

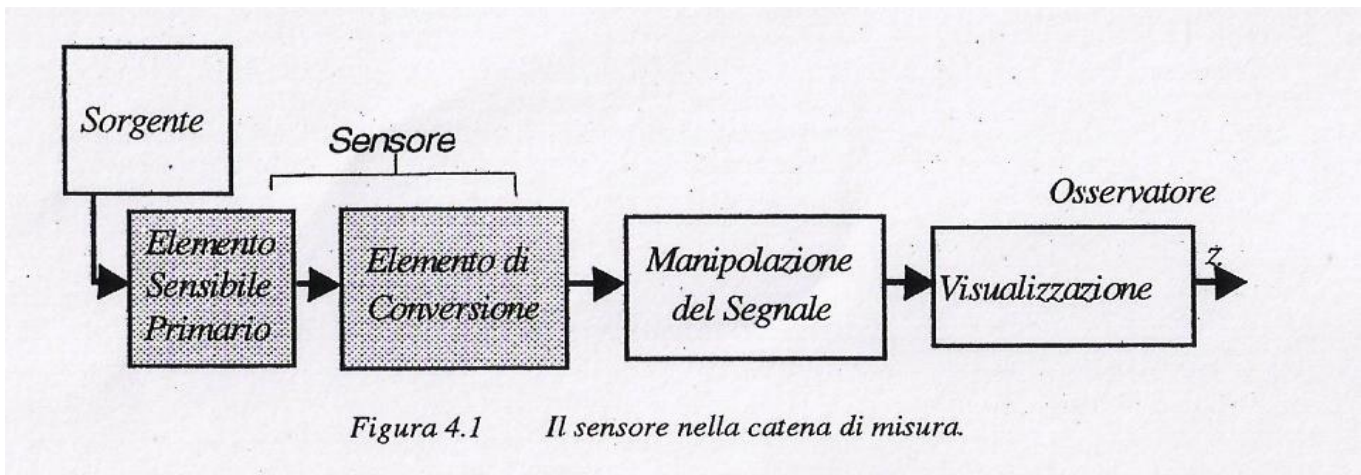
Indice

1. Sensori	2
1.1. Sensori elettrochimici.....	3
1.2. Sensori di ossigeno.....	4
2. Amperometria	5
2.1. Funzionamento	5
2.2. Interfaccia elettrodo-elettrolita	7
2.3. Relazione tra potenziali e corrente applicati a una cella elettrochimica	8
2.3.1. Trasporto di materie dalla soluzione all'elettrodo	12
2.3.2. Corrente	14
2.4. Caratteristiche	16
2.4.1. Elettrodo Ag-AgCl	16
2.4.2. Membrana semipermeabile	18
2.4.3. Elettrodo di platino	19
2.5. Il calcolo della saturazione dell'ossigeno	20
3. Polarografia	21
3.1. Definizione	21
3.2. Polarografia ad impulsi	23
3.3. Polarografia di stripping anodico	23
4. Vari tipi di sensori di ossigeno	24
4.1. Elettrodo di Clark	24
4.2. Sensore di tipo polarimetrico	25
4.3. Vari tipi	26
4.3.1. Sensore di ossigeno disciolto T17D04000	26
4.3.2. Oxygraph	28
4.3.3. Strumento portatile di misura dell'ossigeno	29
5. Applicazione nella medicina	30
5.1. Determinazione del glucosio	31
5.2. Determinazione dell'acido lattico	32
5.3. Determinazione del colesterolo	32

1. Sensori

Il termine generico di sensore comprende uno svariato numero di dispositivi che differiscono tra loro per forma, dimensioni, grandezza alla quale sono sensibili, tipo di tecnologia utilizzate e così via.

La quantità che deve essere misurata è rilevata dal trasduttore d'ingresso; essendo questo lo stadio più critico dell'intero processo di misura. Lo stadio d'ingresso deve essere in grado di convertire l'energia dalla forma con la quale si presenta al sensore, ad una forma che possa essere elaborata dagli stadi successivi, e quindi presenta all'operatore.



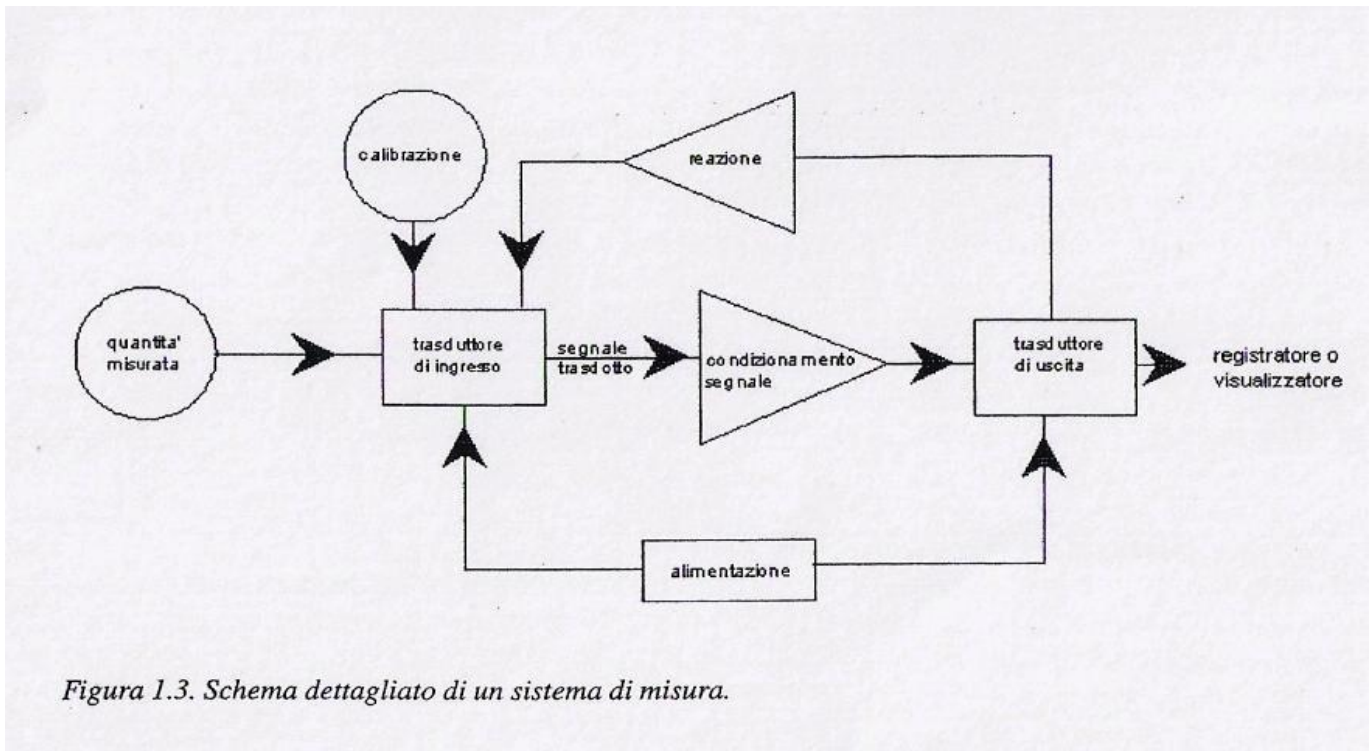
Lo stadio di elaborazione del segnale è in genere un sistema elettronico. Esso permette per mezzo di microprocessori, memoria, convertitori analogici/digitale, filtri, amplificatori, di operare sul segnale fornito dal trasduttore d'ingresso e di trasformarlo nella forma più adatta per essere trasmesso allo stadio di uscita.

