



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
LABORATORIO DI BIOCHIMICA

Giuseppe Lazzarino

Professore Ordinario di Biochimica

Catania, 12 maggio 2000

L'analisi quantitativa effettuata sul composto BIO JKCXSOR, ha dimostrato la presenza di sostanze utili allo sviluppo ed all'accrescimento delle piante, che ne giustificano l'uso come STIMOLANTE VEGETALE.

Prof. Giuseppe Lazzarino

RELAZIONE SULLA COMPOSIZIONE IONICA DEL COMPOSTO *BIO JKCXSOR*

Il composto *BIO JKCXSOR* si è dimostrato capace, come dimostrato dalla relazione effettuata dalla Dr.ssa B. Tavazzi e dal Dr. G. Rasi, di stimolare la crescita di una coltura sperimentale di piante ornamentali di *Ibiscus*.

In base a tali risultati, si è perciò ritenuto opportuno provvedere alla determinazione quantitativa dei principali composti inorganici che risultano di utilità per l'accrescimento vegetale. A tale proposito si è deciso di analizzare il composto *BIO JKCXSOR* per stabilire la concentrazione di: azoto non proteico (N), potassio (K), fosforo (P), calcio (Ca), zolfo (S), ferro (Fe) e cloro (Cl).

Inoltre, si è deciso di provvedere alla misurazione potenziometrica del pH delle soluzioni di composto *BIO JKCXSOR* alle diluizioni consigliate (1:2000 e 1:4000; v:v) per il suo utilizzo quale stimolante vegetale.

MATERIALI E METODI

DETERMINAZIONE DELL'AZOTO NON PROTEICO

La determinazione dell'azoto non proteico presente nel campione in esame è stata effettuata utilizzando l'apparecchio micro-kjeldahl. Un'aliquota di 10 ml del composto *BIO JKCXSOR* è stata acidificata con acido perclorico al 14% e successivamente è stata sottoposta al procedimento di analisi.

DETERMINAZIONE DEL POTASSIO

La determinazione del potassio presente nella soluzione di *BIO JKCXSOR* è stata effettuata mediante assorbimento atomico, iniettando direttamente nello strumento 1 ml di campione di *BIO JKCXSOR*. Lo strumento (Perkin Elmer) è stato selezionato alla lunghezza d'onda specifica dell'assorbimento del potassio.

DETERMINAZIONE COLORIMETRICA DEL FOSFORO INORGANICO

La maggior parte dei metodi utilizzati per la determinazione dei fosfati inorganici in campioni di natura organica ed inorganica si basa sulla reazione fra il fosforo inorganico (P_i) presente nel campione e molibdato d'ammonio, con formazione di fosfomolibdato d'ammonio; la successiva riduzione del fosfomolibdato d'ammonio a blu di molibdeno determina la comparsa di un colore blu che può essere misurato spettrofotometricamente e la cui intensità è proporzionale alla concentrazione del fosforo.

Reattivi

1. Ammonio molibdato 20 mM (25 g in 700 ml di acqua a cui vanno aggiunti lentamente 84 ml di H_2SO_4 concentrato. Dopo raffreddamento, portare a 1000 ml con acqua).
2. Reattivo riducente: N-fenil-*p*-fenilendiammina. Pesare 250 mg e scioglierli in 500 μ l di alcol etilico 95%; successivamente, questa soluzione va aggiunta a 500 ml di solfito di sodio (Na_2SO_3) 1%. Agitare e filtrare.
3. Soluzione standard madre di fosforo 1 mg/ml.

Procedimento

1. In 3 provette sono stati aggiunti: 5 ml di H_2O (bianco); 4.5 ml di H_2O + 0.5 ml di standard (standard); 4.5ml di H_2O + 0.5 ml di soluzione di *BIO JKCSOR* (campione).
2. Le provette sono state agitate con cura e da ciascuna di esse è stata prelevata un'aliquota di 1.5 ml che è stata trasferita in altre provette pulite.
3. A ciascuna provetta sono stati aggiunti 200 μ l della soluzione di ammonio molibdato.
4. Dopo aver agitato, a ciascuna provetta sono stati addizionati 2 ml del reattivo riducente.
5. Dopo aver agitato, si è provveduto ad incubare a temperatura ambiente al buio per almeno 10 minuti.
6. Al termine dell'incubazione, è stata misurata spettrofotometricamente l'assorbanza del campione e dello standard contro il bianco a 700 nm di lunghezza d'onda.

Dipartimento di Scienze Chimiche, Laboratorio di Biochimica

Università di Catania, Viale A. Doria 6, 95125 Catania, Italia.

