

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA VETERINARIA

C.I. “ FISICA, CHIMICA E PROPEDEUTICA BIOCHIMICA” (10 CFU)
(I ANNO)

MODULO “PROPEDEUTICA BIOCHIMICA
ED ELEMENTI DI BIOLOGIA MOLECOLARE” (4 CFU)
DOCENTE: ROBERTO GIACOMINELLI STUFFLER

ATTIVITÀ DIDATTICO-PRATICA SU

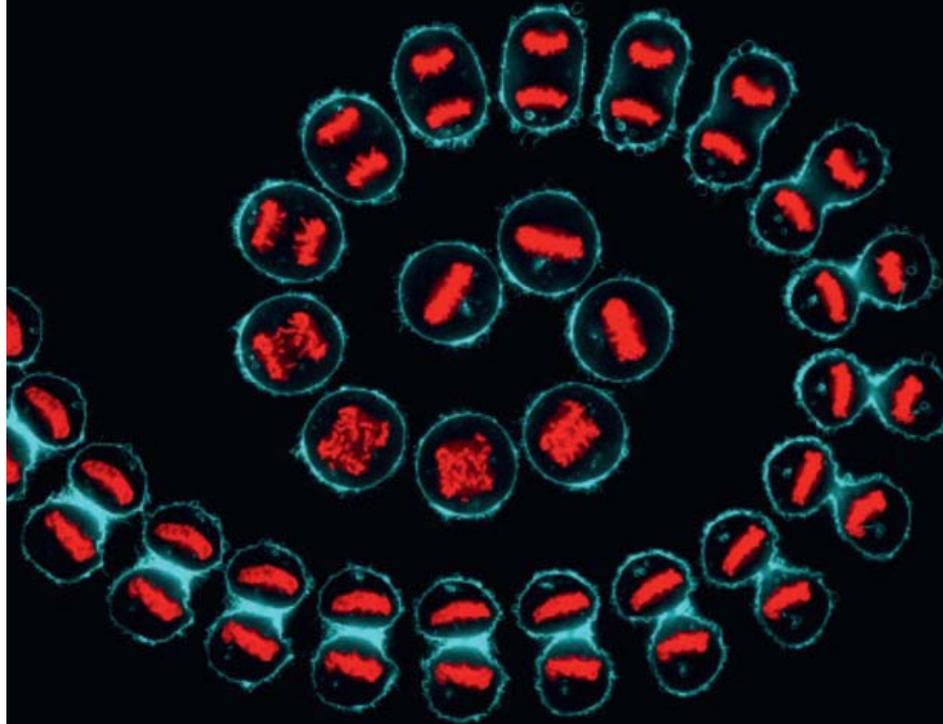
“VOLUMETRIA E PESATE CON PREPARAZIONE
DI SOLUZIONI TAMPONE”

Roberto Giacomini Stuffer

Mauro Maccarrone

Metodologie biochimiche e biomolecolari

Strumenti e tecniche per il laboratorio
del nuovo millennio



BIOCHIMICA ZANICHELLI

CAPITOLO 4

Volumetria e pesate

di Clotilde Beatrice Angelucci e Roberto Giacomini Stuffer

4.1 Introduzione

In ogni laboratorio rientrano, tra le manualità quotidiane, semplici operazioni come la preparazione di una soluzione, con l'utilizzo di un matraccio volumetrico, il trasferimento di un liquido mediante l'impiego di una pipetta, o la misura di un volume con tecniche di titolazione, servendosi di una buretta. Queste azioni sono comunemente eseguite utilizzando la **vetreria volumetrica**. Di fatto, essa è considerata lo strumento di base per la valutazione quantitativa e, come per ogni misura, la sua accuratezza è fondamentale.

Questo capitolo ha come obiettivo quello di fornire agli studenti i principi e le strategie pratiche delle tecniche preparative per una corretta manualità di laboratorio, necessarie per l'esecuzione di qualunque esperimento scientifico. Particolare importanza sarà data alle attrezzature analitiche e tecniche, poiché il loro utilizzo appropriato è essenziale per fornire risultati precisi e accurati. Infatti, l'allievo deve comprendere bene l'importanza della precisione e dell'accuratezza con cui si deve eseguire ogni singola misura; nello specifico, approfondiremo alcuni principi fondamentali per la preparazione delle soluzioni e l'utilizzo di alcune tecniche-chiave necessarie per condurre gli esperimenti di laboratorio con successo. In pratica, lo studente potrà imparare quali siano e come si usino gli strumenti per la misurazione delle **masse** e dei **volumi**, attraverso esempi di applicazioni pratiche, così da avere un'idea chiara del modo corretto di operare in un laboratorio di biochimica e biologia molecolare.

