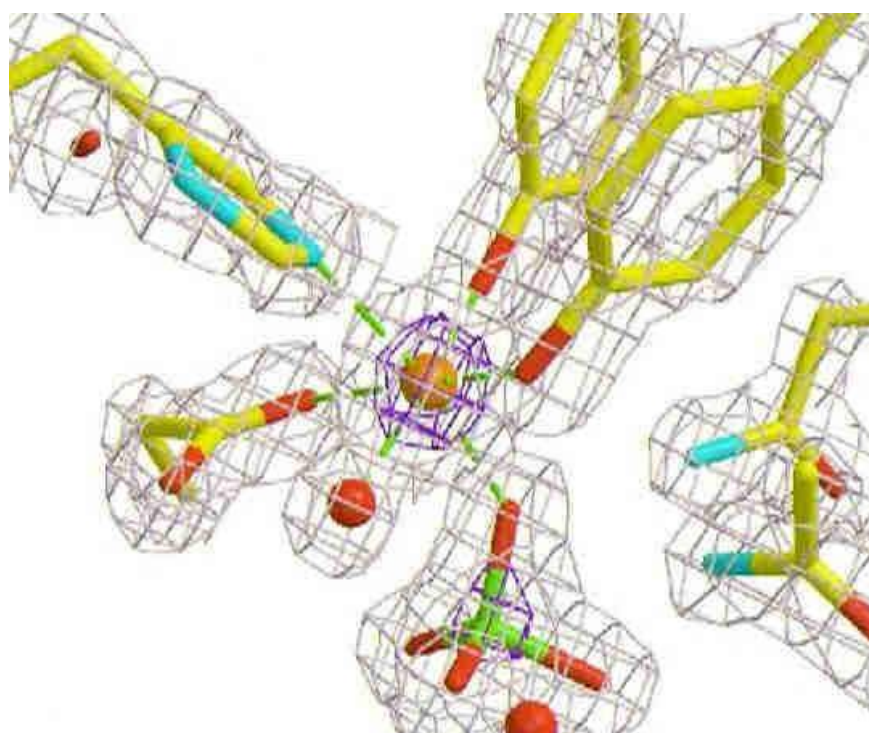


UNIVERSITA' DI VERONA
DIPARTIMENTO DI
BIOTECNOLOGIE
LAUREA IN BIOTECNOLOGIE



LABORATORIO DI
CHIMICA FISICA

ANNO ACCADEMICO 2014-2015

Calorimetria in soluzione: studio dell'entalpia di trasferimento dei protoni alla glicina

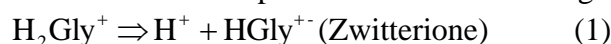
Scopo dell'esperimento: determinazione delle entalpie molari dei due stadi del trasferimento dei protoni alla glicina.

Bibliografia: R. W. Ramette (1984) J. Chem Educ. **61** 76-77.

Strumenti: calorimetro per soluzioni Parr.

Principi teorici

Gli effetti calorici che accompagnano le reazioni chimiche sono tra i fenomeni fondamentali ed informativi studiati dai chimici. In questo esperimento ci proponiamo di determinare le entalpie molari dei due stadi del trasferimento dei protoni all'amminoacido glicina



Il calorimetro sarà usato per trovare le quantità di calore assorbito o liberato quando si mescolano quantità note di glicina con cloruro di sodio, acido cloridrico e idrossido di sodio. I cambiamenti di entalpia calcolati non saranno i valori standard perché gli esperimenti si faranno a concentrazioni di elettrolita di 0.3 M. Tuttavia, gli effetti della forza ionica su questi valori non sono molto grandi.

I valori delle costanti di equilibrio per le reazioni di cui sopra sono stati misurati da King per un intervallo molto largo di temperature usando celle galvaniche basate sull'elettrodo d'idrogeno. Il risultato è il seguente:

$$\text{pK}_1 = -46.7920 + \frac{2378.22}{T} + 16.64 \text{ Log } T \quad (3)$$

$$\text{pK}_2 = -16.1083 + \frac{3165.76}{T} + 6.09 \text{ Log } T \quad (4)$$

I valori di ΔH si possono calcolare facilmente da queste equazioni usando la relazione termodinamica:

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (5)$$

I valori così calcolati possono essere confrontati con i risultati calorimetrici ottenuti da questo esperimento.

