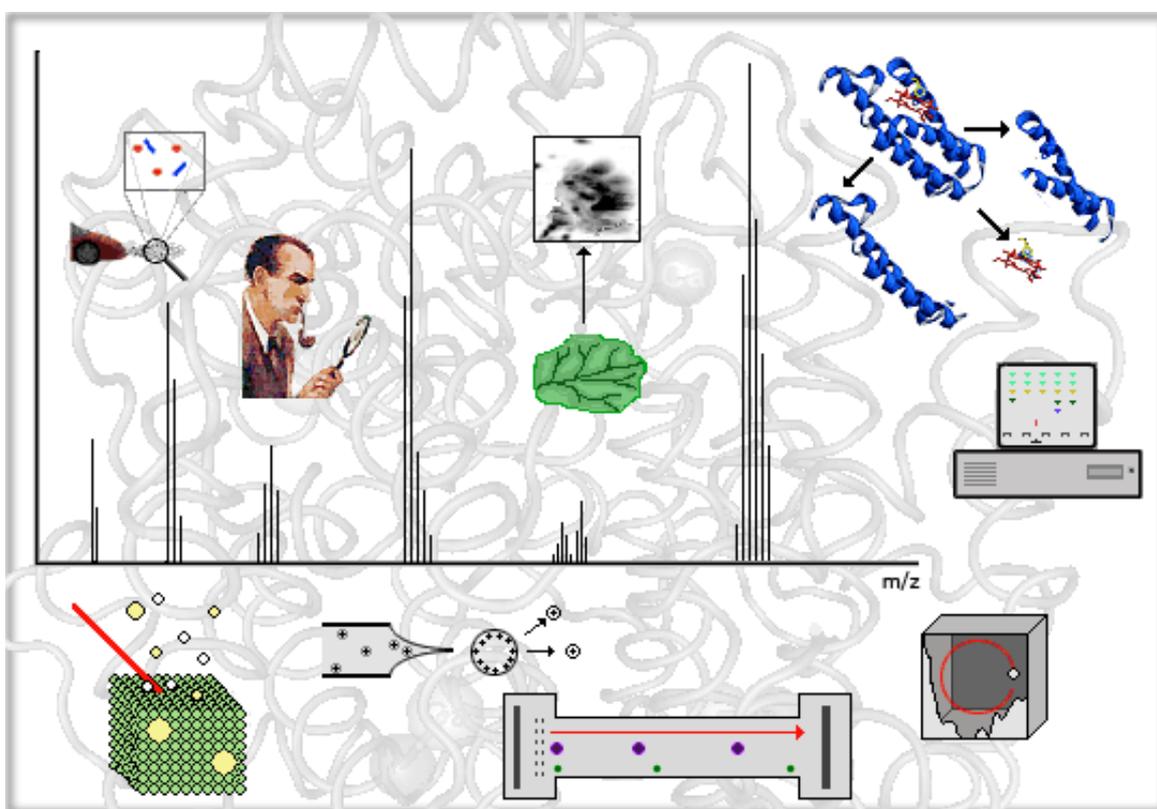


UNIVERSITA' DI VERONA
FACOLTA' DI
SCIENZE MM.FF.NN

CORSO DI LAUREA IN
BIOTECNOLOGIE AGRO-INDUSTRIALI



LABORATORIO DI
CHIMICA ANALITICA

ANNO ACCADEMICO 2005-2006

DETERMINAZIONE DEI NITRATI NELL'ACQUA POTABILE DI RETE E IN ACQUA COMMERCIALE IN BOTTIGLIA (Metodo spettrofotometrico UV)

DEFINIZIONE:

I nitrati presenti nelle acque derivano soprattutto dall'inquinamento biologico dovuto agli agglomerati urbani e dai liquami provenienti dai rifiuti, dai fertilizzanti in agricoltura, dagli scarichi di alcune industrie e dai processi di combustione.

In condizioni normali, i nitrati vengono eliminati rapidamente dalle urine. Tuttavia i nitrati rappresentano un pericolo per l'uomo se messi nella condizione di essere ridotti a nitriti; questi infatti possono causare metaemoglobinemia (soprattutto agli anziani). Inoltre, se reagiscono con alcune ammine, i nitriti possono dare origine alle nitrosammine, che sono cancerogene.