La sorgente del segnale di calibrazione, anch'essa non necessariamente presente in ogni sensore, permette di calibrare correttamente il sistema, anche durante l'uso.

Lo scopo principale dello stadio di elaborazione del segnale è quello di modificare il segnale ricevuto dal trasduttore d'ingresso in modo da renderlo accettabile dallo stadio finale; tipiche operazioni da esso compiute sono quelle di amplificazione e filtraggio.

Nello stadio centrale si deve cercare di ridurre il rumore che sarà inevitabilmente sovrapposto al segnale d'ingresso, con un opportuno filtraggio. Il trasduttore d'uscita deve trasformare il segnale elettrico, che esce dallo stadio condizionatore, in forma che possa essere o presentata direttamente all'esterno. Lo stadio di uscita può essere un display, una stampante, un indicatore a lancetta, che forniscono una presentazione immediata del risultato, allora il segnale che giunge al trasduttore d'uscita dovrà quindi essere digitale o analogico.

I sensori si classificano a base del loro funzionamento (sensori resistivi, induttivi, capacitivi, piezoelettrici, ottici, elettrochimici).



1.1. Sensori elettrochimici

La misura di concentrazioni ioniche (ad esempio: H^+ , Na^+ , K^+), di ossigeno e di anidride carbonica riveste un particolare interesse nella valutazione dei processi chimici alla base del metabolismo umano e nella realizzazione di apparecchiature di supporto alle funzioni vitali (emodializzatore, ventilatori, ossigenatori).

Queste grandezze sono normalmente misurate nei laboratori centralizzati di analisi chimico-cliniche. Il ritardo tra prelievo e referto determina un corrispondente ritardo nell'intervento terapeutico. C'è quindi una tendenza a decentrare i laboratori di analisi. Così, ad esempio, le camere operatorie sono attrezzate per il monitoraggio continuo della gas-analisi e degli elettroliti.

La tecnologia dei circuiti optoelettronici integrati sta oggi portando allo sviluppo di sensori per misure in vivo ed in tempo reale di grandezze biochimiche.

Possono essere classificati in quattro topologie:

a) **Conduci metrici e capacitivi:**

- Si ha variazione di conducibilità di un materiale per interazione con l'analita. Sono sensori operanti ad alte temperature.
- Questi sensori di solito non sono selettivi ma rispondono a molti analiti (CO , NO , H_2 , idrocarburi...). Si cerca di migliorare la selettività mediante drogaggio del semiconduttore con Pt , Pd , Au , Ir .

- La reazione tra il gas e l'ossido dipende dalla temperatura, dal tipo di gas, dal tipo di ossido. Gas donatori o accettori di elettroni si adsorbono sugli ossidi: una molecola di accettore estrarrà elettroni dal semiconduttore.

b) Potenzimetrici:

- Si misura il potenziale di un elettrodo indicatore (elettrodo ionoselettivo) che è legato (relazione logaritmica) all'attività dell'analita.

- Sull'elettrodo è posizionata una membrana attraverso la quale si genera il potenziale che dipende dalla concentrazione della sostanza d'interesse.

- Il potenziale è misurato rispetto a quello di un elettrodo di riferimento in condizioni di corrente essenzialmente nulla.

- Le variazioni di potenziale negli ISE non sono dovute a reazioni redox, ma ad equilibri che coinvolgono specie ioniche. Tra i due lati della membrana si crea una differenza di potenziale che dipende dalla concentrazione.

c) Voltammetrici:

- Si applica un potenziale fisso o variabile al sensore (elettrodo di lavoro).
- In realtà si applica una differenza di potenziale rispetto a un elettrodo di riferimento.
- Si verifica la riduzione o l'ossidazione dell'analita o di una sostanza ad esso correlata.
- La corrente generata in seguito alla relazione redox è proporzionale alla concentrazione dell'analita.

1.2. Sensori di ossigeno

L'ossigeno è uno dei gas più importanti in Natura, si ritrova come reagente o come prodotto in un numero enorme di reazioni chimiche e biochimiche. La sua determinazione quantitativa è richiesta in svariate situazioni che necessitano, nella maggior parte dei casi, di una determinazione "in situ". La misura dell'ossigeno disciolto è uno dei parametri che indicano lo stato di salute delle acque superficiali, mentre molti processi che sfruttano le catalisi enzimatiche operate da lieviti o batteri necessitano un controllo continuo del tenore di ossigeno per poter andare a buon fine, la misura dell'O₂ è molto importante anche in molte operazioni in ambito medico. I sensori attualmente disponibili si basano su principi differenti: elettrochimici (tipo l'elettrodo di Clark), sensori a stato solido e sensori ottici.

Il contenuto di ossigeno è il volume di ossigeno presente in un certo volume di soluzione e viene espresso comunemente in ml per 100 ml oppure ml per litro.

Se una soluzione è in equilibrio con una miscela di gas contenente O₂, la concentrazione di ossigeno in soluzione dipenderà, in generale, dalla pressione parziale dell'ossigeno. Visto che questa quantità è solitamente più facile da misurare. La concentrazione di ossigeno viene spesso espressa in termini della sua pressione parziale P_{O₂} e viene chiamata tensione di ossigeno. Se l'ossigeno è semplicemente in soluzione e non in forma legami chimici con i costituenti della soluzione, la tensione di ossigeno è direttamente proporzionale alla concentrazione (legge di Henry). Quando, al contrario, l'ossigeno forma dei legami reversibili, la relazione con la pressione parziale non è lineare. In particolare, quando la P_{O₂}

è elevata, l'emoglobina presente nel sangue viene saturata, quindi la concentrazione di O_2 nel sangue è massima.

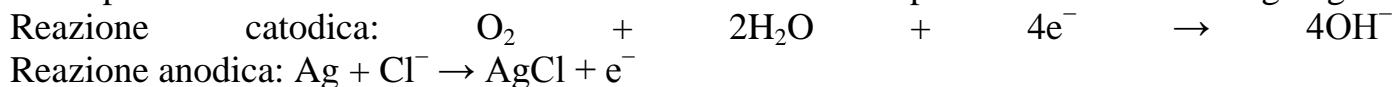
2. Amperometria

2.1. Funzionamento

L'amperometria è una particolare misura voltammetrica effettuata a potenziale imposto, la corrente misurata è proporzionale alla concentrazione dell'analita elettroattivo. La misura della corrente senza ddp imposta è detta galvanometria. La principale applicazione di questa tecnica è quella di rivelazione del punto finale nelle titolazioni, si parla quindi di titolazioni amperometrica. Altri usi sono rappresentati dai sensori amperometrici e dai rivelatori cromatografici. Si misura la corrente che si ottiene applicando all'elettrodo di lavoro un opportuno potenziale. Dato che la corrente di diffusione è direttamente proporzionale alla concentrazione della sostanza.

Un'importante applicazione è quella dei sensori a ossigeno che misurano la corrente che passa tra due elettrodi con ddp di circa $0,6 \div 0,8$ V.

Il più noto è il sensore di Clark formato da un catodo di platino e un anodo di Ag /AgCl:



L'immobilizzazione di enzimi su elettrodi inerti permette di utilizzare reazioni enzimatiche redox per creare dei biosensori amperometrici.

