

Appendice cap. 20: applicazioni

Per una reazione del 1° ordine, l'equazione differenziale, ovvero la **forma differenziale della legge cinetica**, assume la forma

$$-d[A]/dt = k [A] \quad (1)$$

$$\text{ovvero } v = k [A] \quad (2)$$

da cui, risolvendo, ossia calcolandone l'integrale, si ottiene

$$\ln [A]/[A]_0 = -kt \quad (3)$$

e quindi

$$[A] = [A]_0 \cdot e^{-kt} \quad (4)$$

Infine, la stessa legge può anche essere espressa in funzione del prodotto, P. Nel caso più semplice in cui i rapporti stechiometrici di reazione sono unitari, si ha può infatti scrivere che

$$[A] = [A]_0 - [P] \quad (5)$$

Sostituendo pertanto nella (4) si ottiene

$$[P] = [A]_0 (1 - e^{-kt}) \quad (6)$$

La (4) e la (6) rappresentano le **forme integrate della legge cinetica** per le equazioni del 1° ordine.

Su queste basi, sono stati elaborati due importanti metodi cinetici di analisi, detti appunto Metodo differenziale e Metodo integrale.

METODO DIFFERENZIALE

Come dice la parola stessa, il metodo utilizza la forma differenziale della legge cinetica, che nel caso delle cinetiche del primo ordine assume la forma dell'equazione (1) sostituendo nella quale la 4 si ottiene:

$$[A]_0 = v/k \cdot e^{-kt} \quad (7)$$

In definitiva, conoscendo:

- la costante di velocità della reazione, k
- la velocità, v , di scomparsa dell'analita A (o, se si preferisce, la corrispondente velocità di comparsa di un prodotto P) a un determinato istante (tempo) t

si può ricavare la concentrazione iniziale dell'analita.

■ Applicazione

Il nodo centrale dell'applicazione del metodo appena proposto consiste nel scegliere adeguatamente l'istante di tempo t in cui viene misurata la velocità della reazione. In pratica, anche se talvolta è necessario e preferibile effettuare le misure quando la reazione è in pieno svolgimento, a causa della probabile presenza di reazioni collaterali o della obiettiva difficoltà di misurare la velocità in un dato istante, si preferisce spesso misurare la velocità iniziale, perché la curva che dà la scomparsa dei reagenti (o la comparsa dei prodotti) è, nel primo tratto, sostanzialmente rettilinea, per cui la sua pendenza può essere facilmente ricavata dalla sua tangente nel punto zero.

In figura 1 viene illustrata l'applicazione del metodo differenziale per determinare la concentrazione dell'analita A, facendo in modo che esso sia coinvolto in una reazione dello pseudo-primo ordine. Ciò si ottiene inserendo un determinato reagente in eccesso e seguendo, per esempio per via spettrofotometrica, l'aumento della concentrazione del prodotto P (ossia misurando l'aumento dell'assorbanza nel tempo a una determinata lunghezza d'onda).

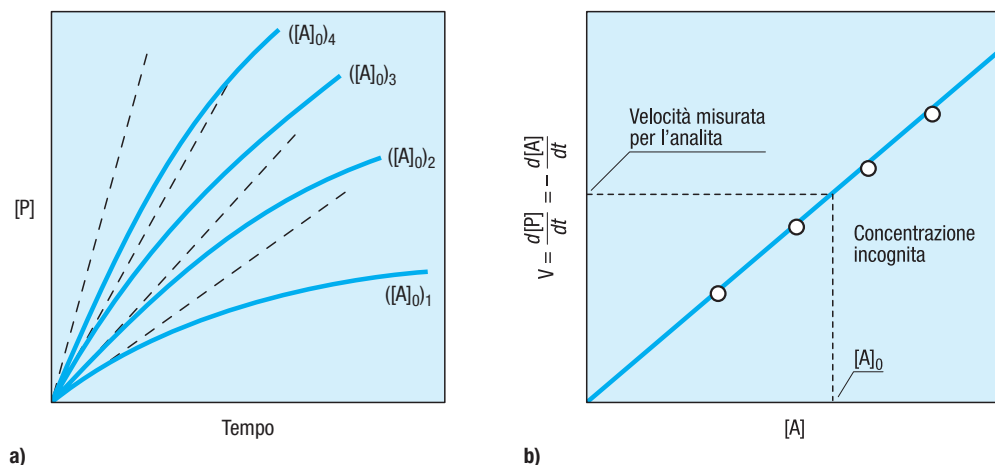


Figura 1

Grafici sperimentali per la determinazione dell'analita A con il metodo differenziale:

a) variazione della concentrazione di P nel tempo e tangenti al tempo zero per quattro diverse concentrazioni di A; **b)** grafico velocità iniziale/concentrazione