PRINCIPIO:

Questo metodo può essere applicato solo a campioni che abbiano un contenuto di sostanze organiche molto basso, come le acque potabili.

Dopo aver acidificato il campione, si misura l'assorbanza rispettivamente a 220 nm (dove assorbono sia i nitrati che le sostanze organiche) e a 275 nm (dove assorbono solo le sostanze organiche) e poi si calcola l'assorbanza netta:

$$A = A_{220} - 2 * A_{275}$$

Questa relazione, puramente empirica, si basa sul presupposto che l'assorbanza delle sostanze organiche a 220 nm sia il doppio di quella a 275 nm. Tuttavia, se l'assorbanza a 275 nm supera del 10% l'assorbanza a 220 nm, il metodo non può essere usato e fornisce risultati puramente indicativi.

STRUMENTAZIONE E MATERIALI:

- ➡ Spettrofotometro UV doppio raggio
- ➡ Cuvette di quarzo da 1 cm
- ➡ Matracci da 50 ml, 100 ml e 1 l
- ➡ Pipetta tarata da 25 ml

REAGENTI:

⇒ Soluzione standard concentrata di KNO_3

Pesare accuratamente 200,00 mg di KNO_3 anidro. Sciogliere in acqua Milli-Q e portare a volume in un matraccio tarato da un litro con acqua Milli-Q.

⇒ Soluzione standard diluita di KNO_3

Al momento dell'uso, prelevare 50 ml di soluzione standard concentrata e diluire a 500 ml con acqua Milli-Q in matraccio tarato. Calcolare la concentrazione di KNO_3 in questa soluzione.

⇒ HCl 1 M

PROCEDIMENTO:

Retta di taratura: Versare in una serie di matracci tarati da 50 ml volumi della soluzione standard diluita di KNO_3 compresi tra 1 e 20 ml (almeno 8 concentrazioni differenti). Aggiungere 1 ml di HCl 1 M e portare a volume con acqua Milli-Q. Calcolare la concentrazione di ogni soluzione:

$$\text{KNO}_3 \text{ (mg/l)} = C \text{ standard diluito} * \text{ml prelevati}/50$$

Agitare e misurare l'assorbanza a 220 e 275 nm con cuvette di quarzo da 1 cm, contro il bianco. Costruire la retta di taratura ponendo in ascissa la concentrazione e in ordinata l'assorbanza netta (A).

Determinazione del campione di acqua di rete: Aggiungere a 20 ml di campione 1 ml di HCl 1 M, portare a 100 ml con acqua Milli-Q in un matraccio tarato, agitare e determinare l'assorbanza netta con lo stesso procedimento usato per gli standard, effettuando 5 misurazioni diverse. Nella determinazione della concentrazione tenere conto del reale volume di acqua utilizzata per l'esame.

Determinazione del campione di acqua commerciale: Porre 1 ml di HCl 1 M in un matraccio tarato da 100 ml e portare a volume con l'acqua commerciale, agitare e determinare l'assorbanza netta con lo stesso procedimento usato per gli standard, effettuando 5 misurazioni diverse. Nella determinazione della concentrazione tenere conto del reale volume di acqua utilizzata per l'esame.

Preparazione del bianco: Aggiungere a 50 ml di acqua Milli-Q 1 ml di HCl 1 M

ESPRESSIONE DEI RISULTATI:

Calcolare media, mediana, deviazione dalla media, intervallo delle misure e deviazione standard per i valori di assorbanza ottenuti per i campioni dell'acqua di rete e per quelli dell'acqua commerciale.