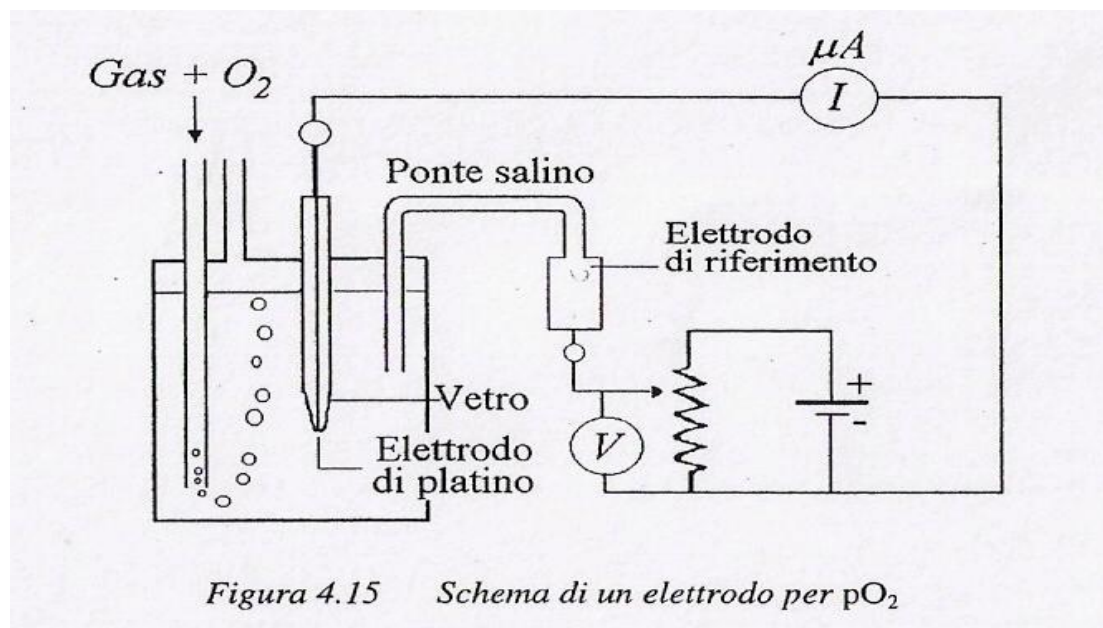


Figura 4.15 Schema di un elettrodo per pO₂

L'amperometria può essere utilizzata per determinazioni analitiche, applicando il potenziale opportuno all'elettrodo di lavoro, e misurando la corrente relativa. Il problema

consiste soprattutto nella presenza di interferenti o di correnti di fondo, per cui il metodo può essere utilmente applicato soltanto quando queste non ci sono, ad esempio

- per la rivelazione nelle misure cromatografiche;
- nei sensori selettivi quali l'elettrodo di Clark;
- per seguire titolazioni, per le quali il punto finale non risulta influenzato dalla presenza di interferenti o di correnti di fondo.

Pertanto possono essere utilizzati per monitorare titolazioni.

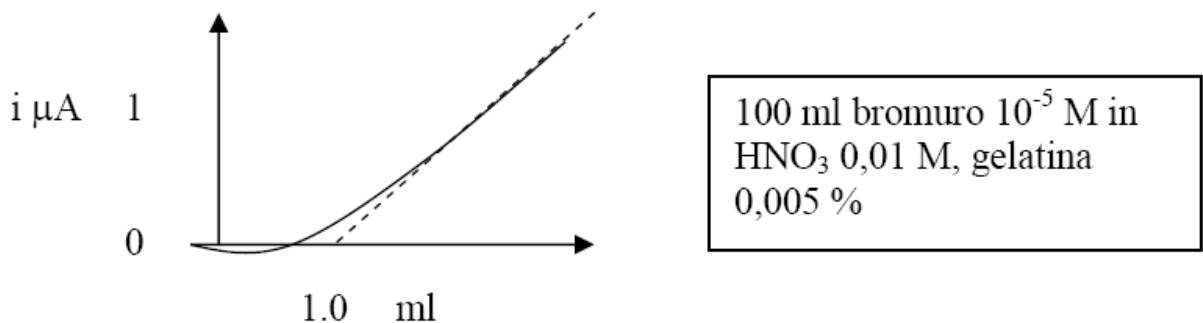
TITOLAZIONI AMPEROMETRICHE:

Si applica un opportuno potenziale, in modo che all'elettrodo di lavoro avvenga la reazione desiderata:

a) Celle con un solo elettrodo polarizzabile.

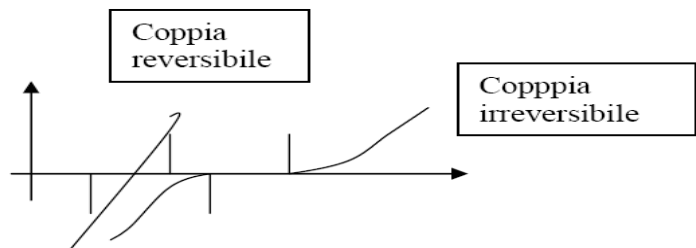
Es. determinazione di Br^- con Ag^+ (titolazione per precipitazione)

Si sfrutta la reazione di riduzione di Ag^+ su un elettrodo di Pt rotante $E^\circ=0,799$. La reazione si fa avvenire a $E=0,15$ V vs ECS.



L'uso dell'elettrodo rotante (600 rpm) permette una maggiore sensibilità, dato che lo spessore dello strato di diffusione è molto piccolo.

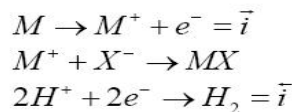
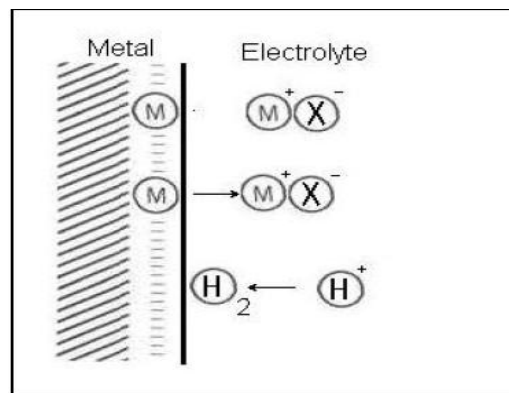
b) celle con due elettrodi polarizzabili: Titolazioni biamperometriche cella con due elettrodi polarizzabili, tra i quali si impone una differenza di potenziale piccola. Passa corrente solo se nella cella c'è una coppia reversibile, come si vede dal grafico. Questo consente una migliore specificità.



2.2. Interfaccia elettrodo-elettrolita

Quando un elettrodo, costituito d'atomi metallici M, è immerso in un'elettrolita, soluzione acquosa contenente cationi dell'elettrodo metallico M^+ e anioni H^- , si assiste ad una serie di reazioni chimiche il cui risultato è rappresentato da una distribuzione di carica all'interfaccia elettrodo-elettrolita, il cui dislocamento spaziale dipende dal modo in cui l'elettrodo reagisce con l'elettrolita.

Al momento del contatto si genera una corrente che attraversa l'interfaccia, passando dall'elettrodo all'elettrolita, che consiste in elettroni che si muovono in una direzione opposta a quella della corrente nell'elettrodo, in cationi (M^+) che si muovono nella stessa direzione della corrente e anioni (H^-) che si muovono in una direzione opposta a quella della corrente nell'elettrolita.