Il procedimento si sviluppa in tre fasi:

1. Figura 1a
Si tracciano su di. un grafico le curve che esprimono variazione della concentrazione del prodotto P in corrispondenza di quattro diverse concentrazioni iniziali di A. Sulla base dei grafici, si tracciano le quattro tangenti al punto zero, determinando le quattro diverse velocità iniziali della reazione
2. Figura 1b
Si traccia un grafico, riportando la velocità iniziale in funzione delle concentrazioni degli standard. La curva di calibrazione viene tracciata con il metodo della regressione.
3. Dopo aver applicato il medesimo procedimento al campione incognito, se ne ricava il valore della velocità iniziale dal relativo grafico cinetico e quindi si risale alla concentrazione incognita mediante la curva di calibrazione.

METODO INTEGRALE

Il metodo utilizza la legge cinetica nella forma integrale, che nel caso delle cinetiche del primo ordine può essere scritta nei modi visti. Le possibilità di applicazione sono più d'una, ma senz'altro la più immediata è rappresentata dal cosiddetto *metodo grafico*.

Esso consiste nel far ricorso all'equazione integrata nella forma, che si ricava direttamente dalla (3):

$$\ln [A] = \ln [A]_0 - kt \quad (8)$$

■ Applicazione

In pratica, il procedimento è il seguente:

1. Si registra la variazione della concentrazione dell'analita nel tempo (per esempio, per via spettrofotometrica).
2. Si riporta su di un grafico, in ascissa il tempo e in ordinata il corrispondente valore di $\ln [A]$.

In tal modo si otterrà una retta con pendenza negativa, corrispondente alla costante di velocità, k e che intercetta l'asse delle ordinate in corrispondenza del valore di $\ln [A]_0$, da cui si risale immediatamente al valore della concentrazione iniziale (incognita) $[A]_0$.

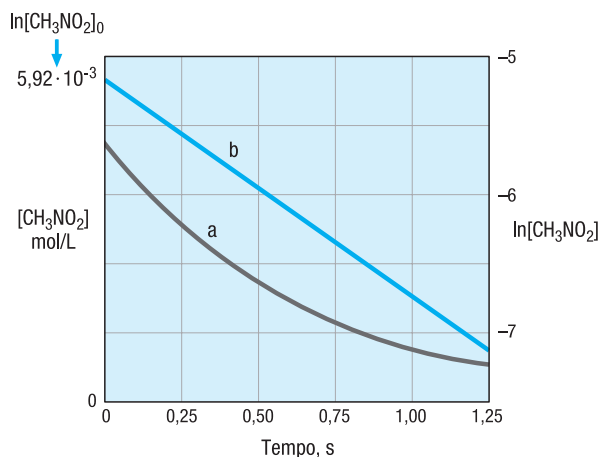
Da notare che se l'analita assorbe in UV/Vis, il valore dell'assorbanza a una determinata lunghezza d'onda (scelta in modo da evitare interferenze) può essere inserito direttamente al posto delle concentrazioni nella (8). Ovviamente, bisognerà poi disporre di una adeguata curva di calibrazione assorbanza/concentrazione di analita, per poter ricavare il dato che interessa.

In figura 2 viene riportato l'andamento della concentrazione di nitrometano nel tempo, quando viene trattato con un eccesso di base. Si ottiene in tal modo una reazione che segue una cinetica dello pseudo-primo ordine, cosicché si è in grado di ricavare, dall'intercetta con l'asse delle ordinate, la concentrazione incognita.

Figura 2

Cinetica di decomposizione del nitrometano in eccesso di base:

a) variazione della concentrazione del nitrometano nel tempo; **b)** diagramma cinetico integrale della scomparsa del nitrometano.