4.2 Preparazione delle soluzioni

4.3

L'unità
tà, o c
una s
litro c
litri d

dove
In
equi
in g

dov
indi

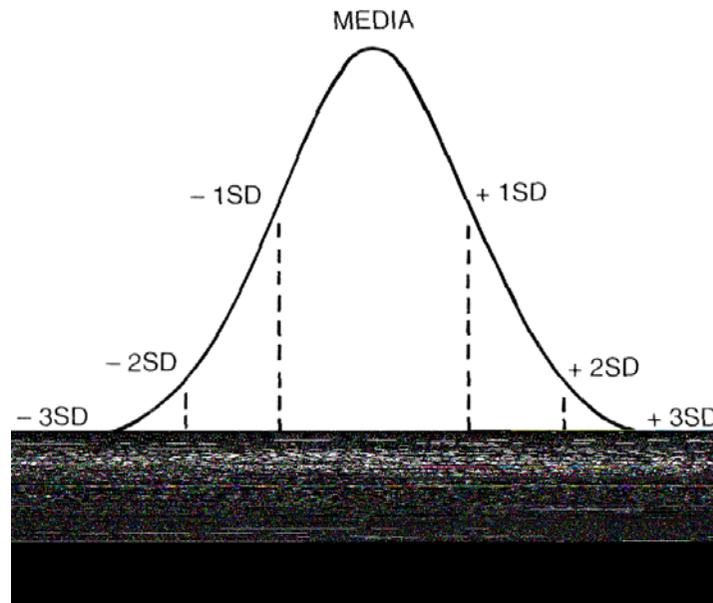
**L'ATTENDIBILITÀ E' LA QUALITÀ
CHE CARATTERIZZA UN
METODO ANALITICO E UN
RISULTATO**

L'ATTENDIBILITA' E LA PRECISIONE

Lo scopo della misura di qualunque grandezza (chimica, fisica, chimica-fisica o biochimica) è quello di ottenere un valore (valore analitico) che rappresenti una stima, quanto più possibile fedele, del valore vero.

ATTENDIBILITA' ➔ È la qualità che caratterizza un risultato o un metodo analitico. Essa è determinata da fattori quali la precisione, l'accuratezza, la sensibilità e la specificità.

PRECISIONE ➔ Viene definita come la concordanza fra i risultati di una serie di misure distinte (repliche) ottenute con lo stesso metodo su uno stesso campione. La DS (deviazione standard) indica l'imprecisione (dispersione o variabilità analitica).

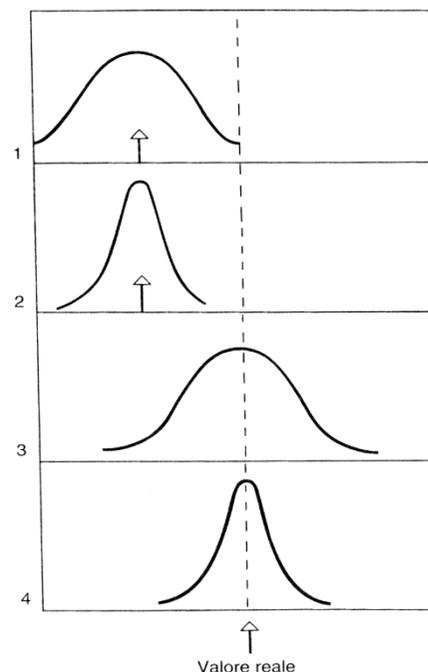
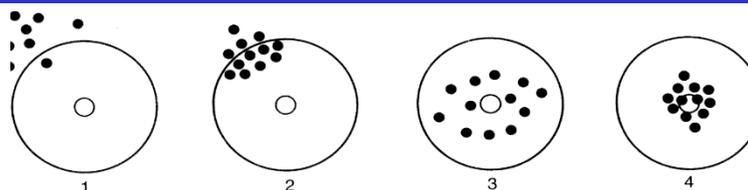


L'ACCURATEZZA E LA SPECIFICITA'

ACCURATEZZA ➔ In una serie di repliche della stessa analisi, essa è il grado di concordanza tra il valore medio trovato e il valore vero. L'inaccuratezza è calcolata come differenza tra il valore medio sperimentale e il valore vero.