Inizialmente non ci sono elettroni liberi nell'elettrolita e non ci sono cationi o anioni liberi nell'elettrodo, ma ciò che da avvio al trasferimento di carica all'interfaccia, sono reazioni d'ossidazione-riduzione, le quali sono rappresentate, in generale, dalle seguenti equazioni:



dove n indica il numero di valenza degli atomi metallici e m è la valenza di H la prima equazione indica la reazione d'ossidazione degli atomi che costituiscono l'elettrodo per formare un catione e uno o più elettroni liberi; i cationi passano entro l'elettrolita, mentre gli anioni restano nell'elettrodo con la funzione di trasportatori. La seconda equazione invece riguarda l'ossidazione degli anioni ad atomi neutrali, con il passaggio nell'elettrodo di uno o più elettroni liberi.

Tali reazioni sono reversibili e la reazione che avviene nel verso opposto rispetto all'ossidazione, ossia da destra verso sinistra, è la reazione di riduzione.

Quando queste si eguagliano, in altre parole, quando nella soluzione è mantenuta la neutralità di carica e quindi gli anioni sono in ugual numero dei cationi del metallo, il netto trasferimento di carica attraverso l'interfaccia è nulla e ciò corrisponde fisicamente ad una corrente nulla tra elettrodo ed elettrolita; se l'equilibrio viene disturbato, ossia quando il metallo entra in contatto con la soluzione e si verifica la prima equazione e fluisce una corrente dall'elettrodo all'elettrolita, allora domina la reazione di ossidazione, viceversa domina quella di riduzione.

L'elettrolita che circonda il metallo ha un potenziale elettrico differente dal resto della soluzione, una differenza di potenziale nota come potenziale di metà cella, la cui conoscenza è importante per capire il comportamento degli elettrodi per biopotenziali. Inoltre si crea un doppio strato di cariche di segno opposto: un tipo dominante sulla superficie del metallo e il tipo opposto distribuito nell'elettrolita immediatamente adiacente. Poiché non si può creare una connessione tra l'elettrolita e un terminale del dispositivo di misurazione di potenziale, non sarà possibile misurare il potenziale di metà cella di un elettrodo, se non con l'utilizzato un secondo elettrodo. Nel caso in cui il sistema elettrodo-elettrolita non manterrà le condizioni standard, i potenziali di metà cella saranno diversi da quelli standard, a causa di diverse condizioni termiche e di una diversa attività ionica in soluzione, in altre parole diversa da un'atmosfera.

Se due soluzioni elettrolitiche sono in contatto e possiedono differenti concentrazioni di ioni con mobilità ioniche differenti, esiste tra esse una differenza di potenziale conosciuta come potenziale della giunzione liquida.

2.3. Relazione tra potenziale e corrente applicati a una cella elettrochimica

La corrente è dovuta alla migrazione degli ioni verso l'elettrodo di carica opposta (corrente di carica) e dalla reazione delle molecole all'elettrodo con gli elettroni (corrente faradica).

La reazione avviene se il potenziale dell'elettrodo è abbastanza alto o abbastanza basso, in relazione all'equazione di Nernst:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left[\frac{[Ox]}{[Red]} \right] - E_{rif}$$

Se il potenziale applicato è uguale a E, non avvengono reazioni elettrochimiche all'elettrodo e quindi non passa corrente.

La reazione che interessa avviene all'elettrodo a destra, cioè all'elettrodo di misura, e può essere una ossidazione o una riduzione.

Se a questo elettrodo viene applicato un potenziale sufficientemente negativo, avviene la reazione di riduzione, con passaggio di elettroni dall'elettrodo alla soluzione.

Per una reazione reversibile deve valere la legge di Nernst, cioè un valore di E è compatibile con un certo valore del rapporto [Ox]/[Red].

Se E applicato all'elettrodo è più basso del valore previsto dall'equazione di Nernst, il rapporto [Ox]/[Red] deve diminuire, e questo avviene se [Ox] diminuisce e [Red] aumenta (reazione di riduzione).

Quindi la reazione avviene verso destra: $Ox + n e^- \rightleftharpoons Red$.

Il potenziale che si misura in potenziometria è quello a corrente $i=0$.

Evidentemente questo potenziale è ben definito nel polarogramma per le coppie reversibili, mentre non lo è per le coppie irreversibili.

Le reazioni cineticamente veloci o reversibili si chiamano così perché possono avvenire in direzione opposta per piccole variazioni di potenziale dell'elettrodo attorno al potenziale di Nernst.

Per $i=0$ avvengono all'elettrodo tanti processi di ossidazione che di riduzione, ma alla stessa velocità (numero di eventi redox nell'unità di tempo), sicché la corrente globale è nulla.

Nel caso di un sistema rapido o reversibile, a E_N gli eventi di ossidazione e di riduzione sono molto frequenti, con un'elevata densità di corrente, anche se l'effetto globale è nullo.

Un piccolo scostamento da E_N permette di passare da un processo globalmente anodico a uno globalmente catodico e viceversa, cioè il sistema è reversibile.

Nel caso di un sistema lento, a E_N ci sono pochi eventi redox all'elettrodo. Il potenziale che si misura con il metodo potenziometrico (a corrente zero) non è ben definito, e non corrisponde al potenziale di Nernst.

Intensità della corrente faradica:

L'intensità della corrente (in A) che passa al tempo t è costituita dalla quantità di elettroni che vengono scambiati all'elettrodo nell'unità di tempo al tempo t (Coulomb/sec), e quindi dalla variazione di concentrazione della sostanza che reagisce all'elettrodo nell'unità di tempo (in quel certo istante):

$$i_t = \left(\frac{dQ}{dt} \right) = nFK' \left(\frac{dc}{dt} \right) = nF \cdot K_{cat} \cdot C_{ox,el,t}$$

dc è la variazione di concentrazione della sostanza che reagisce alla superficie dell'elettrodo nel tempo dt, è quindi la velocità della reazione elettrodica. Q rappresenta la quantità di elettricità in Coulomb, e dQ/dt è la quantità di elettricità che passa nell'unità di tempo (s), in Ampere.

K' è una costante di proporzionalità tra la quantità di corrente e la concentrazione reagita. Dipende dalle condizioni sperimentali, cioè dall'area dell'elettrodo e dallo spessore dello strato di diffusione.

Le costanti cinetiche k dipendono dall'area dell'elettrodo e dal potenziale applicato. (Un potenziale più negativo corrisponde ad una maggiore concentrazione di elettroni alla superficie dell'elettrodo, e quindi ad una maggiore velocità di reazione).

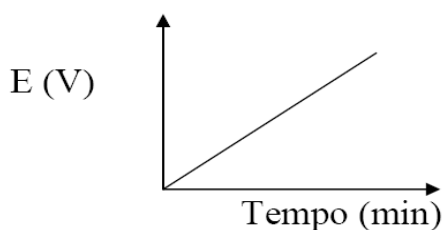
Se una reazione ha una k cinetica bassa (reazione lenta) la reazione avviene, ma ad una velocità così bassa che la relativa corrente non è misurabile. Per aumentare la velocità delle reazioni elettrochimiche si può aumentare il potenziale applicato. Al passaggio della corrente la concentrazione all'elettrodo della sostanza elettroattiva diminuisce fino a raggiungere un valore compatibile con il potenziale applicato come previsto dalla legge di Nernst. A quel punto non passa più corrente.