Il metodo integrale ha anche una diversa applicazione, non strettamente analitica, ma importante in quanto permette di risalire (almeno in linea teorica) all'ordine della reazione.

È infatti chiaro che se, sulla base della (3) oppure della (8), il grafico risulta una retta, la reazione segue una cinetica del primo ordine.

► Un caso interessante: la «reazione del palloncino»

In figura 3 viene proposto un caso interessante, relativo alla cinetica di ossidazione dell'etanolo con bicromato (la ben nota «reazione del palloncino», un tempo molto utilizzata per rivelare l'eccesso di etanolo nell'alito e quindi nel sangue, per esempio dei conducenti di mezzi di trasporto, che dovevano appunto soffiare in una specie di palloncino, di cui veniva osservata la variazione di colore).

La reazione è la seguente:



Nel caso pratico si è lavorato in ambiente acido e con un buon eccesso di alcol, in modo da realizzare una reazione dello pseudo-primo ordine. La reazione viene seguita in due modi, sia attraverso la scomparsa del colore arancio del bicromato (che viene seguita per via spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 480 nm) che attraverso l'aumento della concentrazione di Cr^{3+} (verde), che si forma per riduzione del bicromato (e che viene seguito alla lunghezza d'onda di 580 nm).

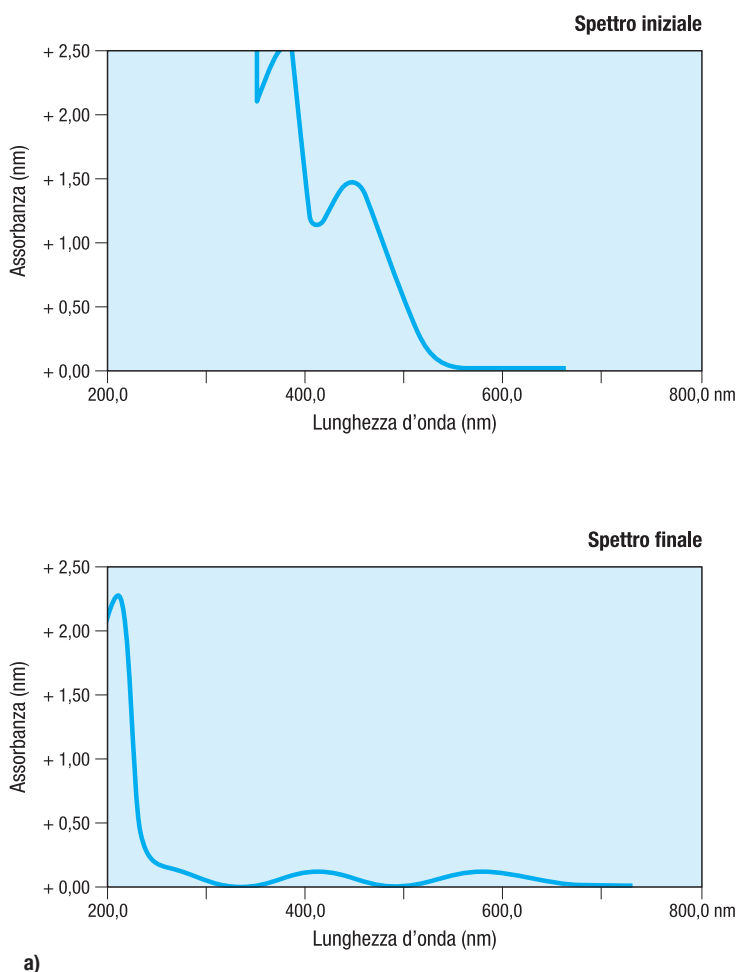
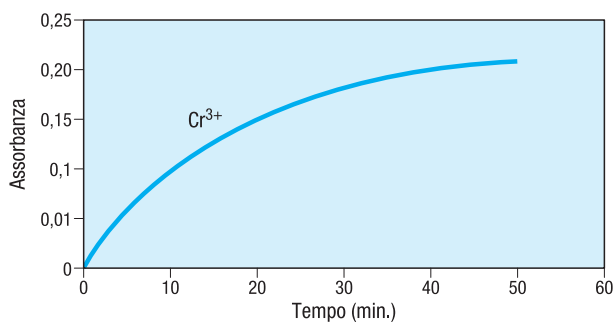