Procedura

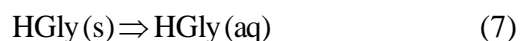
Questo esperimento richiede tre misure separate usando soluzioni 0.3 M di cloruro di sodio, acido cloridrico e idrossido di sodio.

Studio della reazione (1)

Preparare la cella calorimetrica con 100 ml di acido cloridrico 0.3 M nel compartimento di Dewar e con circa 20 mmoli di glicina (HGly) nel compartimento per il campione solido. Quando i due saranno mescolati ci sarà un cambio di temperatura dovuto alla reazione



Notare che la reazione (6) non è semplicemente l'inversa della reazione (1) perché la glicina è stata aggiunta come un solido invece che sciolta in acqua. E' per questo che è necessario fare un'altra misura calorimetrica, usando 100 ml di cloruro di sodio 0.3 M. Questa misura ci darà l'effetto di una forza ionica analoga a quella della reazione (6) ma questa volta non ci sarà reazione di trasferimento del protone.



Se il cambio di entalpia molare osservato nella reazione (6) è sottratto da quello della reazione (7), il risultato è il cambio di entalpia della reazione (1).

Studio della reazione (2)

Preparare la cella calorimetrica con 100 ml di idrossido di sodio 0.3 M e di nuovo aggiungere la glicina solida. La reazione è



Per ottenere il cambiamento di entalpia della reazione (2) è necessario usare non solo il calore di soluzione determinato per la reazione (7) ma introdurre anche il calore di formazione dell'acqua:

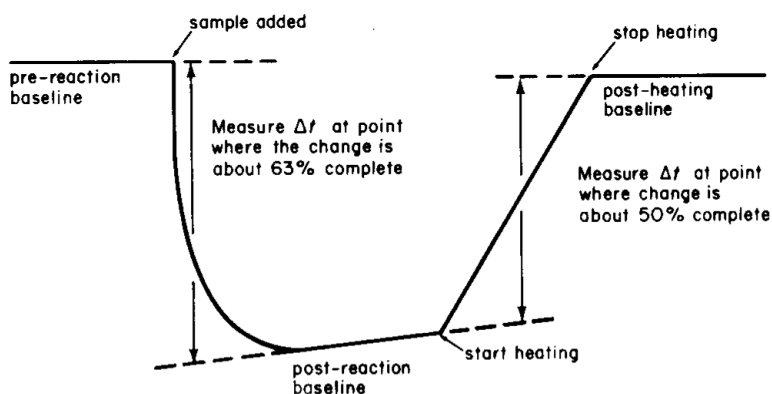


Notare che $\Delta H_2 = \Delta H_8 - \Delta H_7 - \Delta H_9$. Il cambiamento di entalpia della reazione (9) è di -13.340 Kcal mol⁻¹ a forza ionica zero e -13.550 Kcal mol⁻¹ a forza ionica 0.5. Si può usare il valore interpolato di -13.465 Kcal mol⁻¹.

Interpretazione dei dati

Ogni termogramma ha cinque parti: una linea di base di pre-reazione, un cambiamento di temperatura dovuto alla reazione, una linea di base di post-reazione, un incremento di temperatura dovuto alla calibrazione di riscaldamento e una linea di base di post-riscaldamento. Per determinare i cambiamenti di temperatura esatti è necessario estrapolare le linee di base come si vede nella figura.

Lo scopo del riscaldamento elettrico è la determinazione della capacità calorica, C_p , del



Typical thermogram for an endothermic reaction.

calorimetro in condizioni identiche a quelle usate per la reazione chimica. Per calibrare il calorimetro si devono misurare la corrente e la tensione applicati alla resistenza riscaldante.

Il cambio calorico associato ad una reazione chimica si calcola usando il cambio di temperatura Δt osservato nel termogramma di reazione:

$$Q = -C_p \Delta t \quad (10)$$

dove il segno meno si usa per soddisfare la convenzione che il calore liberato ha un segno negativo.