SPECIFICITA' ➔ Proprietà del metodo di dosare solo e interamente la sostanza studiata senza subire interferenze positive o negative da parte di altre sostanze. Non ha valore numerico.

- 1 = metodo impreciso e inaccurato
- 2 = metodo preciso ma inaccurato
- 3 = metodo impreciso ma accurato
- 4 = metodo preciso e accurato



LA SENSIBILITA' ANALITICA E IL LIMITE DI RIVELABILITA'

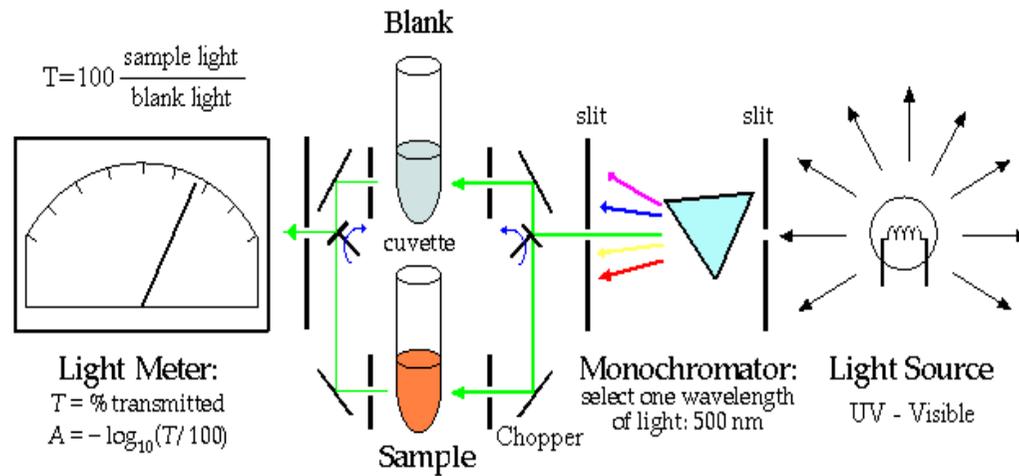
SENSIBILITA' ANALITICA ➔ è l'attitudine del metodo a dosare piccole quantità del componente studiato, non ha un valore numerico.

LIMITE DI RIVELABILITA' ➔ è la più piccola quantità di sostanza che il metodo riesce a dosare, cioè a distinguere rispetto al bianco;
dal punto di vista strumentale può essere definito anche come il rapporto tra il segnale analitico e il segnale o rumore di fondo (noise).

LO SPETTROFOTOMETRO



CUVETTE



MODI PER INDICARE LA CONCENTRAZIONE DI UNA SOLUZIONE

LE CONCENTRAZIONI DEI SOLUTI IN SOLUZIONE POSSONO ESSERE ESPRESSE IN DIVERSI MODI:

% (PESO / VOLUME) si riferisce al soluto in grammi / 100 ml di solvente,

% (PESO / PESO) si riferisce ai grammi di soluto / 100 grammi di solvente,

% (VOLUME / VOLUME) si riferisce agli ml di soluzione del soluto / 100 ml di soluzione del solvente;

le miscele di solventi possono anche essere indicate come RAPPORTI VOL/VOL/VOL come 4:1:1, in cui i numeri indicano i volumi relativi di ciascun solvente.

LA MOLARITÀ

LA MOLARITA' (moli per litro) è l'espressione di concentrazione più utile per i calcoli biochimici e indica il numero di moli di soluto in 1 litro di soluzione;

l'abbreviazione per molarità è M.

LA MOLE (peso molecolare espresso in grammi) è una quantità, il suo simbolo è mol;

quindi, 1,0 L di una soluzione 1M contiene 1 mole di soluto, mentre 0,5 litri di una soluzione 1M contengono 0,5 moli di soluto.