La concentrazione che conta (tanto per l'equazione di Nernst che per la velocità di reazione) è quella alla superficie dell'elettrodo in quel particolare istante.

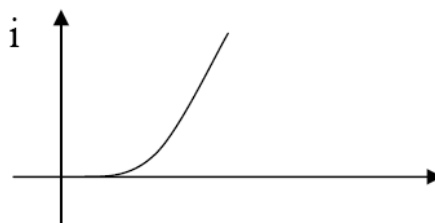
Sovratensione: differenza fra il potenziale di Nernst e quello a cui avviene effettivamente la reazione elettrodoica, con una velocità abbastanza elevata da dar luogo a una corrente misurabile. Dipende dalla velocità della reazione elettrodoica.

Applicando non un solo potenziale costante nel tempo ma potenziali variabili nel tempo e riportando in grafico la corrente misurata in funzione potenziale applicato all'elettrodo si ottengono dei grafici detti voltammogrammi.

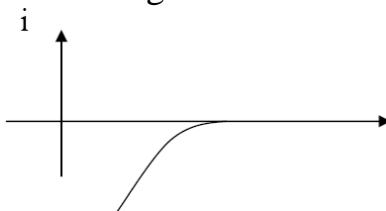
La variazione di potenziale può essere lineare nel tempo (di solito si parte da potenziali positivi e si va verso potenziali negativi), con velocità ad esempio di 10 mV/s, costante:



▪ Se in soluzione esiste solo la specie ossidata e si applica un potenziale sempre più negativo, il voltammogramma ottenuto è



▪ Se in soluzione esiste solo la specie ridotta e si applica all'elettrodo di misura un potenziale sempre più positivo, il voltammogramma è



La stessa corrente i deve anche passare nella soluzione, in cui è portata dagli ioni. Se R è la resistenza della soluzione $i = E \div R$

La funzione i/E dovrebbe quindi essere una retta con pendenza $1/R$.
Pertanto il potenziale che supporta la corrente i è dato da:

$$E = E_c - E_a - iR$$

Questo vale per le coppie redox reversibili. Se nella cella sono presenti coppie irreversibili o lente, per avere passaggio di corrente si deve applicare un potenziale maggiore di quello richiesto dalla relazione di Nernst, e dalla resistenza della cella.

Sovratensione: differenza fra il potenziale applicato e quello calcolato dall'equazione di Nernst per avere una corrente i .

$$E = E_c - E_a - iR + \Delta E$$

1) ΔE : barriera energetica nel processo di trasferimento di elettroni all'elettrodo (sovratensione di attivazione.) Di solito si ha con sostanze gassose, o per reazioni chimiche complicate.

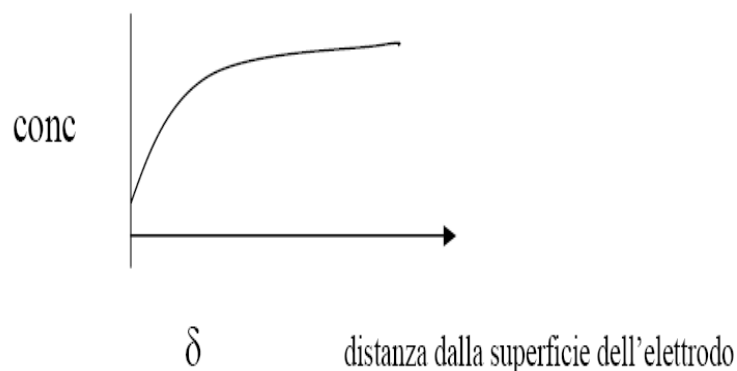
La presenza di sovratensione nella reazione di riduzione dell'acqua con formazione d'idrogeno gassoso rende possibile l'elettrodeposizione di metalli con E° negativo. Es. Zn^{2+} su Zn : $E^\circ = -0,76$ V. Anche a $pH=7$ è minore di $-0,41$ V (potenziale idrogeno). Però la sovratensione dell'idrogeno è $0,75$ V, e quindi effettivamente si riduce Zn^{2+} .

La sovratensione non è prevedibile in modo semplice, e dipende dalla reazione redox all'elettrodo, e dalle condizioni di misura, fra cui la natura dell'elettrodo solido e della sua superficie. Tabelle delle sovratensioni di

sostanze gassose su diversi elettrodi sono reperibili facilmente, data l'importanza delle reazioni coinvolte.

La sovratensione di attivazione è una delle ragioni per cui le funzioni i vs E non sono prevedibili a priori. Sono stati sviluppati comunque dei modelli che permettono di prevedere, almeno qualitativamente, l'andamento dei voltammogrammi.

La concentrazione dell'analita all'elettrodo ad un tempo t dopo l'applicazione di un potenziale per il quale si ha passaggio di corrente sarà come qui riportato.



La corrente fluisce nella cella in quanto esiste una concentrazione non nulla di analita alla superficie dell'elettrodo, che può reagire con gli elettroni a velocità non nulla. A causa

di tale reazione la concentrazione dell'analita all'elettrodo diminuisce, e quindi la corrente diminuisce fino anche ad annullarsi, a meno che non arrivi altro analita alla superficie dell'elettrodo, proveniente dalla soluzione.

Se il potenziale applicato è sufficientemente elevato, la concentrazione della sostanza elettroattiva può essere addirittura zero alla superficie dell'elettrodo, o comunque molto piccola.

In questo caso la corrente andrebbe a zero, se la zona alla superficie dell'elettrodo fosse isolata. In effetti, in queste condizioni possono scaricarsi solo le molecole che arrivano all'elettrodo dalla massa della soluzione.

2.3.1 Trasporto di materie dalla soluzione all'elettrodo

1) **Convezione**: moto causato da agitazione meccanica, e da gradienti di temperatura e di densità.

2) **Migrazione**: moto delle particelle cariche (ioni) per azione di un campo elettrico.

3) **Diffusione**: moto dovuto a gradienti di concentrazione, quali quelli che si producono alla superficie degli elettrodi in seguito al processo elettrodico.

Questo tipo di trasporto è sfruttato per la determinazione della concentrazione in varie tecniche elettroanalitiche, in quanto appunto dipende dalla differenza di concentrazione tra la superficie dell'elettrodo e la massa della soluzione, secondo la legge di Fick.

La legge di Fick per la diffusione dice che una sostanza si muove dall'interno della soluzione (a concentrazione c_{sol}) alla superficie dell'elettrodo, a concentrazione c_{el} con una velocità direttamente proporzionale al gradiente di concentrazione.

dc/dt è il flusso dell'analita verso l'elettrodo, cioè la concentrazione di analita che arriva all'elettrodo nell'unità di tempo per diffusione.

Questa è la concentrazione di analita che reagisce all'elettrodo nell'unità di tempo, se la diffusione è l'unico meccanismo tramite il quale l'analita arriva sull'elettrodo.

$$dc \div dt = K (C_{sol} - C_{el}) \quad i = K_d (C_{sol} - C_{el}) \quad K_d = nFSD \div \delta$$

F: Faraday, 96500 C

S: superficie dell'elettrodo

D: coefficiente di diffusione (variazione di concentrazione nell'unità di tempo attraverso un'unità di superficie, tra due zone con differenza di concentrazione unitaria).

δ: spessore dello strato di diffusione.