Alla fine, il cambiamento di entalpia per mole di glicina viene ricavato dalla formula

$$\Delta H = \frac{Q}{n} \quad (11)$$

dove n è la quantità in moli di glicina usata nella determinazione.

Il problema della protonazione incompleta della glicina

Quando si aggiunge la glicina solida ad un leggero eccesso di acido cloridrico la reazione $\text{HGly} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{Gly}^+$ non procede quantitativamente perché la specie protonata è un acido abbastanza forte (pK_a circa 2.37). Questo vuol dire che il cambio calorico osservato per la reazione (6) deve essere interpretato come

$$\begin{aligned} Q_6 &= Q_7 - Q_1 \\ &= n \cdot \Delta H_7 - \alpha n \cdot \Delta H_1 \end{aligned} \quad (12)$$

dove α è la frazione di glicina presente come H_2Gly^+ nella miscela di equilibrio.

Se si conoscono le concentrazioni iniziali (pre-reazione) dell'acido cloridrico e della glicina, 0,300 e $\frac{n}{0.1}$ rispettivamente, il valore di α può essere stimato dalla relazione stechiometria/equilibrio

$$\begin{aligned} K_1 &= \frac{[\text{H}^+][\text{HGly}]}{[\text{H}_2\text{Gly}^+]} \\ &= \frac{(0.3 - (\alpha n/0.1))(n/0.1 - (\alpha n/0.1))}{(\alpha n/0.1)} \\ &= \frac{(0.3 - (\alpha n/0.1))(1 - \alpha)}{\alpha} \end{aligned} \quad (13)$$

Il valore esatto di K_1 si può calcolare dai risultati di King (equazione 3) e quindi questa espressione si può semplificare e risolvere con la formula quadratica. Il valore di ΔH_1 si può quindi calcolare riordinando l'equazione (12).

Note

- 1 Preparare tabelle con le masse della glicina, i valori di Δt calcolati dal termogramma, i valori di Q , C_p e ΔH . Calcolare i cambiamenti di entalpia per le reazioni di dissociazione acida, (1) e (2) e comparare i risultati ottenuti con quelli dedotti dagli studi del pK di King. Cercare l'entalpia di formazione della glicina solida e calcolare l'entalpia di formazione della glicina (aq). Calcolare i cambiamenti di entropia per le reazioni (1) e (2) e suggerire una spiegazione per il segno ottenuto.
- 2 Lo stesso metodo usato per la glicina può essere applicato ad altri amminoacidi.

Spettrofotometria: determinazione della costante di dissociazione

Scopo dell'esperimento: determinazione delle costanti di dissociazione di acidi e basi deboli con il metodo spettrofotometrico.

Bibliografia: Oelke/M.A.C.T.L.A.C. *Laboratory Physical Chemistry*, pp. 284-287. Van Nostrand 1969.

Strumenti: spettrofotometro, celle bilanciate, pHmetro.

Principi teorici

Il logaritmo negativo della costante di dissociazione (pK_a) di una sostanza è uguale al pH di una soluzione che contenga lo stesso numero di molecole dissociate e non dissociate. Un metodo approssimativo ma semplice per determinarla consiste nel dissolvere una quantità pesata della sostanza, aggiungere esattamente la metà della quantità equivalente di acido cloridrico (per le basi) o di idrossido di sodio (per gli acidi) e determinare il pH della soluzione risultante. Un metodo più elegante consiste nel titolare la sostanza con un acido o una base e determinare il punto di flesso della curva. Molto usato è il metodo spettrofotometrico in cui viene determinata l'assorbanza (visibile o ultravioletta) di tre soluzioni molto diluite del composto. La prima è fortemente acida, la seconda fortemente basica, e la terza si tampona in modo che dia un'assorbanza circa a metà strada fra quella della soluzione acida e quella della soluzione basica.