AUSILI MATERIALI PER LA MISURAZIONE DELLE MASSE E DEI VOLUMI

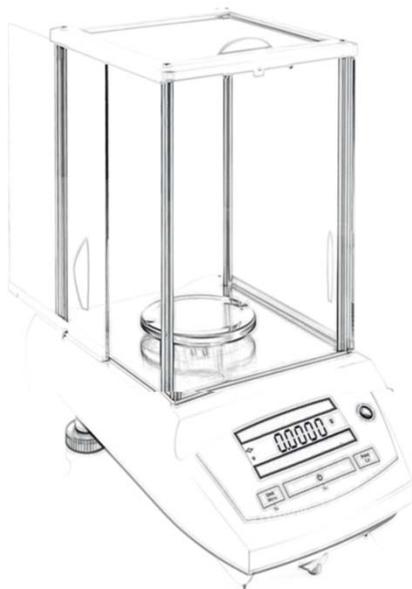
LE BILANCE

BILANCIA ANALITICA

Tipo di bilancia di precisione, impiegata soprattutto in chimica analitica quantitativa per misure accurate, in grado di rilevare masse fino a 10 microgrammi.

BILANCIA TECNICA

Tipo di bilancia impiegata per misure di peso che non necessitano di particolare precisione, quando la quantità da prendere è dell'ordine dei grammi.



BILANCIA ANALITICA



BILANCIA TECNICA

AUSILI MATERIALI PER LA MISURAZIONE DELLE MASSE

LE SPATOLE di varie dimensioni, in base alla quantità da prendere, in plastica o metallo, in base alle caratteristiche fisico-chimiche della sostanza in esame,

I CUCCHIAI in plastica o metallo,

**LE VASCHE (NAVETTE) di materiale leggero;
ricordarsi di fare la tara prima della determinazione.**



SPATOLE E CUCCHIAI



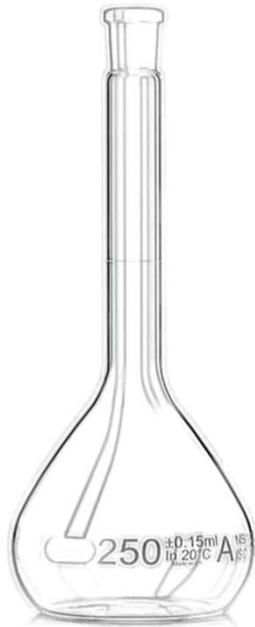
VASCHE (NAVETTE)

PER LA MISURAZIONE DEL VOLUME SONO UTILIZZATI:

I PALLONI VOLUMETRICI da 1 ml a parecchi litri, sono molto accurati,

I CILINDRI GRADUATI hanno minore accuratezza, ma permettono la misura di frazioni del volume totale;

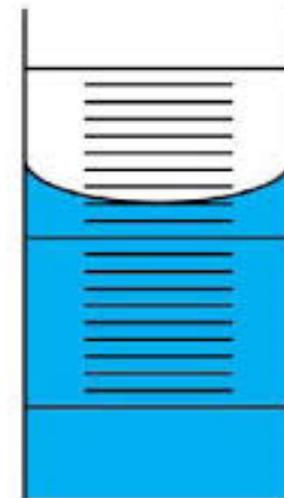
si deve allineare la parte inferiore del menisco del liquido con il segno.



PALLONE VOLUMETRICO



CILINDRI GRADUATI



Cilindro graduato

PER IL TRASFERIMENTO DI LIQUIDI OCCORRONO:

I MICROPIPETTATORI per volumi da 0,001 a 1 ml.

UN MICROPIPETTATORE E' COMPOSTO DA:

un pistone,
un espulsore del puntale,
un anello di aggiustamento del volume,
un indicatore di volume;

