pH** dopo l'aggiunta di **piccole quantità** di acidi o basi forti.
- **Mantiene il pH pressoché costante** grazie all'equilibrio della coppia coniugata HA/A⁻
- **Ha una concentrazione simile** (paragonabile) di entrambe le specie che formano la **coppia acido/base coniugata**.

- Nel nostro organismo è fondamentale che il pH si mantenga costante o comunque che vari in un range ristretto di valori.
- Il pH però non è necessariamente mantenuto vicino al neutro

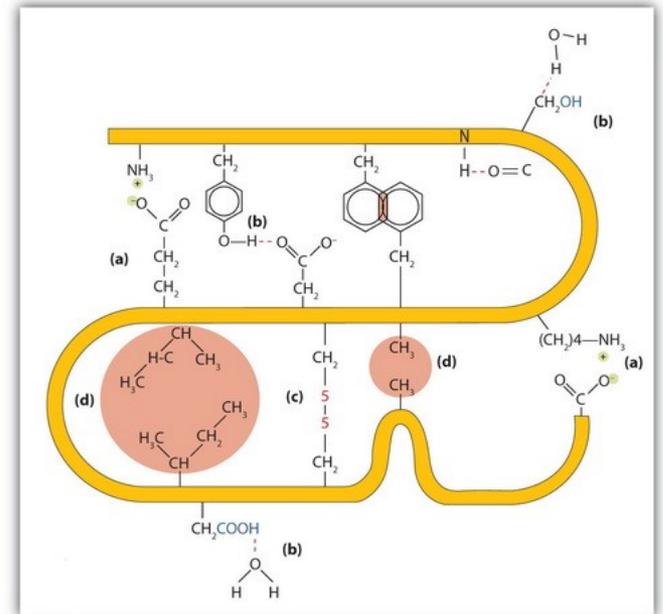
pH of the gastrointestinal tract

- Gli Enzimi digestivi nello **stomaco** lavorano principalmente a **pH ACIDO**.
- Nel **duodeno**, e nella prima parte del digiuno, invece gli enzimi digestivi pancreatici richiedono un **pH ALCALINO**.
- Anche in altri distretti (come ad es. nei **lisosomi** cellulari) le idrolasi agiscono a **pH ACIDO**.



Perché il pH influenza la funzione degli ENZIMI?

- Gli ENZIMI sono generalmente legano una molecola, il substrato, in una specifica tasca nella loro struttura detto il **SITO ATTIVO**.
- La variazione del pH può alterare il grado di ionizzazione di alcuni aminoacidi che formano il sito attivo, ed anche dei gruppi chimici nel substrato per cui:
 - diminuisce l'interazione con il substrato.
 - se gli amminoacidi alterati partecipano nella catalisi, diminuisce l'efficienza
- Forti variazioni del pH possono anche alterare la struttura e quindi la funzione di proteine. (il pH influenza due dei quattro tipi di interazioni deboli che stabilizzano la struttura delle proteine, i legami-H e i ponti salini o interazioni elettrostatiche)



Il nostro organismo utilizza sistemi tampone per mantenere stabile il pH nei vari distretti corporei.

I principali tamponi fisiologici sono:

- il sistema del **bicarbonato** (il più importante a livello extracellulare) $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$
- il sistema del **fosfato**: $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$
- il sistema delle **proteine** (protonate e deprotonate, es. albumina, emoglobina, ...)

Il più importante è il sistema del bicarbonato che agisce assieme al rene e al polmone.



se la reazione è spostata a sinistra, interviene il rene che elimina H^+ in eccesso mediante processi metabolici

se la reazione è spostata a destra interviene il polmone che aumenta la frequenza respiratoria allo scopo di eliminare CO_2 prodotta in eccesso.

pH di una soluzione tampone

Come si calcola il **pH di una soluzione tampone** costituita da **un acido debole** e dalla sua **base coniugata**?

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[A^-]_{\text{iniziale}}}{[HA]_{\text{iniziale}}}$$

Equazione di Henderson Hasselbalch

se le concentrazioni di acido debole HA e di base coniugata A⁻ sono uguali **pH= pKa**

In queste condizioni il sistema ha la **“massima efficienza tamponante”**.

Per una base :
$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \left(\frac{[B]}{[BH^+]} \right)$$

ESEMPIO:

Una soluzione tampone è costituita da:

$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,1\text{M}$ e da $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0,1\text{M}$

a) Sapendo che per l'acido acetico il $pK_a = 4,75$ si calcoli il pH iniziale.