Se per esempio vogliamo determinare la costante di dissociazione di una base organica B, prepariamo queste tre soluzioni diluite (5×10^{-5} M). Nella soluzione fortemente acida, la base sarà completamente ionizzata, BH^+ . Nella soluzione fortemente basica sarà nella forma completamente non ionizzata, B. Scegliendo adeguatamente un tampone, è possibile ottenere quantità approssimativamente uguali delle due forme o della forma intermedia m. Il valore esatto di pK_a si può allora calcolare dall'equazione:

$$pK_a = pH_m + \log \frac{A_B - A_m}{A_m - A_{BH^+}}$$

dove pH_m è il pH della soluzione intermedia tamponata. Il secondo termine contiene A_B , l'assorbanza della molecola senza carica, A_{BH^+} quella della molecola completamente ionizzata e A_m l'assorbanza della forma intermedia.

Procedura

Preparare soluzioni 0.2 N (circa 100 ml di ognuna) di acido cloridrico, cloruro di potassio, acetato di sodio, acido acetico, borato di sodio, acido borico e idrossido di sodio. Usando queste soluzioni preparare soluzioni di pH circa 2, 4, 6, 7 e 8.

- pH = 2 Mescolare cloruro di potassio (25 ml) e acido cloridrico (6.5 ml).
pH = 4 Aggiungere lentamente acido acetico a 25 ml di acetato di sodio fino a raggiungere il pH desiderato.
pH = 6, 7, 8 Mescolare il borato di sodio e l'acido borico nelle proporzioni giuste per ottenere questi tamponi. Se richiesto si può aggiungere idrossido di sodio al borato di sodio per ottenere il pH =8.

E' possibile usare anche altri sistemi tampone. Non è necessario che le soluzioni abbiano esattamente i pH 2, 4, 6 e 8 ma i valori non dovrebbero essere diversi più di 0.3 unità di pH. Il pH di ogni soluzione deve essere determinato in modo preciso con un pHmetro.

Per determinare le costanti di dissociazione, le basi si devono pesare come i loro cloridrati e gli acidi come i loro sali di sodio o come gli acidi liberi se sono solubili in acqua. Se una sostanza è insolubile in acqua, la si dissolve in alcool etilico. Dopo averla mescolata col tampone, si otterrà una soluzione idroalcolica al 50%. I valori in 50% alcool non sono gli stessi di quelli in acqua e quindi si deve tenere presente il solvente usato nell'esperimento. La concentrazione delle sostanze deve essere 1×10^{-4} M (preparare 100 ml).

Per le misure mescolare porzioni di 10 ml della soluzione 1×10^{-4} M con 10 ml di ogni tampone ottenendo concentrazioni finali di 5×10^{-5} M. Mescolare inoltre 10 ml della soluzione 1×10^{-4} M con un volume uguale di 0.2 N acido cloridrico in modo da convertire tutta la sostanza alla sua forma ionica, e con un volume uguale di idrossido di sodio 0.2 M per convertire la sostanza alla forma basica libera. Il pH di ogni soluzione va misurato accuratamente prima di misurare le assorbanze delle soluzioni. Ogni soluzione si confronterà con il suo tampone diluito con acqua o alcool in relazione al solvente usato per il composto in esame.

Le misure si devono fare ogni 10 nm. Se si usa una sostanza colorata l'intervallo sarà fra 400 e 700 nm. A una o più lunghezze d'onda, tutte le soluzioni dovrebbero avere la stessa assorbanza, questo è il cosiddetto *punto isobestico*. Per sostanze non colorate le misure si faranno da 400 nm al limite inferiore dello strumento (circa 220 nm).

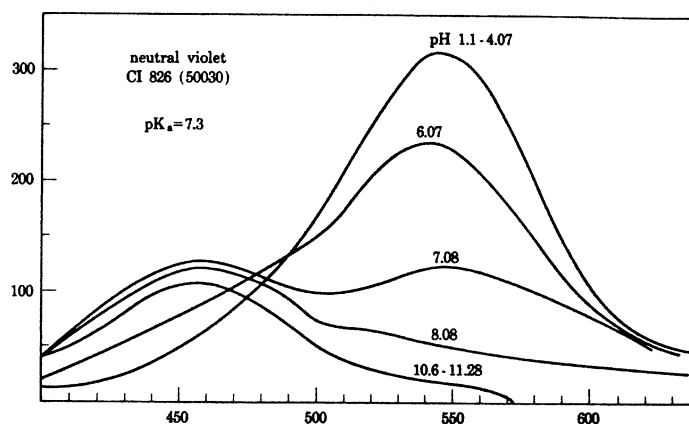


FIG. 1. A typical family of curves.