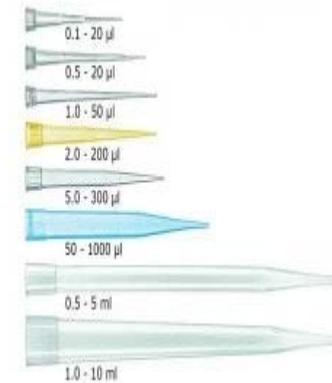
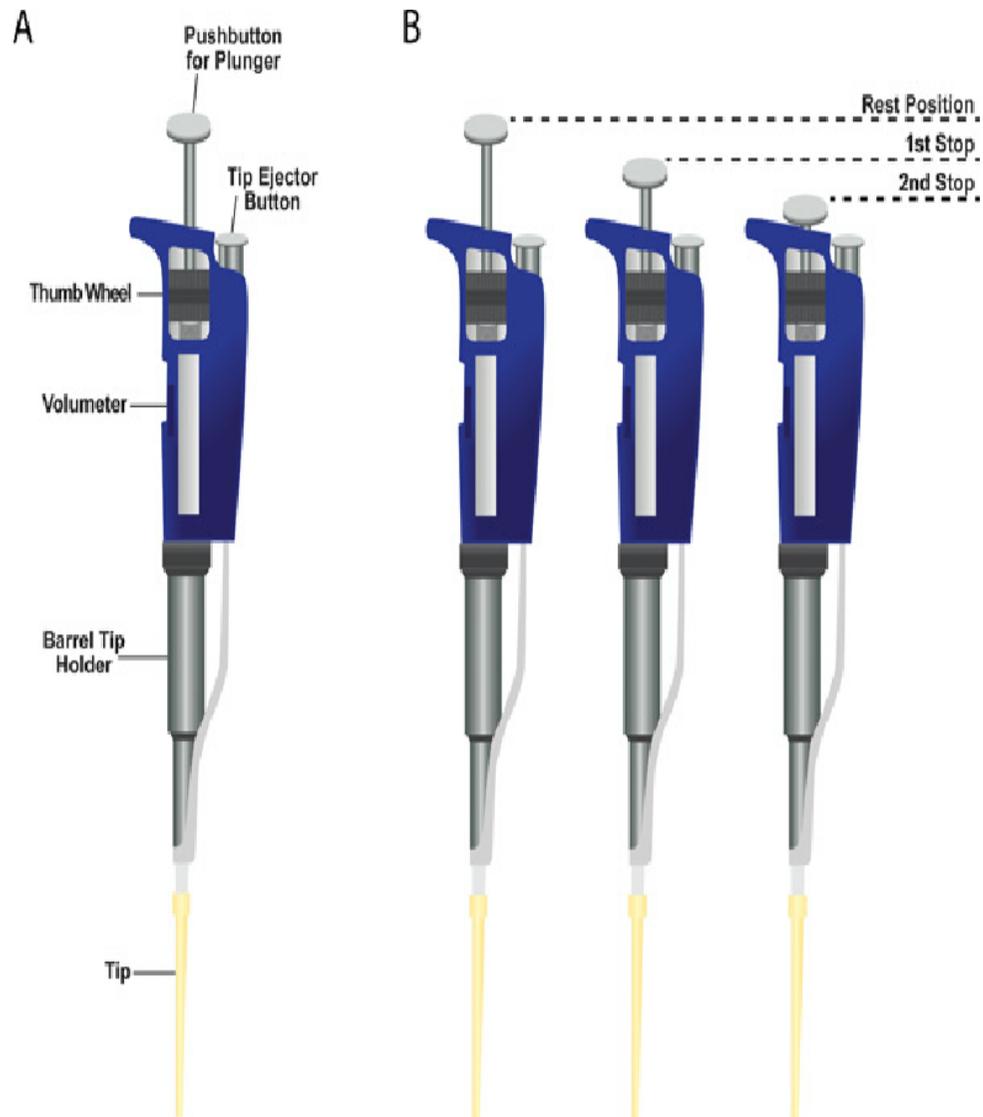
essi hanno puntali monouso.