Ricavare la concentrazione del campione dal valore medio di assorbanza usando la retta di taratura. Calcolare poi la concentrazione effettiva:

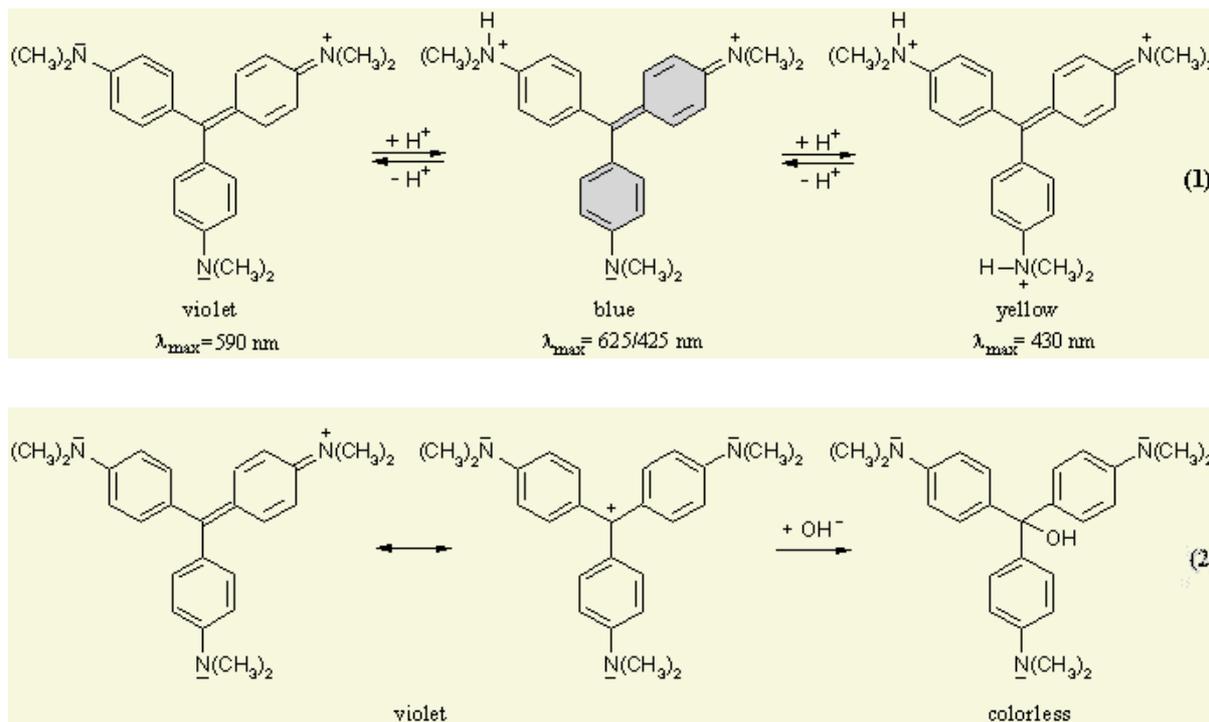
$$\text{NO}_3^- \text{ (mg/l)} = C * R$$

dove: R è il fattore di diluizione (nel nostro caso è 100/20 per l'acqua di rete e 100/99 per l'acqua commerciale) e C è la concentrazione ottenuta dalla retta di taratura.

DETERMINAZIONE DEL PUNTO ISOBESTICO DI UN INDICATORE BASICO.

PRINCIPI

L'utilizzo della spettrofotometria consente, la determinazione del punto isobestico di un indicatore acido-base. L'indicatore utilizzato è il Cristal Violetto (Exametilpararosanilina cloruro $C_{25}H_{30}N_3Cl$). Le varie colorazioni assunte dall'indicatore ai vari pH sono riassunte nello schema sottostante (con le relative strutture).



Nel nostro caso l'indicatore Cristal Violetto viene disciolto in una serie di soluzioni tampone a pH noto (tra 1 e 14). Successivamente vengono acquisiti gli spettri a ogni pH e sovrapposte le diverse curve si procederà alla determinazione del punto isobestico, ovvero all'individuazione della lunghezza d'onda alla quale tutte le soluzioni hanno lo stesso valore di assorbanza.

STRUMENTAZIONE E MATERIALI

- ➔ Spettrofotometro a doppio raggio
- ➔ Cuvette
- ➔ 6 matracci tarati da 50 ml
- ➔ Vetreria di uso corrente

REAGENTI

⇒ Soluzione di Cristal Violetto 0.1 % in Etanolo

⇒ HCl 2M, NaOH 1M, KH_2PO_4 0.1 M, Na_2HPO_4 0.1 M.