Se la velocità di reazione elettronica è sufficientemente elevata, tutto l'analita che arriva all'elettrodo per diffusione reagisce subito, per cui

$$C_{el} = 0 \quad i = K_d \cdot C_{sol} = i_d$$

da cui si vede che la corrente che passa a valori opportunamente grandi del potenziale applicato dipende solo dalla concentrazione dell'analita in soluzione (se lo spessore dello strato di diffusione è costante).

La corrente corrispondente si chiama corrente di diffusione limite.

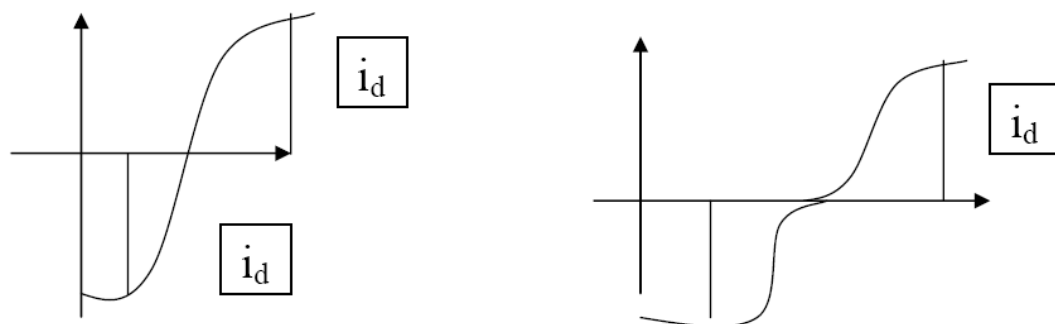
Affinché la sostanza di interesse giunga all'elettrodo solo per diffusione, bisogna eliminare la convezione operando in soluzioni ferme e a temperatura omogenea. Dato che non è possibile operare in soluzioni assolutamente ferme, bisogna comunque rendere la convezione riproducibile, come si vedrà parlando degli elettrodi di lavoro.

Se l'analita d'interesse è uno ione bisogna anche minimizzare la migrazione, aggiungendo alla soluzione in esame un'elevata concentrazione di elettrolita, almeno 100 volte superiore a quella dell'analita, in modo che la corrente in soluzione sia sostenuta da tali ioni anziché dall'analita.

L'elettrolita aggiunto si chiama elettrolita di supporto.

La corrente di diffusione limite che si ricava dal voltammogramma, ottenuto riportando le correnti di diffusione per diversi potenziali applicati, è utilizzata come parametro analitico per determinazioni quantitative.

Funzione i vs E (Polarogramma o Voltammogramma) ottenuto per una coppia redox reversibile e irreversibile rispettivamente.



Per potenziali sufficientemente alti (in valore assoluto) la velocità della reazione di scambio elettronico all'elettrodo è molto alta, e quindi la velocità di reazione è determinata solo dalla velocità con cui l'analita arriva a contatto con l'elettrodo dal corpo della soluzione, anziché dalla velocità di scambio elettronico.

Polarizzazione: è il fenomeno per cui la corrente di cella non è proporzionale al potenziale applicato.

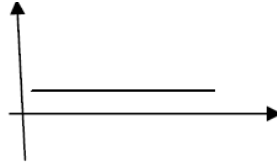
Celle, o semicelle, nelle quali la corrente è direttamente proporzionale al potenziale si dicono non polarizzate.

Se la corrente che passa nella cella non è direttamente proporzionale al potenziale applicato la cella si dice polarizzata.

La cella è polarizzata quando il potenziale applicato non raggiunge il valore di scarica della specie di interesse, cioè quello previsto dalla legge di Nernst aumentato dell'eventuale sovratensione, se in presenza di coppie redox irreversibili. Infatti nella cella in queste condizioni non passa corrente.

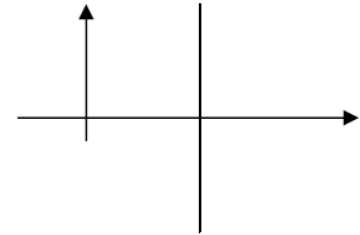
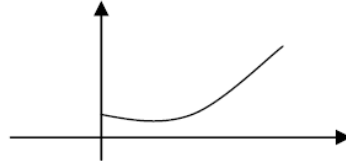
La cella risulta polarizzata anche per alti potenziali applicati, tanto positivi che negativi, in quanto è raggiunta la corrente di diffusione limite, e quindi la corrente è costante in funzione del potenziale applicato.

Cella polarizzata



Cella idealmente non polarizzata

Cella depolarizzata



2.3.2. Corrente

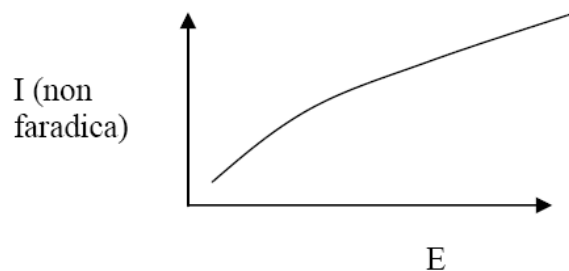
CORRENTE CAPACITIVA, DI CARICA O NON FARADICA:

Applicando un potenziale all'elettrodo, l'interfaccia elettrodo-soluzione si comporta come un condensatore, nel senso che ad esempio si accumula una carica negativa sull'elettrodo (se si applica un potenziale negativo) che attira un corrispondente numero di cariche positive dalla soluzione, formando un doppio strato elettrico all'interfaccia elettrodo/soluzione.

La corrente ionica necessaria si chiama corrente di carica, e decade nel tempo velocemente fino a un valore zero, quando il doppio strato si sia completamente formato.

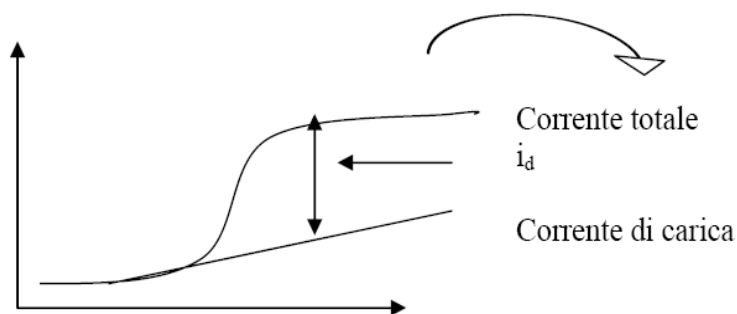
Se l'elettrodo viene portato a un potenziale più negativo, passerà ancora corrente di carica, per formare un differente doppio strato con differenti cariche.

Quindi variando continuamente il potenziale, si avrà comunque una corrente di carica, oltre eventualmente a quella faradica, se il potenziale è opportuno.



La corrente di carica del doppio strato è molto alta se la velocità di variazione del potenziale applicato all'elettrodo è elevata. Questa corrente può nascondere completamente la corrente faradica, e quindi deve essere minimizzata. Un modo di diminuirla è quella di far variare lentamente il potenziale applicato all'elettrodo.

L'eventuale corrente di carica deve essere sottratta alla corrente totale per avere la corrente di diffusione.



Affinché la corrente di diffusione limite resti effettivamente costante nel tempo, la concentrazione della sostanza in esame nel corpo della soluzione deve rimanere costante nel tempo, come mostrato dalla relazione vista sopra.

Quindi le correnti di diffusione limite devono essere abbastanza piccole, in modo che la concentrazione di analita presente nel campione non vari sostanzialmente durante la misura.