Calcolo del pKa

I valori usati comprendono sempre le soluzioni in acido cloridrico e idrossido di sodio. Il terzo valore scelto è quello del tampone con un valore di pH intermedio fra questi. L'equazione che usiamo è:

$$\text{pK}_a = \text{pH}_m + \log \frac{A_B - A_m}{A_m - A_{\text{BH}^+}}$$

dove A_B è l'assorbanza della molecola non carica (in NaOH), A_{BH^+} è l'assorbanza dello ione completamente dissociato (in HCl) e A_m è l'assorbanza di una miscela di molecole cariche e non (in soluzione tampone). I valori usati non dovrebbero essere più vicini di 10 nm al punto isosbastico, o al massimo o al minimo. I valori più attendibili sono quelli che si trovano circa a metà di questi punti. Misurare almeno 6 valori di pK_a a diverse lunghezze d'onda e calcolare la media. Tabulare i risultati sotto "Lunghezza d'onda", "assorbanza" e " pK_a ". Annotare le lunghezze d'onda dei punti isosbastici e i valori dei massimi e dei minimi. Rappresentare le curve di assorbanza.

Note

- 1 In questo esperimento si possono usare alcuni coloranti basici; però se si usano sostanze non colorate risulta più evidente l'utilità del metodo. Si suggeriscono l'acido benzoico, mandelico, fenilacetico, l'anilina, toluidina, naftilammina e la benzilammina. L'esperimento è più impegnativo ma forse più interessante se si usa un amminoacido come la glicina o una sostanza dibasica come l'acido succinico o ftalico. Le differenze fra gli acidi e basi alifatici e aromatici si vedono bene confrontando acido benzoico e fenilacetico o toluidina e benzilammina.
- 2 Quando si lavora nell'UV bisogna tenere presente che anche il tampone può essere fra le specie che assorbono luce.

Cinetica enzimatica: determinazione dell'energia di attivazione di una reazione di idrolisi catalizzata da un enzima e da un acido

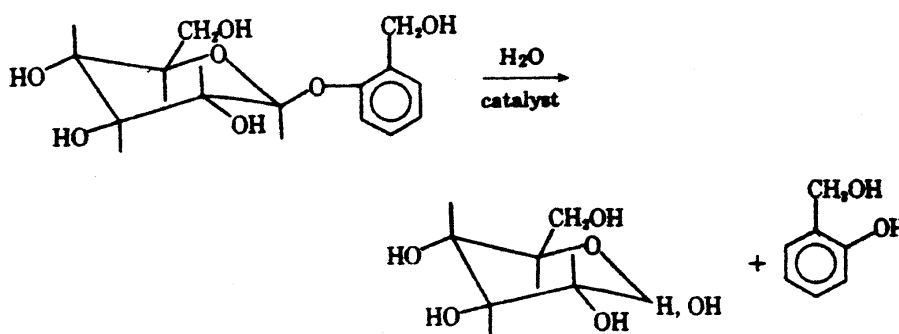
Scopo dell'esperimento: determinazione dell'energia di attivazione di una reazione che può essere catalizzata da un acido o da un enzima specifico.

Bibliografia: Adams, K. R. & Meyers, M. B. (1985) *J. Chem. Educ.* 62, 86-88.

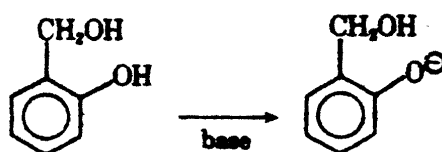
Strumenti: spettrofotometro, celle bilanciate, bagni termostatici a quattro temperature diverse.