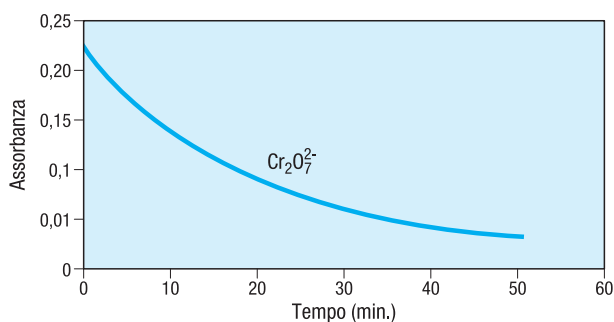
Figura 3

Cinetica di ossidazione dell'etanolo con bicromato di potassio («reazione del palloncino»), in varie condizioni, seguita con il *Metodo colorimetrico*.

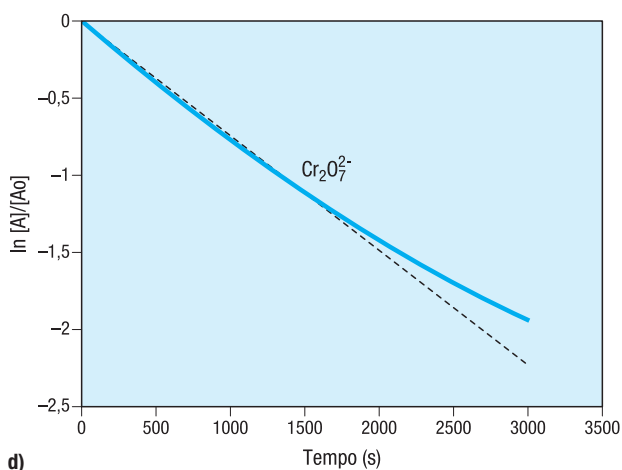
a) Spettri iniziale e finale;
b) variazione della concentrazione del cromo (III), a 580 nm;
c) variazione della concentrazione del bicromato, a 480 nm;
d) verifica dell'ordine di reazione: diagramma cinetico integrale della scomparsa del bicromato, a 480 nm. Notare come i primi punti non siano effettivamente allineati. Non è pertanto corretto, nelle condizioni dell'esperimento, desumere che si tratti di una reazione che segue una cinetica del primo ordine!



b)



c)



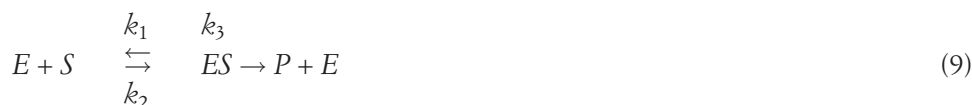
d)

STUDIO DELLE REAZIONI CATALIZZATE

Le reazioni che si avvalgono di catalizzatori rivestono una particolare importanza, sia in campo strettamente chimico che nelle scienze della vita, in cui, come ben noto, gli enzimi governano praticamente tutte le reazioni di interesse biologico.

A causa della loro elevata specificità, gli enzimi presentano un particolare interesse nel campo della chimica analitica, perché la loro attività può essere correlata alla quantità delle molecole su cui agiscono, che vengono chiamate *substrati*.

In linea del tutto generale, ma con particolare validità per quanto riguarda l'attività enzimatica, il meccanismo di azione dei catalizzatori può essere così schematizzato:



dove • E indica l'enzima (ossia il catalizzatore) • S il substrato • ES il complesso enzima-substrato • P il prodotto della reazione.

Da notare come lo schema comporti due stadi:

- il primo, che porta alla formazione del complesso enzima-substrato ed è di tipo reversibile;
- il secondo, che determina la formazione del prodotto e la rigenerazione dell'enzima per mezzo di una reazione irreversibile. Ciò è facilmente riscontrabile quando la velocità di reazione è misurata nei primi istanti, per cui la concentrazione del prodotto è di fatto trascurabile.

