**Assorbimento – Cinetica di ingresso della Rodamina (EXP – 04)**

Video Teoria pt.1

Spiegazione Teorica:

- Obbiettivo: Studiare la cinetica di ingresso, in particolare il tempo medio di svolgimento, della Rodamina in una pastiglia di gel di Agarosio. Stiamo andando a mimare l’ingresso di un farmaco all’interno della pastiglia, tuttavia essendo i farmaci di solito poco fluorescenti, lo mimiamo con la Rodamina, la quale ha piomeno le stesse dimensioni di un farmaco ed è un ottimo farmaco fluorescente.

Tuttavia essendo difficile l’analisi interna della pastiglia, in quanto questa potrebbe sfaldarsi, andiamo a effettuare una misurazione indiretta.

Svolgimento:

- Preparazione di una soluzione acquosa di Rodamina a partire dallo Stock ottenendo circa 10 ml di soluzione a una concentrazione di 5 μM;

- Produzione della pastiglia tramite processo di Gelificazione;

- Porre la pastiglia all’interno della soluzione e a diversi intervalli di tempo prelevare un campione di soluzione e analizzarne lo spettro di assorbimento;

- La Rodamina inizierà ad essere assorbita, in quanto il gel di Agarosio presenta dei fori di dimensioni di qualche micron, nei quali solitamente il farmaco (in questo caso il colorante) riesce a penetrare;

- Ci si aspetta che con l’avanzare del tempo la pastiglia assorbirà sempre di più colorante quindi la concentrazione interna aumenterà con lo scoorere del tempo.

- Tuttavia essendo appunto difficile calcolare la concentrazione interna di rodamina ci aspettiamo che al contrario la concentrazione della soluzione subirà una diminuzione di concentrazione uguale e contraria alla pastiglia;

- Con la concentrazione diminuscisce anche l’assorbanza e quindi per verivicare il giusto ingresso del colorante all’interno della pastiglia, usando lo spettroclorimetro, andiamo a registrare lo spettro di assorbimento della soluzione a diversi intervalli di tempo;

-Primo spettro da acquisire è quello della sola soluzione a 5 μM di concentrazione, ovvero lo spettro di partenza al tempo zero;

- Poi procedere con l’acquisizione degli spettri a intervalli di circa 5 minuti per i primi 40 minuti, poi a intervalli di 10 min fino al raggiungimento di un tempo totale di circa 1 h 30 min / 2 h;

- ATT!! Le cuvette da utilizzare per questo esperimento sono quelle piccole con una lunghezza di cammino ottico di 0,2 cm;

- Per ogni spettro va prelevato un campione dalla soluzione in cui a mollo c’è la pastiglia e poi, dopo l’acquisizione dati, il campione va rinserito all’interno del cilindretto di partenza;

- Ottenuti così i diversi spettri di Assorbimento dovremmo ottenere picchi di Assorbanza via via sempre più bassi e quindi con una diminuizione progressiva di concentrazione;

- Per l’analisi dati preoccuparsi come prima cosa di riappaiare tutte le varie baseline dei vari spettri di assorbimento così da non sfalzare la misurazione di differenza di assorbanza ΔA ai vari intervalli di tempo;

- Lo sfalzamento è dovuto dall’angolo minimo con cui viene posizionata la cuvewtta all’interno dello spettroclorimetro e da eventuali differenze delle varie facce ottiche utilizzate;

- Quindi scegliere una baseline di riferimento (consigliata o quella superiore oquella inferiore) e andare a sottrarre o a sommare con Origin su tutte le altre curve le varie differenze di sfalzamento;

- ATT!! Queste differenze vanno calcolate nel range finale delle curve dove risultano quasi nulle e piatte;

- RICORDA: Per aumentare l’accuratezza del calcolo si può andare a sottrarre a tutte lo spettro di fondo del solo solvente;

- ATT!! Il range totale di acquisizione dati è dai 400 nm ai 650 nm, in quanto il picco di assorbimento della rodamina è tabulato a 526 nm;

- In seguito, dopo aver appaiato tutte le curve, va sottratta ad ognuna delle curve quella di riferimento iniziale e deve essere preso il valore assoluto del risultato ottenuto (oppure si può andare a sottrarre a quella iniziale al tempo zero tutte le altre);

- Questo viene fatto per andare a sottrarre il contributo al tempo zero della Rodamina, così da spostare il punto di osservazione all’interno della pastiglia, in quanto le varie differenze di assorbanza di ogni intervallo di tempo, rappresentano la quantità di colorante che in ogni intervallo di tempo è penetrata all’interno del gel;

- A questo punto bisogna andare ad acquisire ogni massimo di tutte le curve ottenute attuando una interpolazione parabolica nell’intorno di ogni picco;

- Poi disegnare il grafico di tutti i valori dei picchi ottenuti, quindi le varie differenze di assorbanza ΔA in funzione del tempo t;

- In fine svolgere il fit con la formula qui di seguito per ottenere k;

- Formula:

- k è una costante ed è l’inverso di un tempo e rappresenta l’inverso del tempo medio di ingresso T (k=1/T);

- Quindi per finire basta invertire questa relazione ottenendo così T.

Video 01

Preparazione della pastiglia di Agarosio:

- L’Agarosio è al suo stato originale una polvere, la quale può essere sciolta in acqua e scaldata;

- Quando l’Agarosio viene scaldato in acqua va incontro a un processo di Gelificazione, tuttavia ancora caldo preserva ancora lo stato liquido;

- In questo modo ancora caldo può essere inserito in uno stampo;

- Basta poi aspettare che il gel solidifichi ottenendo cosi la pastiglia gelatinosa;

- Per la preparazione va preparata una soluzione accuosa di gel di Agarosio con una concentrazione dell’ 1% i Massa;

- NOTA 1! La soluzione all’inizio è opaca in quanto l’Agarosio è ancora sotto forma di polvere, per capire quando ha raggiunto la temperatura giusta bisogna aspettare che la soluzione diventi completamente trasparente;

- NOTA 2! Quando si va a inserire la pastiglia all’interno della soluzione è risulta difficile distinguerla, in quanto l’indice di rifrazione del gel di Agarosio è simile a quello dell’acqua;

- NOTA 3! La pastiglia inizialmente è trasparente, mentre a fine esperiomento essa avrà un colorito più tendente all’arancio in quanto assorbendo la Rodamina ne acquisisce il colore.