Principi teorici

La straordinaria efficienza degli enzimi è uno degli argomenti principali discussi nei corsi elementari di biochimica. Di solito, l'azione catalitica di queste proteine viene interpretata in base alla teoria dello stato di transizione. Il profilo energetico può essere usato per comparare la cinetica di una reazione in presenza ed in assenza di catalisi enzimatica considerando le rispettive energie di attivazione. In questo esperimento si determinerà l'energia di attivazione di Arrhenius, E_a , per l'idrolisi della salicina, una reazione che può essere catalizzata sia da un acido sia dall'enzima specifico emulsina (β -D-glucosido glucoidrolasi EC 3.2.1.21).

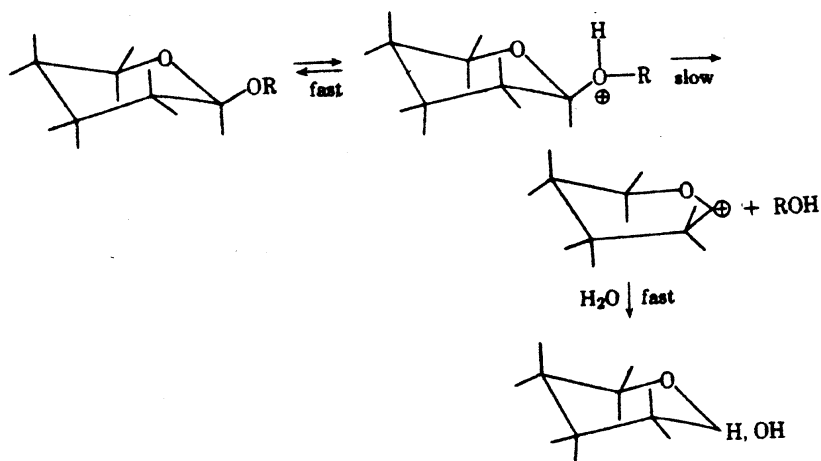


La reazione può essere seguita spettrofotometricamente prelevando in tempi successivi aliquote della miscela alle quali viene aggiunto un eccesso di base che ha la doppia funzione di fermare la reazione e di convertire l'alcool salicilico nella sua forma anionica con λ_{max} di assorbimento a 290 nm.



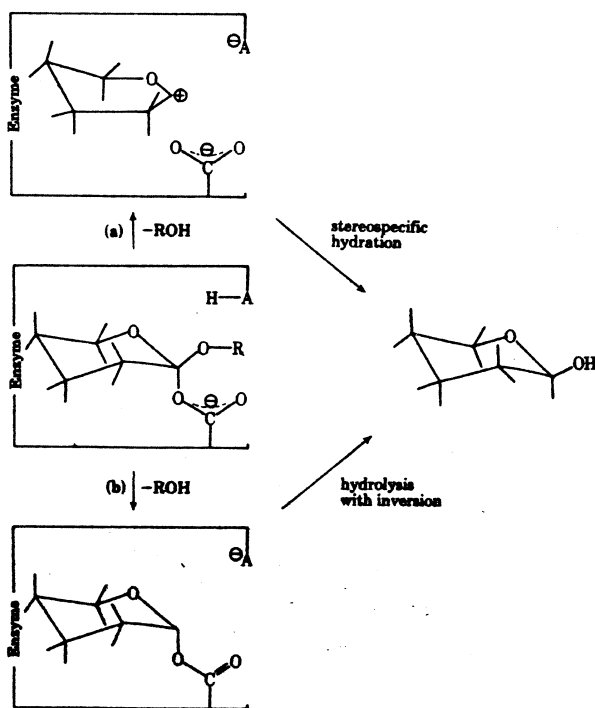
La reazione catalizzata da un acido è stata molto studiata e si sa che segue un meccanismo A1 (unimolecolare). La protonazione iniziale dell'ossigeno glicosidico è seguita dalla rottura del legame O-glicosile che rappresenta il passaggio determinante e porta alla formazione di uno ione carbonio ciclico che probabilmente si trova nella conformazione a mezza sedia.

Per la reazione enzimatica è stato proposto invece un meccanismo in due stadi.