Tel. : +39-0957384095; Fax : +39-095337036; E-mail: lazzarig@mbox.unict.it

DETERMINAZIONE COMPLESSOMETRICA DEL CALCIO

La determinazione quantitativa del calcio è stata eseguita complessando il calcio presente nella soluzione di *BIO JKCXSOR* con EDTA servendosi di un indicatore di assorbimento, una sostanza cioè in grado di assumere un colore diverso a seconda se ha legato ioni calcio o meno. Numerosi sono gli indicatori usati a questo scopo, di cui il più comune è il Cal-Red, che forma con gli ioni Ca^{2+} un complesso color violetto; aggiungendo EDTA sodico a pH fortemente alcalino il calcio viene legato da quest'ultimo con formazione di un complesso assai più stabile del precedente. L'indicatore in forma non complessata con gli ioni Ca^{2+} assume un colore verde-azzurro e questo colore compare quando tutti gli ioni Ca^{2+} sono stati complessati dall'EDTA.

Reattivi

1. Soluzione di KOH 2 M.
2. Indicatore Cal-Red 100 mg (acidi 2-idrossi,1-[2-idrossi,4-sulfo-1-naftilazo]3-naftoico) solubilizzato in 100 ml di alcool etilico 95%.
3. Soluzione di EDTA bisodico (etilendiamminotetracetato bisodico biidrato) 65 mg in 100 ml.
4. Soluzione standard di Ca^{2+} (10 mg/100 ml), ottenuta da carbonato di calcio tenuto per una notte in stufa a 110 °C e raffreddato in essiccatore fino al momento della pesata.

Procedimento

Le determinazioni sono state eseguite in doppio sia sullo standard che sul campione di *BIO JKCXSOR*.

1. Sono state preparate delle microprovette di precisione Eppendorff da 1.5 ml nelle quali sono stati pipettati in ognuna 100 ml di soluzione da analizzare sia per lo standard sia per il campione di *BIO JKCXSOR*.
2. Sono stati aggiunti ad ogni microprovetta 40 μl della soluzione di KOH 2 M.
3. Dopo leggera agitazione delle microprovette, sono stati aggiunti ad ognuna di esse 40 μl dell'indicatore Cal-Red.
4. Le microprovette sono state agitate delicatamente per favorire l'uniforme formazione del colore rosa-violetto

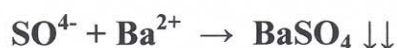
5. Il contenuto di ogni microprovetta (sia di standard che di campione) è stato poi titolato mediante l'aggiunta di 10 μl della soluzione di EDTA, ripetuta sotto leggera agitazione fino ad ottenere il viraggio dell'indicatore al colore verde-celeste.
6. Il contenuto di calcio del campione a questo punto è stato determinato in base alla proporzione diretta:

$$\text{Ca}^{2+} \text{ (mg/100 ml)} = \frac{\text{\underline{\mu l di soluzione di EDTA impiegati per titolare il campione}}}{\text{\underline{\mu l di soluzione di EDTA impiegati per titolare lo standard}}} \times 10$$

dove il fattore 10 indica la concentrazione (mg/100 ml) della soluzione standard.

DETERMINAZIONE DELLO ZOLFO

E' stato utilizzato il metodo turbidimetrico il cui principio si basa sulla precipitazione degli ione solfato SO_4^{4-} in ambiente acido (acido cloridrico) mediante aggiunta di cloruro di bario. Successivamente viene misurata l'assorbanza della sospensione ottenuta ad una lunghezza d'onda di 420 nm e la concentrazione dei solfati viene ottenuta mediante curva di taratura relativa a soluzione standard. La reazione del metodo è la seguente:



Reagenti

1. Soluzione di glicerina 1:1 in acqua bidistillata.
2. Soluzione di cloruro di sodio (NaCl) acidificato: 240 mg in 980 μl più 20 μl di acido cloridrico (HCl) concentrato.
3. Soluzione standard di solfato 1 mg di solfato bisodico (Na_2SO_4) in 10 ml.
4. Cloruro di bario ($\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) in polvere.

Procedimento

1. In diverse microprovette sono stati posti 200 μl di campione di *BIO JKCXSOR* (campione) o di Na_2SO_4 (standard) + 40 μl di glicerina + 20 μl di NaCl acidificato + 740 μl di acqua bidistillata. Per lo standard sono state preparate 5 diverse concentrazioni (5, 10, 20, 50 e 100 mM).
2. A ciascuna microprovetta sono stati aggiunti 1.2 mg di $\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$.
3. Dopo agitazione vigorosa e continua per 2 minuti, si è proceduto ad una incubazione di 5 minuti.
4. I campioni sono stati nuovamente agitati per circa 15 secondi e immediatamente è stata misurata spettrofotometricamente l'assorbanza effettuando le letture a 420 nm di lunghezza d'onda.
5. I valori di concentrazione dei solfati presenti nel campione analizzato sono stati ottenuti mediante confronto con la retta di taratura standard.