PROCEDURA

pH circa 1: Prelevare 1ml della soluzione dell'indicatore in un matraccio da 50 ml, diluire con 2 ml di acqua Milli-Q, quindi aggiungere 3 ml di HCl 2M e portare a volume con acqua Milli-Q.

pH circa 13: Prelevare 1ml della soluzione dell'indicatore in un matraccio da 50 ml, diluire con 2 ml di acqua Milli-Q, quindi aggiungere 5 ml di soluzione di NaOH 1M e portare a volume con acqua Milli-Q.

pH circa 4.5: Prelevare 1ml della soluzione dell'indicatore in un matraccio da 50 ml, aggiungere 10 ml di una soluzione 0.1 M di KH_2PO_4 e portare a volume con acqua Milli-Q.

pH circa 6.2: Prelevare 1ml della soluzione dell'indicatore in un matraccio da 50 ml, aggiungere 10 ml di una soluzione 0.1 M di KH_2PO_4 e 2 ml di una soluzione 0.1 M di Na_2HPO_4 e portare a volume con acqua Milli-Q.

pH circa 6.9: Prelevare 1ml della soluzione dell'indicatore in un matraccio da 50 ml, aggiungere 10 ml di una soluzione 0.1 M di KH_2PO_4 e 10 ml di una soluzione 0.1 M di Na_2HPO_4 e portare a volume con acqua Milli-Q.

pH circa 8: Prelevare 1ml della soluzione dell'indicatore in un matraccio da 50 ml, aggiungere 2 ml di una soluzione 0.1 M di KH_2PO_4 e 10 ml di una soluzione 0.1 M di Na_2HPO_4 e portare a volume con acqua Milli-Q.

pH circa 9: Prelevare 1ml della soluzione dell'indicatore in un matraccio da 50 ml, aggiungere 10 ml di una soluzione 0.1 M di Na_2HPO_4 e portare a volume con acqua Milli-Q.

Registrare lo spettro di assorbimento per ognuna delle soluzioni ottenute.

TRATTAMENTO DEI DATI

Sovrapporre tutti gli spettri in un unico grafico e determinare la presenza e la lunghezza d'onda del punto isobestico.

ESTRAZIONE E DETERMINAZIONE CROMATOGRAFICA DI PIGMENTI FOTOSINTETICI IN FOGLIE DI SPINACIO

PRINCIPI

La fotosintesi clorofilliana avviene nei cloroplasti delle cellule vegetali. E' un processo in base al quale anidride carbonica e acqua vengono combinate per produrre zuccheri ed amidi. Perchè questa sintesi possa avvenire, occorre dell'energia che viene fornita dalla luce del Sole. Le piante utilizzano queste sostanze e vari composti di azoto anche per produrre proteine. In questo modo, le piante sono in grado di fabbricare da sè le sostanze di cui hanno bisogno, mentre gli animali, per ottenerle, devono cibarsi di piante o di altri animali. Come "scarto" del processo fotosintetico si ha ossigeno:



Il cloroplasto è un organello citoplasmatico ricco di pigmenti fotosintetici in particolare clorofilla a, b, c, d, ficocianina, ficoeritrina, caroteni e xantofille. Sono i pigmenti che assorbiranno l'energia luminosa. I pigmenti quando vengono colpiti dalla luce si comportano come atomi eccitati (un atomo eccitato è un atomo che ha ricevuto energia e quindi i suoi elettroni sono passati a un livello energetico superiore; la tendenza dell'elettrone non è però quella di rimanere nello stato eccitato, esso infatti farà ritorno al suo livello di partenza, restituendo l'energia ottenuta). L'elettrone restituendo l'energia permette di eccitare, con questa stessa energia i pigmenti di clorofilla che vengono dopo. Il processo continua finché non si arriva ad un centro di reazione, molecola di clorofilla a, che convoglierà tutta l'energia. Una parte di questi pigmenti è solubile in acqua, un'altra è insolubile; noi ci occuperemo di quelli insolubili.

