

**METODE DE CERCETARE
ÎN BIOFIZICA MEDICALĂ
ȘI
BIOTEHNOLOGIA CELULARĂ**

**MIHAELA G. MOISESCU
EUGENIA KOVÁCS
TUDOR SAVOPOL**

**METODE DE CERCETARE
ÎN BIOFIZICA MEDICALĂ
ȘI
BIOTEHNOLOGIA CELULARĂ**



**EDITURA UNIVERSITARĂ
București, 2012**

Redactor: Gheorghe Iovan
Tehnoredactor: Ameluța Vișan
Coperta: Angelica Mălăescu

Editură recunoscută de Consiliul Național al Cercetării Științifice (C.N.C.S.)

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
MOISESCU, MIHAELA G.

**Metode de cercetare în biofizica medicală și biotehnologia
celulară** / Mihaela G. Moiescu, Eugenia Kovács, Tudor Savopol. -
București : Editura Universitară, 2012

vol.

ISBN 978-606-591-506-0

Vol. 1. - 2012. - Bibliogr. - ISBN 978-606-591-505-3

I. Kovács, Eugenia
II. Savopol, Tudor

577.3:61(075.8)

57:62(075.8)

DOI: (Digital Object Identifier): 10.5682/9786065915053

© Toate drepturile asupra acestei lucrări sunt rezervate, nicio parte din această lucrare nu poate
fi copiată fără acordul Editurii Universitare

Copyright © 2012
Editura Universitară
Director: Vasile Muscalu
B-dul. N. Bălcescu nr. 27-33, Sector 1, București
Tel.: 021 – 315.32.47 / 319.67.27
www.editurauniversitara.ro
e-mail: redactia@editurauniversitara.ro

Distribuție: tel.: 021-315.32.47 / 319.67.27 / 0744 EDITOR / 07217 CARTE
comenzi@editurauniversitara.ro
O.P. 15, C.P. 35, București
www.editurauniversitara.ro

CUVÂNT INTRODUCATIV

Volumul de față deschide o serie de cărți intitulate **Metode de Cercetare în Biofizica Medicală și Biotehnologia Celulară** în care sunt predate metode și tehnici de laborator pentru studenți de ciclu de învățământ de master.

Aceste manuale își propun să realizeze o punte între noțiunile teoretice necesare înțelegerii principiilor de bază ale unor metode de cercetare performante de biofizică și biotehnologie, aspectele practice de lucru în laborator și aplicațiile concrete ale acestora în cercetarea biomedicală.

Autorii sunt cadre didactice la **Programul de Master de Biofizică Medicală și Biotehnologie Celulară** organizat de **Universitatea de Medicină și Farmacie Carol Davila** din București și se adresează licențiaților facultăților cu profil medical și cu profil înrudit: biochimie, biologie, biofizică, bioinginerie, agronomie etc. De aceea autorii au încercat să aducă la un numitor comun cunoștințe teoretice și aptitudini de laborator care să ofere competențe interdisciplinare utilizatorilor acestor volume.

Volumul de față conține capitole dedicate unor situații clasice întâlnite într-un studiu de laborator, dar care trebuie rezolvate corect pentru a asigura reproductibilitate experimentală și capitole în care sunt detaliate tehnici specifice biofizice și de biotehnologie celulară ce pot fi utilizate în cercetarea biomedicală de excelență. O parte din protocoalele experimentale prezentate în volumul de față reprezintă variante îmbunătățite și aduse la zi ale unor lucrări cu titlu similar elaborate în sânul aceluiași grup didactic și publicate în 2002 în Manualul de lucrări practice **Biofizică și Biotehnologie Celulară - Metode de cercetare**. Însă cea mai mare parte din lucrările propuse în acest volum sunt complet noi și de nivel aprofundat deschizând drumul volumelor ulterioare prin care autorii își propun să realizeze un program educațional de nivel internațional.

Mihaela G. Moiescu

Eugenia Kovács

Tudor Savopol

1. SOLUȚII ȘI TAMPOANE

Introducere

Soluțiile sunt amestecuri omogene și izotrope, stabile în condiții experimentale date, alcătuite din cel puțin două componente chimice, dintre care una se numește **solvent**, iar celelalte **substanțe dizolvate (soluți)**.

Există soluții în toate stările de agregare:

- soluții solide – se mai numesc și *aliaje*,
- soluții lichide – cele mai uzuale,
- amestecuri gazoase – amestecurile gazoase sunt întotdeauna soluții (nu există gaze nemiscibile).

Raportul dintre cantitatea de substanță dizolvată și cantitatea totală de soluție (sau solvent) se numește **concentrație**. Concentrația unei soluții se poate exprima în mai multe feluri, în funcție de necesitățile experimentale pe care trebuie să le servească.