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[A^-]_{\text{iniziale}}}{[HA]_{\text{iniziale}}} \quad \text{pH} = 4,75 + \log (0,1/0,1) = 4,75$$

b) Verifica il potere tampone:

Se a 0,5 L di questa soluzione aggiungo 5 ml di HCl 0,5M come varia il pH?

PRIMA dell'aggiunta: moli di CH_3COOH o CH_3COO^- : $M \times V = 0,1 \times 0,5 = 0,05$ mol

DOPO l'aggiunta di HCl: $\text{H}^+ + \text{CH}_3\text{COO}^- \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH}$

moli di HCl = $M \times V = 0,5 \text{ (M)} \times 0,005 \text{ (L)} = 0,0025$ mol

$[\text{CH}_3\text{COOH}] = (0,05 \text{ (moli)} + 0,0025 \text{ (moli)}) / (0,5 \text{ (vol)} + 0,005 \text{ (vol)}) = 0,0525 / 0,505 = 0,1039\text{M}$

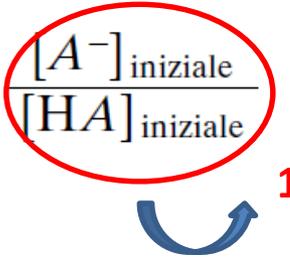
$[\text{CH}_3\text{COO}^-] = (0,05 - 0,0025) / (0,5 + 0,005) = 0,0475 / 0,505 = 0,0940\text{M}$

pH = $4,75 + \log 0,0940 / 0,1039 = 4,70$

Il sistema ha un buon potere tampone

SCelta DEL SISTEMA TAMPONE

ES.: Ho bisogno di un tampone a pH = 5

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[A^-]_{\text{iniziale}}}{[HA]_{\text{iniziale}}}$$


HNO ₂ /NO ₂ ⁻	(pKa = 3,34)	
CH₃COOH/CH₃COO⁻	(pKa = 4,75)	2
H ₂ CO ₃ /HCO ₃ ⁻	(pKa = 6,37)	
H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻	(pKa = 7,21)	
NH ₄ ⁺ /NH ₃	(pKa = 9,26)	

- Per avere la massima capacità tamponante le concentrazioni di acido e della sua base coniugata devono essere uguali o paragonabili.
- Quindi il rapporto [A⁻]/[HA] → 1, il logaritmo → 0 e pH → pK_a
- Quindi cerco un sistema acido/base coniugata che abbia il pKa il più vicino possibile al pH desiderato.
- Nella tabella l'acido acetico ha un pKa= 4,75, il più vicino a 5

COME SI PREPARA UNA SOLUZIONE TAMPONE

Es. Soluzione tampone $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$

si possono usare tre metodi differenti

1. Usando uguali quantità di ACIDO (CH_3COOH) e sua BASE CONIUGATA ($\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$) sotto forma di acetato di sodio
2. Partendo da una soluzione di ACIDO (CH_3COOH) e aggiungendo una base forte (ad esempio NaOH). Le moli di NaOH aggiunte devono essere la metà rispetto a quelle di CH_3COOH .
3. Partendo da una soluzione del sale dell'Acido (cioè la BASE CONIUGATA , $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$) e aggiungendo un acido forte (ad esempio HCl). Le moli di HCl aggiunte devono essere la metà rispetto a quelle di $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$

Indipendentemente dal metodo scelto le soluzioni dovranno avere le stesse concentrazioni di CH_3COOH e di CH_3COO^- ; solo così avranno lo stesso pH.

MISURA DEL pH



Indicatore universale (cartina al tornasole)

- Facile
- Veloce
- Moderatamente preciso



pHmetro

- Richiede calibrazione
- Relativamente facile e veloce
- Molto preciso

CAPACITA' TAMPONANTE

La capacità tamponante si riferisce alla quantità di acido forte o di base forte che la soluzione tampone riesce a neutralizzare mantenendo il pH entro il limite di variazione di 1 unità di pH.

Da cosa dipende questa capacità?

La capacità tamponante di una soluzione dipende da:

- 1) dalla concentrazione assoluta (ACIDO e BASE CONIUGATA)
- 2) dal rapporto tra le concentrazioni della coppia ACIDO-BASE CONIUGATA

VERIFICA DELLA CAPACITA' TAMPONANTE

- Si prepara una soluzione tampone a $\text{pH}=7$ e si aggiunge un indicatore che diventa rosa a $\text{pH}>7$
- Si prepara una soluzione acquosa con la stessa quantità d'indicatore
- Entrambe le soluzioni sono incolori poiché il $\text{pH} < 7$
- Si aggiunge una piccola quantità di NaOH ad entrambe

La soluzione tampone rimane incolora poiché la capacità tamponante mantiene il $\text{pH} < 7$