E' stato dimostrato che il gruppo carbossilato di un acido aspartico nel sito attivo dell'enzima è coinvolto nella catalisi. La conservazione della configurazione β che si osserva si deve a uno dei due meccanismi possibili:

- (1) L'addizione stereospecifica di acqua allo ione carbonio intermedio che è stabilizzato dall'anione carbossilato oppure
- (2) Un doppio spostamento con formazione iniziale di un estere e la sua successiva idrolisi con inversione.



Nel nostro esperimento di reazione catalizzata dall'enzima la salicina sarà in grande eccesso rispetto all'enzima che sarà quindi saturato dal substrato. In queste condizioni virtualmente tutto l'enzima è presente come complesso enzima-substrato e la velocità di reazione è indipendente dalla concentrazione di salicina e quindi segue una cinetica di ordine zero. Nella reazione catalizzata dall'acido, la concentrazione del catalizzatore è molto più alta di quella della salicina. In questo caso, la velocità dipende dalla decomposizione unimolecolare della salicina protonata al suo ossigeno glicosidico, dando luogo ad una cinetica di primo ordine.

Procedura

Reazione catalizzata dall'enzima

Le soluzioni di emulsina, circa 125 unità in 70 ml di tampone 0,1 M fosfato pH= 6.0 e di salicina, 0,67 g in 100 ml dello stesso tampone si dividono in parti uguali e si mettono in bagni d'acqua a 30° C e 40° C lasciandole equilibrare un tempo adeguato. Ogni gruppo deve preparare 14 provette numerate contenenti 10 ml di NaOH 2 M. La reazione si inizia mescolando 7,5 ml della soluzione di salicina con 2,5 ml della soluzione di emulsina in una provetta ad una temperatura e si registra il tempo iniziale. Si preleva un campione di 0,3 ml immediatamente e si mette in una delle provette contenenti la base. Successivamente si ripetono questi prelievi ad intervalli di 3 minuti fino ad usare 7 provette con NaOH. Si ripete la procedura con enzima e substrato equilibrati alla temperatura di 40° C. Successivamente si legge la densità ottica a 290 nm di tutte le provette usando come bianco una miscela di 7,5 ml NaOH e 2,5 ml di acqua distillata. Le costanti di reazione di ordine zero si ottengono riportando in grafico la densità ottica in funzione del tempo (vedere la fig. 1). La pendenza della linea retta che si ottiene è la costante di velocità di ordine zero.

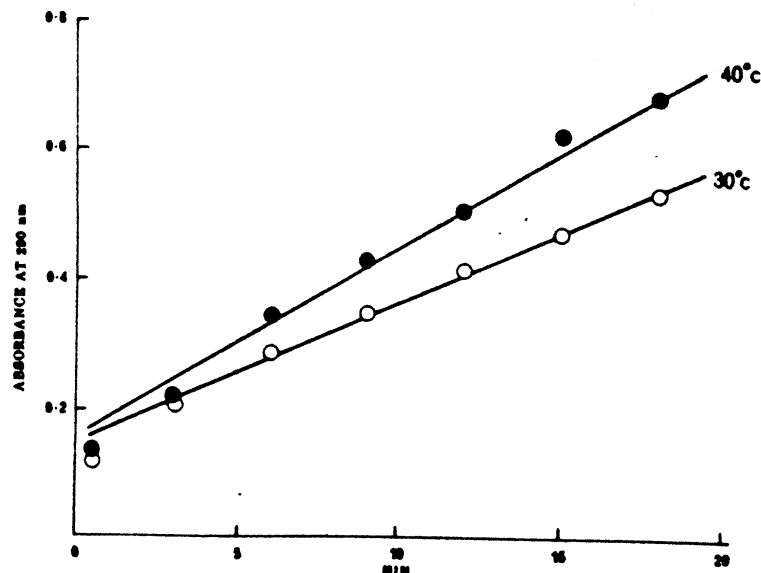


Figure 1. Zero-order plot for the enzyme-catalyzed reaction at 30°C and 40°C.