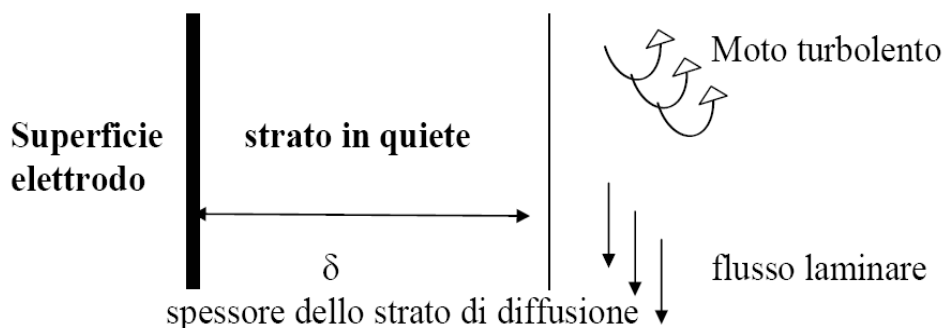
A tal fine bisogna usare elettrodi piccoli, della superficie dell'ordine dei mm² (microelettrodi).

Se si fanno misure in cui si sfrutta la corrente di diffusione limite, l'elettrodo di lavoro è polarizzato, per cui le misure si dicono polarografiche e il grafico da cui si ottiene i_d si chiama polarogramma.

E' necessario mantenere costante lo spessore dello strato di diffusione, che altrimenti penetrerebbe man mano nella soluzione, aumentando di spessore, mentre si richiede che resti costante. Infatti, la costante di proporzionalità k_d tra corrente di diffusione limite e concentrazione è $K_d = nFS \div \delta$

S è la superficie dell'elettrodo, δ è lo spessore dello strato di diffusione.

Il moto laminare o turbolento mantiene la concentrazione costante all'esterno dello strato in quiete aderente all'elettrodo.



Il moto può essere a livello di soluzione (soluzione agitata o fatta fluire) oppure a livello di elettrodo (uso dell'elettrodo rotante o elettrodo a goccia cadente).

Gli elettrodi di riferimento sono chiamati anche controelettrodi, dato che a tali elettrodi avviene la reazione opposta a quella dell'elettrodo di lavoro.

Sono elettrodi depolarizzati, in quanto la corrente di cella deve essere limitata soltanto dalla polarizzazione dell'elettrodo di lavoro.

Controelettrodi utilizzati:

Pt: riduzione o ossidazione dell'acqua.

Ag/AgCl: riduzione o ossidazione di Ag.

2.4 . Caratteristiche

2.4.1. Elettrodo Ag-AgCl

Gli elettrodi del primo tipo sono composti da un metallo immerso in un elettrolita, contenente ioni dello stesso tipo. Sono detti del secondo tipo quelli caratterizzati da un metallo immerso in un elettrolita formante un composto sulla sua superficie (ioni del metallo e anioni dell'elettrolita). A questa classe appartiene l'elettrodo Ag/AgCl, composto da argento (oppure platino ricoperto di argento) ricoperto da uno strato poroso di cloruro di argento.

All'interfaccia possiamo scrivere:

Pt0 : H₂ (P atm) | HCl (m) aqueous AgCl: Ag0

La forza elettromotrice (emf) della cella è proporzionale all'energia libera di Gibbs:

$$nFE = -\Delta G$$

dove:

n = numero degli elettroni presenti nella reazione;

F = costante di Faraday;

E = forza elettromotrice della cella (emf);

$-\Delta G$ = variazione dell'energia libera di Gibbs.

$$E = E_{AgCl}^0 - \left(\frac{RT}{F} \right) \ln a_{Cl^-} - E_{H_2}^0 + \left(\frac{RT}{F} \right) \ln a_{H^+} - \left(\frac{RT}{2F} \right) \ln P_{H_2} \quad \text{V}$$

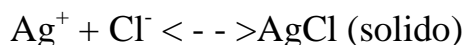
Dove R è la costante assoluta dei gas, T la temperatura in gradi Kelvin, $E_{AgCl}^0 = E_{Ag,AgCl,Cl^-}^0$

e $E_{H_2}^0 = E_{H_2,H^+}$ sono potenziali standard, a_{Cl^-} , a_{H^+} è rispettivamente, le attività degli ioni Cl⁻ e H⁺ nella soluzione e P_{H_2} è la pressione parziale dell'idrogeno gassoso in soluzione.

Per convenzione $E_{H_2}^0 = 0$ a tutte le temperature, $a_{H^+} = 1$ e $P_{H_2} = 1$ atm allora:

$$E_{Ag,AgCl,Cl^-} = E_{Ag,AgCl,Cl^-}^0 - \left(\frac{RT}{F} \right) \ln a_{Cl^-} \quad \text{V}$$

L'elettrodo è reversibile rispetto agli ioni cloro: quando funziona da anodo, gli ioni Cl⁻ si combinano con l'Ag⁺ per formare AgCl; quando fa da catodo, gli ioni Cl⁻ passano in soluzione, sottraendo AgCl all'elettrodo. L'equilibrio è rappresentato da:



In condizioni di equilibrio, la velocità di dissoluzione dell'AgCl è costante ed è bilanciata da quella di associazione degli ioni argento e cloro. Visto che le concentrazioni dei due ioni devono essere uguali (prodotto di solubilità), è ragionevole aspettarsi che la velocità di associazione sia proporzionale alle loro attività:

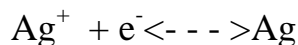
$$(a_{\text{Ag}^+}) \cdot (a_{\text{Cl}^-}) = \text{costante}$$

La presenza di AgCl allo stato solido nella soluzione che già contiene ioni cloro provenienti dalla dissociazione di un'altra sostanza non cambia la velocità di dissociazione dell'AgCl. Per rispettare l'uguaglianza appena scritta, dovrà diminuire l'attività degli ioni argento. Quindi, il prodotto di solubilità, dato da:

$$K_s = (a_{\text{Ag}^+}) \cdot (a_{\text{Cl}^-})$$

è per una data temperatura, indipendente dalle attività dei due ioni e pari a $1,78 \times 10^{-10}$ a 25°C.

Lo scambio di elettroni sulla superficie dell'argento avviene secondo:



per cui il potenziale dell'elettrodo Ag/AgCl è quello dell'elettrodo Ag⁺/Ag, in cui l'attività dello ione argento è determinata dall'equazione (1). Applicando l'equazione di Nernst (con $z = 1$) si ha:

$$E_{\text{Ag,AgCl,Cl}^-} = E_{\text{Ag,Ag}^+}^0 - \left(\frac{RT}{F} \right) \ln K_s - \left(\frac{RT}{F} \right) \ln a_{\text{Cl}^-}$$

Secondo i dati tabulati dei potenziali degli elettrodi standard, $E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}} = 0,799 \text{ V}$.

L'elettrodo Ag/AgCl è probabilmente il più riproducibile (assieme all'elettrodo a idrogeno), il più affidabile e conveniente elettrodo di riferimento. Due elettrodi preparati accuratamente ed immersi nella stessa soluzione hanno potenziali che differiscono di meno di 50 pV, e questa differenza varia di meno di 10 μV dopo un lungo intervallo di tempo. I microelettrodi per la misurazione intracellulare dell'attività dello ione cloro sono spesso costituiti da elettrodi Ag/AgCl. Fonte di avvelenamento sono il KBr e la presenza di ossigeno in soluzioni acide. Inoltre, nei tessuti biologici, certe reazioni possono consumare lo strato di cloruro di argento fino a rendere l'elettrodo inservibile.