Definiții ale concentrațiilor

1. Concentrația procentuală a unei soluții reprezintă masa de solut (m_d) (exprimată în grame) care se găsește dizolvată în 100 g soluție (adică de solvent plus toți soluții prezenți).

Formula de definiție este prin urmare:

$$c_p = 100 \cdot \frac{m_d}{m_s}$$

(unde m_s reprezintă masa totală a soluției), iar unitatea de măsură este **procentul**.

Exemplu: să se prepare 25 g soluție 5% NaCl în apă (de acum încolo vom presupune implicit că solventul este apa).

Rezolvare: din relația de mai sus se poate calcula cantitatea de NaCl (m_d) care trebuie să se găsească în cele 25 g soluție (m_s):

$$m_{NaCl} = m_d = \frac{c_P \cdot m_s}{100} = \frac{5 \cdot 25}{100} = 1.25 \text{ g}$$

Procedura preparării constă în a cântări 1.25 g *NaCl*, peste care se adaugă apă distilată până la greutatea totală dorită a soluției (25 g), adică 25 – 1.25 = 23.75 g apă.

Prepararea unei soluții procentuale necesită deci cântărirea atât a solutului cât și a solventului și tocmai din acest motiv este mai puțin practică.

Se folosește uneori o variantă a acestei definiții: concentrația procentuală volumetrică, definită ca masă de substanță (exprimată în grame) dizolvată în 100 mL soluție. Se notează de obicei cu *w/v* adică este o concentrație „weight per volume”.

2. Concentrația molară reprezintă numărul de moli de substanță dizolvată care se găsesc într-un volum de un litru (=1000 mL) de soluție. Formula de definiție este:

$$c_M = \frac{\nu}{V(L)} = \frac{m_d}{\mu \cdot V(L)}$$

unde ν reprezintă numărul de moli de substanță dizolvată, $V(L)$ este volumul soluției (exprimat în litri), m_d este masa de solut (în grame), iar μ este masa molară a solutului ($g \cdot mol^{-1}$). Unitatea de măsură a concentrației molare este $mol \cdot L^{-1}$, care se mai numește și **molar** și se notează cu *M*.

De exemplu, când spunem că avem o soluție 0.1 M *NaCl*, înseamnă că într-un litru din acea soluție găsim dizolvați 0.1 moli *NaCl*.

Exemplu: să se prepare 50 mL soluție 0.1 M NaCl.

Rezolvare: ținând cont de faptul că masa molară a *NaCl* este 23 + 35.5 = 58.5 $g \cdot mol^{-1}$, rezultă că masa de clorură de sodiu care trebuie cântărită este:

$$m_d = c_M \cdot \mu \cdot V(L) = 0.1 \text{ mol} \cdot L^{-1} \cdot 58.5 \text{ g} \cdot mol^{-1} \cdot \frac{50}{1000} L = 0.2925 \text{ g}$$

Procedura de preparare constă în a cântări 0.2925 g de clorură de sodiu care se transferă cantitativ într-un balon cotat de 50 mL după care balonul se aduce la semn cu apă distilată.

Avantajele definirii concentrației molare constau în:

- Soluțiile sunt ușor de preparat (nu necesită cântărirea solventului, care uneori – de exemplu în cazul solvenților volatili – poate fi foarte anevoioasă și chiar neplăcută!)
- Calculele stoichiometrice se efectuează mult mai ușor cu soluții a căror concentrație este definită molar, pentru că putem calcula foarte ușor numerele de moli de substanță dizolvată în diferite volume de soluție.

3. Concentrația echivalentă (i se mai spune și **concentrație normală** sau **valară**) se definește ca fiind numărul de echivalenți gram (sau vali) dintr-o substanță care se găsesc într-un litru (1000 mL) de soluție.

Unitatea de măsură este $val \cdot L^{-1}$ sau N .

Amintim cum se calculează cantitatea echivalentă (E_g) de substanță pentru principalele clase de substanțe:

Acizi: masa molară a acidului se împarte la numărul de atomi de hidrogen ionizabili (bazicitatea acidului). Exemple:

$$E_{g\ HCl} = \frac{\mu_{HCl}}{1} = 36.5\ g \cdot val^{-1}$$
$$E_{g\ H_2SO_4} = \frac{\mu_{H_2SO_4}}{2} = 49\ g \cdot val^{-1}$$

Baze: masa molară se împarte la numărul de protoni pe care îi poate accepta baza (adică la aciditatea bazei). Exemple:

$$E_{g\ NaOH} = \frac{\mu_{NaOH}}{1} = 40\ g \cdot val^{-1}$$
$$E_{g\ Ca(OH)_2} = \frac{\mu_{Ca(OH)_2}}{2} = 37\ g \cdot val^{-1}$$

Săruri și oxizi: masa molară se împarte la produsul dintre numărul cationilor și sarcina electrică a acestora. Exemple:

$$E_{g\ Na_2SO_4} = \frac{\mu_{Na_2SO_4}}{2 \times 1} = \frac{142}{2} = 71\ g \cdot val^{-1}$$
$$E_{g\ Ca_3(PO_4)_2} = \frac{\mu_{Ca_3(PO_4)_2}}{3 \times 2} = \frac{310}{6} = 51.6667\ g \cdot val^{-1}$$

În cazul *reacțiilor redox*, calculul se efectuează prin împărțirea masei molare la numărul de electroni transferați de molecula respectivă în cursul reacției.