Reazione catalizzata dall'acido

Una soluzione di salicina, contenente 0,67 g in 100 ml di propanolo al 20% in acqua si divide in due parti uguali che si mettono a termostatare alle temperature di 65° C e 75° C e si lasciano equilibrare un tempo adeguato. Si preparano come prima 15 provette numerate contenenti idrossido di sodio. La reazione si inizia mescolando 7,5 ml della soluzione di salicina con 2,5 ml di acido cloridrico concentrato in una provetta parzialmente chiusa con parafilm e termostatata a 65° C. Come prima si prelevano aliquote della reazione e si ferma la reazione con la soluzione alcalina ma lo si deve fare ad intervalli di 5 minuti perché in questo caso la reazione è più lenta. Si ripete la procedura a 75° C usando altre 7 provette e facendo i prelievi ad intervalli di 3 minuti. Alla fine si mette il contenitore di reazione in acqua bollente per 15 minuti per idrolizzare completamente il campione. Si prelevano 0,3 ml di questa soluzione e si collocano nell'ultima provetta. La costante di reazione di primo ordine si ottiene sottraendo le letture di densità ottica determinate alle diverse temperature da quella del campione che ha reagito completamente e riportando in grafico il logaritmo dei valori risultanti in funzione del tempo (vedere la figura 2).

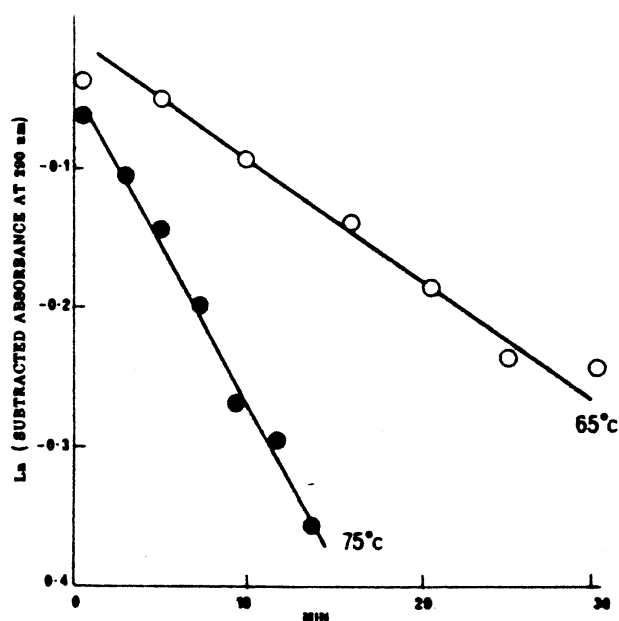


Figure 2. First-order plot of the acid-catalyzed reaction at 65°C and 75°C.

Calcolo dell'energia di attivazione

L'energia di attivazione, E_a , delle reazioni catalizzate dall'enzima e dall'acido si può calcolare facilmente usando la seguente forma dell'equazione di Arrhenius:

$$E_a = \frac{RT_2T_1 \ln \frac{k_2}{k_1}}{T_2 - T_1}$$

dove k_2 e k_1 sono le costanti di velocità alle temperature superiore e inferiore, T_2 e T_1 rispettivamente. I valori che si ottengono per E_a , sono di circa 25 Kcal/mole per l'idrolisi catalizzata dall'acido e di 6 Kcal/mole per l'idrolisi catalizzata dal enzima. Quest'ultimo valore è tipico delle energie di attivazione che si trovano per le reazioni acquose controllate dalla diffusione, quindi l'efficienza dell'emulsina come catalizzatore è probabilmente sottostimata quando la si usa alle concentrazioni che si sono scelte qui. Tuttavia, questi valori determinati sperimentalmente dimostrano chiaramente il notevole effetto dell'enzima sull'energia di attivazione della reazione.

Note

- 1 E' possibile preparare l'enzima direttamente da mandorle con una procedura molto semplice d'estrazione che richiede meno di un'ora e mezza (Mann, F. G. & Saunders, B. C., "Practical Organic Chemistry" 4th ed. Longmans, London 1960, pp. 513). Alternativamente può essere usata la preparazione commerciale.
- 2 Le curve cinetiche si possono riportare in grafico usando uno dei programmi per calcolatore che utilizzano anche tecniche di regressione e minimi quadrati.
- 3 Notare che l'energia di attivazione di Arrhenius che si calcola in questo esperimento non tiene conto degli effetti entropici.