Dipartimento di Scienze Chimiche, Laboratorio di Biochimica

Università di Catania, Viale A. Doria 6, 95125 Catania, Italia.

Tel. : +39-0957384095; Fax : +39-095337036; E-mail: lazzarig@mbox.unict.it

DETERMINAZIONE COLORIMETRICA DEL FERRO

E' stato utilizzato uno dei metodi colorimetrici proposti per la determinazione del ferro, basato sulla riduzione del Fe^{3+} a Fe^{2+} e sulla formazione di un complesso colorato che si forma tra il ferro ridotto e una sostanza cromogena. L'utilizzazione di un riducente (acido ascorbico, ditionito di sodio, tioglicolato, ecc.) riduce tutto il ferro ferrico da trivalente a bivalente, permettendo così la reazione con il cromogeno. Numerose sono le sostanze capaci di dare origine con il ferro ferroso a dei complessi di chelazione colorati in rosa-rosso determinabili spettrofotometricamente. L'addotto colorato che si ottiene per reazione tra la batofenantrolina ed il ferro bivalente ha un elevato coefficiente di estinzione molare ($\epsilon = 22400$) che garantisce un'elevata sensibilità alla metodica che utilizza tale composto.

Reagenti

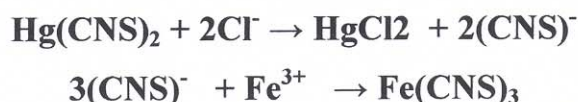
1. Soluzione riducente contenente acido tioglicolico al 3%.
2. Soluzione cromogena contenente 250 mg di batofenantrolina in acetato di sodio 2 M.
3. Soluzione standard madre di ferro 1 mg/ml.

Procedimento

1. In tre provette sono state pipettati 2 ml di H_2O (bianco), 2 ml di standard e 2 ml di campione di *BIO JKCXSOR*
2. A ciascuna provetta sono stati aggiunti 2 ml di soluzione riducente.
3. Dopo agitazione vigorosa, e una incubazione di 5 minuti, a ciascuna provetta sono stati aggiunti 2 ml di soluzione cromogena.
4. Dopo agitazione vigorosa, e una incubazione di 5 minuti, è stata misurata spettrofotometricamente l'assorbanza dello standard e del campione contro il bianco, effettuando le letture a 535 nm di lunghezza d'onda.

DETERMINAZIONE COLORIMETRICA DEL CLORO

Il metodo è basato sullo spostamento dello ione tiocianato dal tiocianato di mercurio da parte dello ione cloro e successiva reazione dello ione CNS^- con lo ione ferrico con formazione di una serie di complessi fortemente colorati in rosso mattone che possono essere indicati come $\text{Fe}(\text{CNS})_3$ secondo il seguente schema:



La reazione è possibile per l'elevata affinità dello ione Hg^{2+} per lo ione Cl^- con il quale forma HgCl_2 solubile ma indissociato.

Reattivi

1. Reattivo colorante: solfocianuro mercurico $[\text{Hg}(\text{CNS})_2]$ + HgCl_2 + nitrato ferrico $[\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}]$ + HNO_3 concentrato.
2. Soluzione standard contenente 100 mEq/litro di ioni Cl^- .

Procedimento

Le determinazioni sono state eseguite in doppio sia sullo standard che sul campione di *BIO JKCXSOR*.

1. Sono state preparate delle provette da 15 ml nelle quali sono stati pipettati 50 μl in ognuna di soluzione sia per lo standard sia per il campione di *BIO JKCXSOR*.
2. Sono stati aggiunti ad ogni provetta 10 ml di reattivo colorante.
3. Dopo agitazione, le provette sono state incubate a temperatura ambiente per 30 minuti.
4. Al termine dell'incubazione, si è proceduto a misurare spettrofotometricamente l'assorbanza del campione e dello standard a 460 nm di lunghezza d'onda, contro il reattivo colorante utilizzato come bianco di riferimento.

RISULTATI

AZOTO NON PROTEICO = NON DOSABILE

POTASSIO = 0.01 g/100 ml

FOSFORO = NON DOSABILE

CALCIO = NON DOSABILE

ZOLFO = 0.2 g/100ml

FERRO = 0.7 g/100 ml

CLORO = 0.05 g/100 ml

pH *BIO JKCXSOR* con DILUIZIONE 1:2000 = 4.00

pH *BIO JKCXSOR* con DILUIZIONE 1:4000 = 4.16