La soluzione acquosa diventa fucsia poiché l'aggiunta della base forte porta il $\text{pH} > 7$

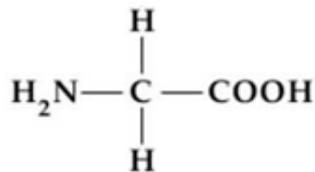
Se una soluzione tampone viene **DILUITA** :

- Il pH non cambia perché il rapporto A^-/HA (in caso di tampone costituito da acido debole) rimane costante
- Però cambia la capacità tamponante, cioè la quantità di H^+ o di OH^- che riesce a neutralizzare mantenendo stabile il pH

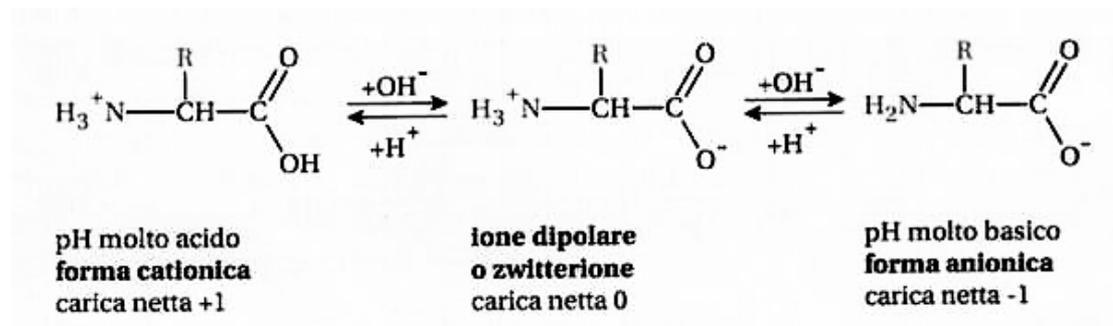
ESPERIENZA di LABORATORIO

- Preparazione di tamponi glicina, fosfato e TRIS

TAMPONE GLICINA

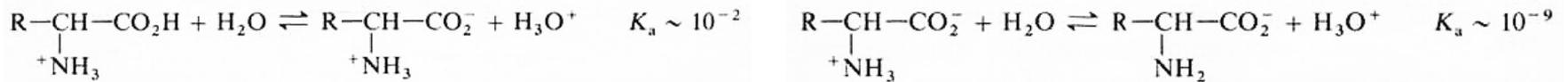


Glicina, un amminoacido



- Gli aminoacidi sono molecole costituite sia da un gruppo carbossile (acido) sia da un gruppo amminico (basico). Sono sostanze **anfotere**.
- Un AA può esistere in una forma completamente protonata, cationica, o completamente deprotonata, anionica, a seconda del pH della soluzione.
- Ad un determinato valore di pH (definito **punto isoelettrico**) l'AA è presente sotto forma di ione dipolare (**zwitterione**).

- Gli aminoacidi che **NON** hanno catene laterali (R) ionizzabili (come la glicina), hanno due pK_a , rispettivamente di ~ 2 e ~ 9 , che corrispondono ai gruppi acido e basico



- Ad es. la Glicina ha $pK_a^1 = 2,34$ e $pK_a^2 = 9,60$
- il **PI** è dato dalla media aritmetica dei due valori di pK . **Varia a seconda della natura del gruppo R.**

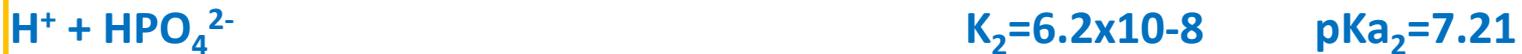
$$PI^{(\text{Glicina})} = (pK_a^1 + pK_a^2)/2 = (2,34+9,60)/2 = 5,97$$

Preparazione di 200 ml di tampone glicina a pH 2.5 e pH 9.3

- Pesare nel becher 3g di glicina (MW= 75, $pK_a^1=2.3$; $pK_a^2=9.6$)
- Aggiungere acqua distillata (leggermente meno di 200 ml) e sciogliere agitando con l'ancoretta magnetica.
- Verificare il pH di partenza misurando con il pHmetro.
- Aggiustare il pH aggiungendo lentamente, 1 ml alla volta di Acido forte HCl oppure della Base forte NaOH fino al raggiungimento del pH desiderato
- Prendere nota del Volume totale di acido o base aggiunte
- Portare la soluzione al volume finale.