Definiția concentrației normale este:

$$c_N = \frac{n_{E_g}}{V(L)} = \frac{m_d}{E_g \cdot V(L)}$$

unde n_{E_g} reprezintă numărul de echivalenți gram de substanță dizolvată (numărul de vali) și se calculează ca raport între masa de substanță dizolvată și echivalentul gram al substanței respective, $V(L)$ este volumul de soluție exprimat în litri, iar E_g este echivalentul gram al substanței dizolvate.

Exemplu: să se prepare 200 mL soluție 0.2 N Na_2SO_4 .

Rezolvare: masa de sulfat disodic de cântărit este:

$$m_d = c_N \cdot E_g \cdot V(L) = 0.2 \text{ val} \cdot L^{-1} \cdot 71 \text{ g} \cdot \text{val}^{-1} \cdot 0.2 \text{ L} = 2.8400 \text{ g}$$

Procedura de preparare constă în cântărirea acestei mase, transferarea ei într-un balon de 200 mL și aducerea la semn cu apă distilată.

4. Concentrația molară este definită ca numărul de moli de substanță dizolvată într-un kilogram de solvent. Această concentrație este mai puțin folosită în experimentele obișnuite de laborator. Ea este foarte utilă atunci când este necesară măsurarea unor parametri termodinamici ai soluțiilor.

5. Frația molară a unui compus dintr-un amestec este raportul dintre numărul de moli ai compusului respectiv și numărul total de moli ai tuturor compușilor din amestec (inclusiv solventul). Acest tip de concentrație este util în special în calcule termodinamice.

Comparație între diferitele tipuri de concentrații

Concentrația procentuală se folosește atunci când nu este necesară o mare precizie. De obicei nu se prepară prin cântăriri pretențioase și nu se folosește pentru prepararea unor amestecuri stoechiometrice (adică

amestecuri care să respecte proporțiile chimice în care diferite substanțe reacționează).

Concentrația molară este o concentrație care se folosește pentru soluțiile preparate cu mare precizie. Cântărirea se face întotdeauna cu precizie de „4 zecimale” adică de zecime de miligram (sensibilitatea obișnuită a balanțelor analitice). Marele avantaj al acestor soluții este că raportul stoichiometric în care două substanțe reacționează este același cu raportul volumelor unor soluții de molarități egale ale celor două substanțe.

Folosirea *concentrației normale* simplifică și mai mult calculele pentru că, indiferent de raportul molar în care doi compuși chimici reacționează, pentru o amestecare stoichiometrică se vor folosi volume egale din soluții de normalități egale (pentru că întotdeauna substanțele participă la o reacție în cantități echivalente, conform uneia dintre legile fundamentale ale chimiei).

Demonstrați această afirmație pentru cazul particular al neutralizării NaOH cu H₂SO₄!

Dacă se utilizează exprimarea molară a concentrației, atunci, pentru a obține un amestec stoichiometric, va trebui să folosim (la concentrații molare egale) volume de soluție care se află în rapoarte egale cu rapoartele molare ale ecuației reacției chimice respective.

Demonstrați această afirmație pentru cazul particular al neutralizării Ca(OH)₂ cu HCl!

Interconversii ale diferitelor tipuri de concentrații

De foarte multe ori este util să trecem de la un mod de exprimare a concentrației unei soluții la altul.

Transformarea concentrației procentuale în concentrație molară

Deoarece concentrația procentuală este exprimată în funcție de masa totală de soluție, iar cea molară în funcție de volumul soluției, interconversia celor două mărimi necesită cunoașterea densității soluției, ρ . Relația de interconversie este:

$$c_M = \frac{\rho \text{ (g} \cdot \text{cm}^{-3}\text{)}}{100 \cdot \mu \text{ (g} \cdot \text{mol}^{-1}\text{)}} \cdot c_P$$

Demonstrați relația!

Transformarea concentrației normale în concentrație molară

Relația între aceste două definiții este mult mai simplă. Raportul lor reprezintă raportul de masă între masa molară a substanței dizolvate și masa echivalentului gram al aceleiași substanțe:

$$c_N = c_M \cdot \frac{\mu(g \cdot mol^{-1})}{E_g(g \cdot val^{-1})}$$

Demonstrați relația!