MICROPIPETTATORE MULTICANALE



MICROPIPETTATORE MONOCANALE



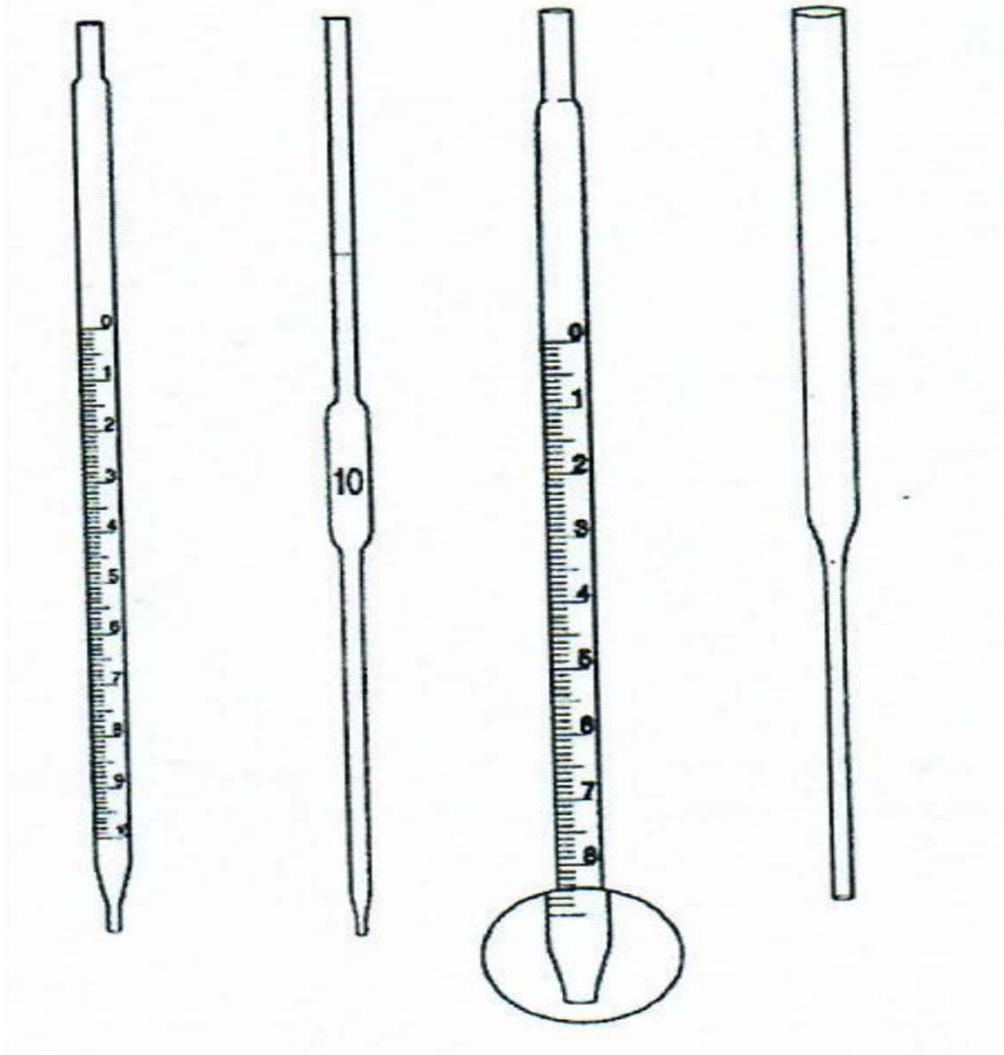
PUNTALI MONOUSO

MICROPIPETTATORI MONOCANALE

PER IL TRASFERIMENTO DI LIQUIDI OCCORRONO:

LE PIPETTE DI VETRO (O DI PLASTICA) per volumi da 1 a 25 ml,

da sinistra a destra MOHR, VOLUMETRICA, SEROLOGICA e PASTEUR, la MOHR presenta uno spazio morto, mentre la SEROLOGICA è graduata fino alla punta.



PIPETTATORE AUTOMATICO

PER IL TRASFERIMENTO DI LIQUIDI OCCORRONO:

IL RIEMPITORE DI GOMMA A BULBO, che serve ad aspirare e trasferire liquidi con la pipetta,

ha tre valvole marcate: A, S, E (aspirazione, suzione, evacuazione);

LA TETTARELLA DI GOMMA, che serve a trasferire liquidi con la PIPETTA PASTEUR, questa pipetta viene utilizzata quando non è necessario trasferire un'esatta quantità di volume;

LE PIPETTE PASTEUR USATE sono eliminate nella scatola designata per i vetri rotti.

IMPORTANTE: evitare le contaminazioni.



RIEMPITORI DI GOMMA A BULBO



TETTARELLE DI GOMMA

INDICAZIONI DA SEGUIRE

Usando i MICROPIPETTATORI si incontrano varie fonti di errore, sono spesso INACCURATI perché possono essere stati lasciati cadere o rovinati in altro modo, devono essere ISPEZIONATI e RICALIBRATI spesso, se lo strumento GOCCIOLA va messo da parte.