Per ricavare una legge cinetica per i fenomeni descritti si può distinguere fra due possibili casi, a seconda delle velocità relative dei due stadi della reazione.

■ Ipotesi dell'equilibrio rapido (o di Michaelis-Menten)

Questo caso si presenta quando il secondo stadio è molto più lento del primo ($k_3 \ll k_1$)

In tale situazione, *dato che in una sequenza di reazioni è la più lenta a determinare la cinetica globale*, la velocità della reazione dipende essenzialmente dalla decomposizione del complesso catalizzatore-substrato. Contemporaneamente, dato che il primo stadio è veloce rispetto al secondo, il sistema ha il tempo di raggiungere una situazione di equilibrio, in cui le due reazioni che lo caratterizzano si svolgono alla medesima velocità.

Su queste basi, si giunge alla formulazione di una legge cinetica del tipo:

$$v = d[P]/dt = k_2 [E]_0 [S]/(K_s + [S]) \quad (10)$$

dove • $K_s = k_2/k_1$

Se poi si assume che la concentrazione del substrato sia molto più grande di quella dell'enzima (cosa del resto del tutto normale nei sistemi biologici), da un lato la concentrazione di S risulterà sostanzialmente inalterata all'inizio della reazione, ma oltre a ciò si può considerare che tutto l'enzima sia legato al substrato, per cui risulta $[E]_0 = [ES]$.

Come conseguenza, sarà:

$$k_2 [E]_0 = k_2 [ES] \quad (11)$$

che coincide con la velocità di reazione del secondo stadio della reazione, nelle condizioni in cui tutto l'enzima è impegnato nella reazione. In altre parole, tale prodotto finisce con l'esprimere la velocità *massima*, v_{\max} , ottenibile per una data quantità di enzima in condizioni di saturazione.

La (10) diventa perciò semplicemente:

$$v = d[P]/dt = v_{\max}[S]/(K_s + [S]) \quad (12)$$

■ Ipotesi dello stato stazionario (o di Briggs-Haldane)

Questo secondo caso si presenta quando i due stadi della reazione avvengono a velocità paragonabili, cosicché il complesso ES mantiene una concentrazione relativamente piccola ma costante.

In tali condizioni, assumendo sempre una concentrazione del substrato molto maggiore di quella dell'enzima, si ricava una equazione cinetica formalmente analoga alla precedente, che assume la forma

$$v = d[P]/dt = k_2 [E]_0 [S]/(K_s + [S]) \quad (13)$$

■ in cui però $K_s = (k_2 + k_3)/k_1$

Inoltre, analogamente al caso precedente, sarà $k_2 [E]_0 = v_{\max}$, per cui l'equazione si semplifica ulteriormente e diventa

$$v = d[P]/dt = v_{\max} [S]/(K_s + [S]) \quad (14)$$

Appare evidente l'assoluta analogia formale delle due equazioni, che risultano identiche, pur partendo da due assunzioni diverse, tant'è che in pratica si parla di un'unica *equazione di Michaelis-Menten*, dove K_s viene più spesso indicata come K_m e chiamata *costante di Michaelis*.

Tuttavia va rilevato che è diverso il significato fisico delle costanti introdotte, perché sulla base della ipotesi dell'equilibrio rapido $K_m = k_2/k_1 = [E][S]/[ES]$, cosicché corrisponde di fatto alla costante di dissociazione del complesso Enzima-Substrato. In questo modo, K_m risulta inversamente proporzionale all'*affinità* dell'enzima per il substrato. L'ipotesi dello stato stazionario porta invece a

$$K_m = (k_2 + k_3)/k_1$$

che non esprime una costante di equilibrio e non è correlabile all'affinità dell'enzima per il substrato.