Exemplu: o soluție 1 M H_2SO_4 este identică cu o soluție 2 N H_2SO_4 pentru că, în acest caz

$$\frac{\mu}{E_g} = \frac{98 g \cdot mol^{-1}}{98/2 g \cdot val^{-1}} = 2 val \cdot mol^{-1}$$

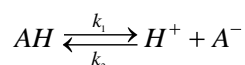
În cazul unei soluții $NaOH$, valorile celor două concentrații sunt identice deoarece raportul μ/E_g este egal cu unitatea.

Soluții tampon

Soluțiile tampon sunt amestecuri care au proprietatea de a menține constantă aciditatea (bazicitatea) mediului în care se găsesc.

Pentru a descrie aceste soluții este necesar să recapitulăm câteva noțiuni de bază legate de acizi și baze. În primul rând să ne reamintim că acizii sunt substanțe care pot ceda protoni, iar bazele sunt substanțe care pot accepta protoni.

Acizii și bazele pot fi clasificați în „tari” și „slabi”. Se numesc acizi și/sau baze slabe cei care, în soluție, sunt incomplet disociați, ei existând în soluție ca un amestec aflat la echilibru între forma disociată și cea nedisociată. De exemplu, acidul acetic există în soluție ca amestec aflat la echilibru conținând ioni de acetat (CH_3COO^- , notat în continuare A^-), ioni de hidroniu (pe care îi vom reprezenta pentru simplificare ca ioni de hidrogen, H^+) și molecule nedisociate de acid acetic (CH_3COOH , notat AH), conform ecuației chimice:



unde k_1 este constanta de viteză a procesului de disociere a moleculei de acid acetic, iar k_2 este constanta de viteză a procesului de neutralizare a ionului acetat.

Afirmația de mai sus este valabilă pentru orice acid slab.

Viteza procesului de disociere, $-d[AH]/dt$, depinde de valoarea constantei de viteză de disociere, k_1 și de concentrația acidului din soluție, conform legii:

$$-d[AH]/dt = k_1[AH]$$

În mod similar, viteza de asociere depinde de constanta de viteză k_2 , precum și de concentrațiile speciilor A^- și H^+ , conform relației:

$$-d[A^-]/dt = k_2[A^-][H^+]$$

Deoarece în condițiile echilibrului, cele două viteze sunt egale, rezultă că:

$$k_1[AH] = k_2[A^-][H^+]$$

sau

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]}$$

Raportul $k_1/k_2 = K_a$ se numește constanta de aciditate a acidului respectiv. Rezultă succesiv:

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]}$$

$$[H^+] = \frac{K_a[AH]}{[A^-]}$$

în care concentrația ionilor de hidrogen este exprimată în funcție de valoarea constantei de aciditate și de raportul concentrațiilor la echilibru ale acidului nedisociat și a ionului conjugat corespunzător.

pH și pK_a

Prin definiție

$$pH = \log_{10}[H^+]$$

În mod similar pK_a se definește ca fiind $pK_a = \log_{10}[K_a]$. Prin logaritizarea expresiei concentrației de protoni și ținând cont de aceste definiții, obținem:

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[A^-]}{[AH]}$$

În situația specială în care concentrația ionilor A^- este egală cu cea a moleculelor de acid nedisociat, raportul $[A^-]/[AH]$ devine egal cu unitatea și prin urmare $pH = pK_a$. În cazul acidului acetic, $pK_a = 4.745 M^{-1}$ în soluții apoase, la 20 °C.

În mod similar se poate defini și o constantă de bazicitate K_b și corespunzător un pK_b . Relația între cele două mărimi, în cazul soluțiilor apoase, este:

$$pK_a + pK_b = 14$$

Efectul de tamponare; capacitatea de tamponare

Să examinăm modul cum variază aciditatea unei soluții netamponate la care se adaugă o anumită cantitate de acid tare.

Să presupunem că adăugăm 100 mL soluție HCl $10^{-2} M$ ($pH = 2$ deoarece acidul clorhidric este un acid tare, deci complet disociat), la un litru soluție netamponată de $1 M NaCl$ (aflată, deci, inițial la $pH = 7$). Deoarece contribuția ionilor de hidrogen proveniți de la soluția de acid este cu câteva ordine de mărime mai mare decât cea a ionilor proveniți de la soluția salină, putem, cu o bună aproximație, să calculăm aciditatea soluției finale ținând cont numai de ei: notând cu $[H^+]_i$ concentrația protonilor din soluția de acid dinainte de amestecare și cu $[H^+]_f$ concentrația protonilor după amestecarea soluțiilor, putem scrie succesiv:

$$[H^+]_i V_i = [H^+]_f V_f$$