La cromatografia è un metodo di separazione delle sostanze basato sulla diversa mobilità che esse hanno in un determinato mezzo stazionario, o substrato. Se avete un miscuglio di sostanze, la cromatografia vi può consentire di separarle. Per esempio, un inchiostro è normalmente formato da una miscela di coloranti, con la cromatografia è possibile separarli. Successivamente essi possono essere analizzati, identificati, utilizzati, etc. La cromatografia viene utilizzata anche per ottenere elevate quantità di una sostanza pura. Ci sono numerosi metodi cromatografici. Fra di essi contiamo la cromatografia: su carta, quella su strato sottile (TLC), gassosa, capillare, in fase liquida, su colonna. Normalmente, il miscuglio di sostanze da separare viene inserito in un solvente. La natura del solvente e quello del mezzo stazionario possono essere scelte in un ampio spettro di possibilità. Normalmente questa scelta viene fatta in funzione delle molecole da separare e a seconda dei casi, si cerca di sfruttare la loro diversa forma, dimensione, affinità chimica verso il substrato, quantità di cariche, pH, solubilità in acqua, etc.

STRUMENTAZIONE E MATERIALI

- | | |
|------------------------------------|-------------------------|
| ➡ Spettrofotometro a doppio raggio | ➡ Micropipette |
| ➡ Mortaio e pestello | ➡ Carta Whatman 3MM |
| ➡ Centrifuga per Eppendorf | ➡ Vaschetta di sviluppo |
| ➡ Pipetta tarata da 5 ml | ➡ Foglie di spinacio |

REAGENTI

⇒ Etanolo 95% tamponato con Sodio Bicarbonato 50 mM

⇒ Etere di Petrolio:Acetone 9:1

PROCEDURA

Preparazione del campione: Lavare con acqua le foglie di spinacio ed asciugarle con carta bibula.

Estrazione dei pigmenti fotosintetici apolari: Pestare in un mortaio circa 1 grammo di foglie di spinacio in presenza di 3 ml di Etanolo 95% tamponato con Sodio Bicarbonato 50 mM al fine di basificare la soluzione e quindi mantenere stabili le clorofille che rischierebbero di perdere il Mg^{++} presente nell'anello tetrapirrolico e trasformarsi in feofitine, a causa del contenuto acido dei vacuoli riversato nella soluzione durante la macinazione.

Centrifugazione dei campioni: Trasferire, con la micropipetta, il contenuto liquido del mortaio in due eppendorf da 2 ml e centrifugare per 5 minuti. Prelevare il surnatante separato con una micropipetta e riporlo in una provetta con tappo ricoperta con stagnola.

Preparazione ed equilibratura della camera di sviluppo: Durante la centrifugazione del campione versare nella camera di sviluppo il solvente cromatografico (fase mobile), costituito da una miscela 9:1 di Etere di Petrolio / Acetone, per un'altezza di circa 1,5 cm sul fondo del recipiente; chiudere la camera con il coperchio e lasciare equilibrare per un tempo adeguato.

Semina del campione: Su una striscia di carta Whatman 3MM tracciare con una matita (non con la biro) una riga orizzontale a 3 cm dal bordo inferiore. Con l'aiuto di una micropipetta deponete aliquote di campione, lasciando asciugare tra una pipettata e l'altra, per una larghezza di circa 4 cm. Alla fine dell'operazione dovrete ottenere una banda colorata dal campione di circa 3 mm di spessore.

Sviluppo del cromatogramma: Inserire la carta cromatografia nella camera di sviluppo, immergendo la parte inferiore nel solvente ed avendo cura che il medesimo non tocchi la zona di semina del campione. Chiudere la camera ed attendere lo sviluppo del cromatogramma.

Interruzione della corsa cromatografica: Quando il fronte del solvente avrà quasi raggiunto l'apice della carta cromatografica, rimuoverla dalla vaschetta e con una matita segnare il punto di arrivo del solvente e circolettare le bande gialle e verdi che si saranno evidenziate; quindi lasciare il cromatogramma ad asciugare sotto cappa.

R_f : Calcolate il valore di R_f per ciascuna banda che avrete isolato (in riferimento alla linea di matita, R_f = percorso del soluto / percorso del solvente).