Durante un ESPERIMENTO, per diminuire l'inaccuratezza è consigliabile condurre tutte le misurazioni con un singolo strumento;

in questo modo i volumi potranno essere tutti inaccurati, ma, sperabilmente, RIPRODUCIBILI e INACCURATI in modo proporzionale.

Il liquido non deve rimanere ADESO all'esterno del puntale,

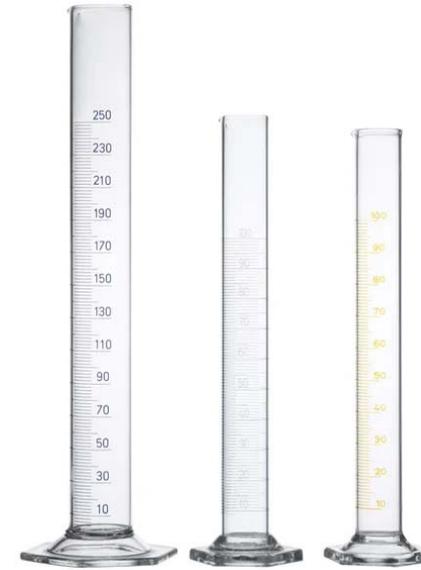
è importante il COMPLETO RIMESCOLAMENTO delle soluzioni sia per i volumi piccoli, sia per quelli grandi;

durante un esperimento è importante la stretta osservanza dei TEMPI.

PER RIMESCOLARE LE SOLUZIONI



**PROVETTE GRADUATE
(EPPENDORF)**
Capacità: 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml



VORTEX



PELLICOLA DI CERA

II PIACCAMETRO

Esso è un potenziometro per la misura del pH,

é costituito da un elettrodo in vetro, che è selettivamente sensibile agli ioni di H^+ e insensibile a Na^+ , K^+ e altri cationi;

il segnale che arriva all'elettrodo viene confrontato con il segnale generato da una soluzione, nel pHmetro, di cui è noto il pH.

COME USARLO

- 1) Rimuovere l'elettrodo dalla soluzione di mantenimento,
- 2) sciacquarlo abbondantemente con una spruzzetta (contenente acqua),
- 3) procedere alla misura del pH della soluzione,
- 4) finita la lettura, sciacquarlo abbondantemente con la spruzzetta,
- 5) metterlo nella soluzione di mantenimento.



COME PREPARARE UNA SOLUZIONE TAMPONE

PREPARAZIONE DI UNA SOLUZIONE A MOLARITA' DEFINITA

Si pesa la quantità di soluto desiderata usando una bilancia,
successivamente si scioglie il soluto nel solvente, in genere acqua o un tampone,
dopo che il soluto è completamente sciolto, si raggiunge il pH desiderato (se
necessario),
Infine si porta la soluzione al volume finale per ottenere la concentrazione
desiderata.



BECHER



AGITATORE MAGNETICO CON ANCORETTA



24
SPRUZZETTA

PREPARAZIONE DEL TAMPONE GLICINATO DI SODIO [0,2M] a pH 8

Si ricava il numero di moli necessarie convertendo il volume in litri e applicando la seguente equazione: $M = \frac{n}{V}$

$$V = 200 \text{ mL} = 0,2 \text{ L}$$

$$n = M \times V = 0,2 \text{ M} \times 0,2 \text{ L} = 0,04 \text{ mol}$$

Ottenute le moli, si calcolano i grammi di glicina necessari utilizzando la seguente equazione: $n = \frac{m}{MM}$

$$m = n \times MM = 0,04 \text{ mol} \times 75,07 \text{ g/mol} = 3 \text{ g} \quad \text{Glicina (P.M. 75,07)}$$

Si fa la tara del becher,

in esso si pesa la quantità di glicina desiderata, utilizzando un cucchiaino o una spatola,

si aggiunge il solvente (acqua), senza portare la soluzione al volume finale,

si utilizza un agitatore magnetico e un'ancoretta per favorire il passaggio della glicina in soluzione,

quando il soluto è completamente sciolto, si porta la soluzione a pH 8 con NaOH,

infine, essa si trasferisce in un cilindro graduato e si porta al volume finale per ottenere la concentrazione desiderata.