TAMPONE FOSFATO

- È un sistema tampone sfruttato dagli organismi pluricellulari per mantenere un pH praticamente costante nella cellula e negli ambienti circostanti.
- È quello maggiormente utilizzato nel campo della ricerca biologica
- L'acido fosforico è un acido triprotico per cui abbiamo tre coppie acido/base coniugata che possiamo utilizzare per formare la soluzione tampone:



- Di solito si utilizzano NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4 poiché il valore della pK_a^2 è vicino a $\text{pH} = 7$ che è quello più ampiamente impiegato.

Metodi di preparazione: Prepara un tampone fosfato con pH 7.4

1) Applicando l'equazione di Henderson-Hasselbalch $7,4 = 7,2 + \log [\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$

$$0,2 = \log [\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$$
$$10^{0.2} = [\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 1.6$$

Quindi se uso 1.6 moli di Na_2HPO_4 (MW = 141.96 g/mol) = $1.6 \times 141.96 \cong 227$ g/L

devo usare 1 moli di NaH_2PO_4 (MW = 119.98 g/mol) = $1 \times 119.98 \cong 120$ g/L

2) Uso la seguente tabella:

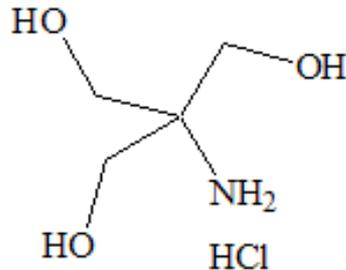
	1 Liter of 0.05 M Phosphate Buffer (25°C)	
<i>Desired pH</i>	<i>1 M Monobasic Solution</i> NaH_2PO_4	<i>1 M Dibasic Solution</i> Na_2HPO_4
6.6	32.0 ml	18.0 ml
6.7	29.8 ml	20.2 ml
6.8	26.5 ml	23.5 ml
6.9	24.0 ml	26.0 ml
7.0	21.1 ml	28.9 ml
7.1	18.4 ml	31.6 ml
7.2	16.8 ml	34.2 ml
7.3	13.4 ml	36.6 ml
7.4	11.2 ml	38.8 ml
7.5	9.4 ml	40.6 ml
7.6	7.8 ml	42.2 ml

Preparazione di 125 ml di tampone fosfato 0.2M a pH 7

- Pesare nel becker NaH_2PO_4 e scioglierlo in acqua distillata (aggiungere un volume leggermente inferiore a 125ml)
- Verificare il pH di partenza con il pHmetro
- Portare a pH7 utilizzando una soluzione di NaOH 5M.
- Annotare il volume totale di NaOH utilizzato per portare la soluzione al pH desiderato.
- Portare a volume e conservare la soluzione in una bottiglietta.

TAMPONE TRIS/HCl

- Tampone molto usato soprattutto per soluzioni di ENZIMI o di DNA
- il TRIS è meno usato meno nella chimica poiché ha un gruppo amminico primario che è reattivo, e potrebbe interferire con le reazioni



tris-(2-idrossimetil)-amminometano cloridrato
(MW= 121, pKa=8.3)

Preparazione di 400 ml di tampone Tris/HCl 100mM a pH 8.8

- Pesare nel becker Tris e scioglierlo in un volume inferiore a 400 ml di acqua distillata,
- misurare il pH.
- Portare a pH 8.8 utilizzando la soluzione di HCl 2M.
- Portare a volume e conservare tutta la soluzione in una bottiglia da 500 ml.

Utilizzo del pHmetro:

1) CALIBRAZIONE con soluzioni a pH 7 e a pH4

- 1) Lavare accuratamente la punta dell'elettrodo con spruzzetto
- 2) Attivare la calibrazione.
- 2) Inserire l'elettrodo nella soluzione di calibrazione a pH 7.00 e lasciare che il display si stabilizzi.
- 3) Sollevare l'elettrodo e lavarlo abbondantemente con acqua distillata
- 4) Inserire l'elettrodo nella soluzione di calibrazione a pH 4.00 e lasciare che il display si stabilizzi
- 5) Quando la calibrazione è avvenuta con successo, risciacquare l'elettrodo ed iniziare le misure



Per ottenere dei risultati precisi:

- Prestare molta attenzione alla calibrazione e assicurarsi che le soluzioni standard siano fresche
- Mantenere costante la temperatura.
- Tra una misurazione e l'altra è buona norma lavare l'elettrodo con acqua distillata.
- Durante la calibrazione o la misura, lasciare l'elettrodo immerso per un tempo sufficiente affinché la lettura si stabilizzi
- Non toccare il vetro dell'elettrodo. Non muoverlo durante la misura. Non lasciarlo mai fuori della soluzione di stoccaggio fra una misura e l'altra o al termine dell'esperimento.