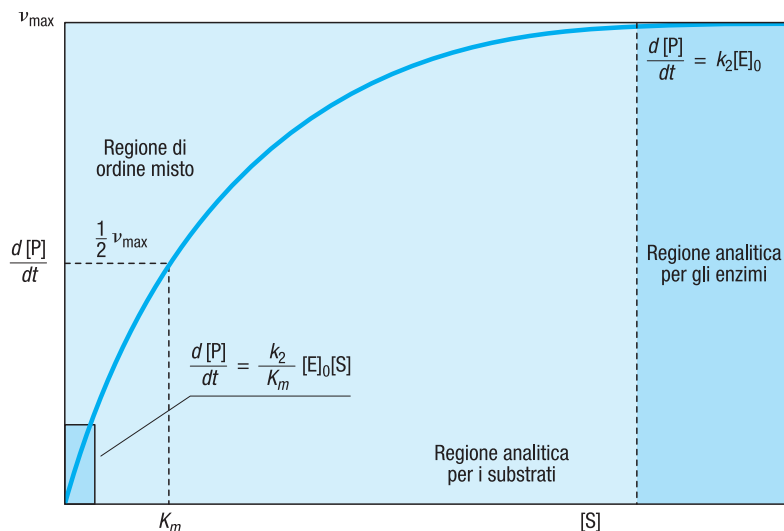
In tutti i casi, si può operare in modo da rendere la velocità di reazione proporzionale alla concentrazione del substrato o dell'enzima.

Nel primo caso, si fa in modo che $[S]$ risulti relativamente basso o comunque che le costanti siano relativamente grandi rispetto a $[S]$, cosicché, per esempio, la (14) si semplifica trasformandosi in:

$$v = d[P]/dt = v_{\max} [S]/K_m = k' [S] \quad (15)$$

Si ottiene così una reazione che segue una cinetica del *primo ordine* rispetto alla concentrazione del substrato. È opportuno mettere in evidenza che le ipotesi effettuate impongono che, per poter risalire alla concentrazione del substrato, si debba misurare la velocità iniziale della reazione.

In figura 4 viene evidenziata la zona analitica della curva di formazione del prodotto di una reazione enzimatica, quando l'interesse è rivolto al substrato.

**Figura 4**

Variatione della concentrazione del prodotto in funzione della concentrazione di substrato in una reazione catalizzata. Sono evidenziate le zone di interesse analitico rispetto al substrato e rispetto all'enzima.

Quando invece si intende effettuare analisi con l'obiettivo di determinare la concentrazione dell'enzima, (cosa di particolare interesse in chimica analitica, dove il catalizzatore può essere, per es. uno ione metallico), si opera in grande eccesso di substrato, in modo tale che risulti $[S]$ molto maggiore di K o di K_m , per cui il denominatore della (14) tende a $[S]$, cosicché entrambe le equazioni (13) e (14) si semplificano ulteriormente, riducendosi alla

$$v = d[P]/dt = k_2 [E]_0 = v_{\max} \quad (16)$$

In tal modo, la velocità di reazione risulta indipendente dalla concentrazione del substrato (ossia di *pseudo-ordine zero* nei suoi confronti) e direttamente proporzionale alla concentrazione iniziale del catalizzatore, ossia dell'enzima e quindi può essere utilizzata per risalire al suo valore in un campione incognito.

Nella medesima figura precedente viene anche evidenziata la zona analitica della curva di formazione del prodotto di una reazione enzimatica in questo secondo caso, in cui ciò che interessa è la concentrazione del catalizzatore.

Se nella equazione di Michaelis-Menten poniamo $[S] = K_m$ si deduce facilmente che $v = v_{\max}/2$. Dunque, *la costante di Michaelis è quella concentrazione di substrato alla quale la velocità della reazione è uguale a 1/2 della velocità massima*. In pratica, essa rappresenta approssimativamente la concentrazione intracellulare del substrato e quindi, dal momento che essa è anche una costante specifica per ogni enzima, il suo valore permette di paragonare enzimi provenienti da organismi diversi o da differenti tessuti dello stesso organismo, o ancora dallo stesso tessuto a differenti stadi di sviluppo.

Il risultato di tutto questo discorso è che, indipendentemente dalle ipotesi formulate sul processo in discussione, lavorando in determinate condizioni una reazione catalitica può essere sfruttata sia per determinare il *substrato* che il *catalizzatore*.

Riprendendo il caso, come già detto di particolare interesse in chimica analitica, in cui la velocità massima risulta direttamente proporzionale alla concentrazione iniziale del catalizzatore (enzima), che è ovviamente costante, si vede subito che, sul piano matematico, si può fare ricorso alla forma integrata di una reazione di ordine zero (cioè alla sua legge cinetica integrata), che qui riprendiamo:

$$[A] = [A]_0 - k \cdot t \quad (17)$$

Ma a questo punto si può sostituire k con $k_2[E]_0$ ed E può prendere il posto di A. Se infine riferiamo l'equazione al prodotto P della reazione, assumendo, per semplicità, che i rapporti stechiometrici siano unitari, risulterà che $[P] = [A]_0 - [A]$, cosicché la 17 diventa semplicemente:

$$[P] = k_2 [E]_0 \cdot t \quad (18)$$

cioè una retta passante per l'origine.

METODI CATALITICI

Vi sono diverse possibilità applicative, legate al fatto che la misura della K_m e della V_{\max} è esposta a errori significativi, se viene ricavata da grafici del tipo della figura precedente, per cui si ricorre ad accorgimenti particolari, elaborando la stessa equazione di Michaelis-Menten.

Per esempio, secondo la trasformazione proposta da Lineweaver e Burck nel 1934, si effettua il reciproco della suddetta equazione 14, dove, ricordando che K_s viene più spesso indicata con K_m :

$$1/v = (K_m + [S])/(v_{\max} + [S])$$

da cui si ottiene

$$1/v = (K_m/v_{\max}) \cdot 1/[S] + 1/v_{\max} \quad (19)$$

che, analiticamente, corrisponde all'equazione di una retta.

Riportando infatti sull'asse delle ordinate il reciproco della velocità *iniziale* $1/v$ in funzione del reciproco della concentrazione del substrato, $1/[S]$, l'intercetta con l'asse delle ordinate corrisponde a $1/v_{\max}$, mentre la pendenza della retta è K_m/v_{\max} , il che consente di risalire ai valori di K_m e v_{\max} .

Senza ricorrere ad accorgimenti di questo tipo, un metodo molto semplice tiene conto del fatto che, operando in modo che la velocità di una reazione sia direttamente proporzionale alla concentrazione del catalizzatore, se si lavora con una serie di soluzioni standard si otterranno velocità di reazione costanti e proporzionali alle concentrazioni degli standard.

Al solito, la velocità della reazione può essere determinata seguendo la scomparsa dei reagenti o la comparsa dei prodotti.

Due metodi di analisi particolarmente accessibili sono i seguenti:

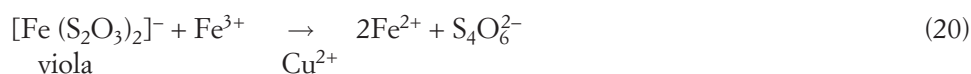
1. misurare la concentrazione del prodotto della reazione dopo un intervallo di tempo prefissato, diagrammandola rispetto alle concentrazioni delle soluzioni standard di catalizzatore;
2. misurare il tempo necessario affinché il reagente (substrato) della reazione si consumi completamente, diagrammandone il valore (o il suo reciproco) rispetto alle concentrazioni delle soluzioni standard di catalizzatore.

Questo metodo può essere facilmente eseguito anche senza l'ausilio di particolari strumentazioni, dato che si tratta semplicemente di osservare la scomparsa di un colore.

Ripetendo le operazioni con la soluzione incognita si risale al valore cercato per mezzo della curva di calibrazione. Di seguito viene rappresentato un esempio tipico.

■ Determinazione dello ione rame con metodo catalitico

Lo ione rame catalizza l'ossidazione del tiosolfato a tetrationato da parte del ferro(III) secondo le reazioni



La scomparsa del ferro (III) è facile da osservare perché il suo complesso con il tiosolfato è di colore viola. Riportando in grafico i tempi di scomparsa del colore in funzione della concentrazione del rame si ottiene un andamento abbastanza regolare, che si avvicina di più alla retta se si riporta l'inverso dei tempi, quanto meno nell'intervallo 0,5-3 mg/L (►fig. 5).

Figura 5

Determinazione dello ione rame per via catalitica. **a)** Andamento dei tempi di decolorazione al variare della concentrazione di rame. **b)** Andamento dell'inverso dei tempi di decolorazione al variare della concentrazione di rame. N.B. I dati sperimentali sono solo indicativi in quanto frutto di un numero molto limitato di misure.