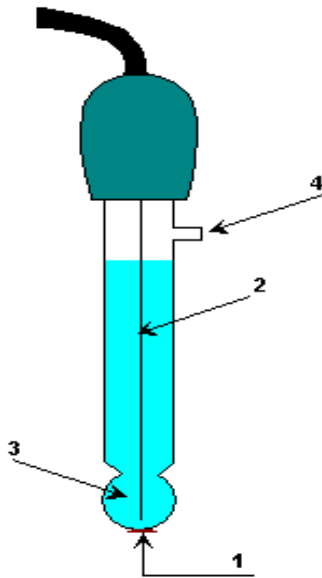


Fig.1

- (1) Setto poroso
- (2) Filo di Ag rivestito di AgCl
- (3) Soluzione di KCl
- (4) Bocchetta per il rinnovo della soluzione di KCl

2.4.2 . Membrana semipermeabile

Alcune membrane sono caratterizzate dalla proprietà di permettere il passaggio selettivo di molecole aventi una dimensione inferiore ad un certo valore. Questa proprietà è detta semipermeabilità e può essere spiegata intuitivamente con un modello meccanico molto semplice. Questo modello "a setaccio" suppone che la membrana sia costituita da una "matrice di fori", il cui diametro massimo è ben determinato: in tal caso, solo le molecole di soluto possono subire il normale processo di diffusione, a differenza delle molecole di solvente che, per ipotesi, hanno un diametro molto minore. In realtà, secondo un modello più realistico, la membrana è permeabile sia al soluto che al solvente; però, con coefficienti di diffusione notevolmente differenti (quello relativo al soluto è molto maggiore di quello relativo al solvente).

Risulta comunque chiara la difficoltà di individuare un modello sufficientemente realistico della semipermeabilità, considerando che la differenza nei coefficienti di diffusione può trovare una spiegazione definitiva soltanto mediante una caratterizzazione sufficientemente verosimile delle interazioni microscopiche tra le molecole del soluto, quelle del solvente e quelle che costituiscono la membrana. Se si pone in un recipiente formato da una membrana dializzatrice una miscela di una soluzione unita a particelle relativamente grandi, e si immerge il recipiente in una vasca contenente acqua distillata, il soluto che si trova nella soluzione vera attraversa per diffusione (legge di Fick) la membrana fino ad eguagliare la concentrazione nei due recipienti, mentre il colloide viene trattenuto.

Se nel recipiente l'acqua viene rinnovata continuamente, si potrà filtrare completamente il soluto mentre il colloide resterà nel recipiente a membrana.

Una membrana semipermeabile è una membrana che lascia passare alcuni atomi o molecole ma non altre.

La pellicola trasparente per alimenti è una membrana, ma è impermeabile a tutto ciò con cui comunemente viene a contatto. Il più comune esempio di membrana semipermeabile sono la membrana intestinale e le membrane cellulari. Le membrane semipermeabili fanno parte anche della vita di ogni giorno. Per esempio, il Gore-tex® (un materiale impiegato per calzature, guanti e tute impermeabili): è costituito da una sottilissima pellicola di plastica in cui sono stati praticati miliardi di piccoli fori (pori). Questi fori sono grandi abbastanza per far passare le molecole del vapore acqueo, ma abbastanza piccoli per impedire il passaggio dei liquidi. Le membrane sono impiegate per la microfiltrazione, l'ultrafiltrazione, e l'osmosi inversa.

Membrane semipermeabili con un'adatta selettività sono utilizzate in tecnologie di separazione a livello molecolare, dei componenti delle soluzioni, in aggiunta o in sostituzione dei trattamenti termici.

I vantaggi economici che ne derivano riguardano principalmente il miglioramento della qualità del prodotto e la stabilità delle sue caratteristiche nel tempo. L'energia elettrica è necessaria per l'azionamento dei motori delle pompe che generano la differenza di pressione richiesta.

2.4.3. Elettrodo di platino

Il nome platino deriva dallo spagnolo "platina" che significa piccolo argento. Il platino è un metallo bianco-argenteo brillante, malleabile, duttile ed un membro del gruppo 10 della tabella periodica degli elementi. È il terzo in densità, dietro l'osmio e l'iridio. Il platino non è alterato da aria e da acqua, ma si dissolve in acqua regia calda, in acido fosforico e solforico caldi concentrati ed in alcali fusi. È resistente quanto l'oro alla corrosione ed all'appannamento. In effetti, il platino non si ossida in aria, non importa quanto forte sia riscaldato. È dotato di un coefficiente di espansione quasi uguale a quello del vetro a soda – calce -silice e quindi è usato fare elettrodi sigillati nei sistemi di vetro. Le miscele gassose di idrogeno ed ossigeno esplodono in presenza di fili di platino. Esistono sei isotopi che si trovano in natura: i più abbondanti sono platino-194, che costituisce il 33%, platino-195 (34%) e platino-196 (25%). Gli altri sono platino-198 (7%), platino-192 (1%) e platino-190 (0.01%). Quest'ultimo è debolmente radioattivo, con un periodo radioattivo di 700 miliardi di anni, mentre gli altri cinque non sono radioattivi.

Il platino ha molti usi. Le sue caratteristiche di resistenza all'appannamento e all'usura lo rendono ben adatto per fare gioielli fini. Il platino e le sue leghe sono usati in attrezzi chirurgici, negli utensili da laboratorio, nei cavi elettrici di resistenza e nei punti di contatto elettrico. È usato (30%) come catalizzatore nelle marmitte catalitiche, un componente opzionale del sistema di scarico della benzina-esausta delle automobili. Il maggiore uso

(50%) del platino è per gioielleria, un altro 20% è usato nell'industria: il platino è usato nell'industria aeronautica chimica, elettrica e del vetro, ciascuna delle quali consuma circa 10 tonnellate del metallo all'anno. L'industria del vetro usa il platino per le fibre ottiche ed il vetro degli schermi a cristalli liquidi, particolarmente per i computer portatili.

Il platino è usato come componente di molti prodotti metallici, come elettrodi, e può essere usato come catalizzatore in numerose reazioni chimiche.

I legami del platino sono spesso applicati come medicina nelle cure per il cancro. Gli effetti del platino sulla salute sono fortemente dipendenti dal tipo di legami che si formano, e dal livello di esposizione e d'immunità delle persone che vi sono esposte.

2.5. Il calcolo della saturazione dell'ossigeno

Il valore di PO_2 (pressione parziale dell'ossigeno) misura la pressione dell'ossigeno disciolto nel sangue. Le cause che possono provocare una diminuzione dei valori di PO_2 comprendono riduzione della ventilazione polmonare (come in caso di ostruzione delle vie respiratorie o trauma cerebrale), alterato scambio gassoso fra aria alveolare e sangue capillare polmonare (come in caso di bronchite, enfisema o edema polmonare) e alterazioni del flusso ematico a livello cardiaco o polmonare (come nel caso di anomalie cardiache congenite o di shunt arterovenoso senza ossigenazione nei polmoni).

Il valore di sO_2 (saturazione dell'ossigeno) rappresenta la quantità di ossiemoglobina espressa come frazione della quantità totale di emoglobina in grado di legarsi all'ossigeno (ossiemoglobina più deossiemoglobina).

$$sO_2 = 100 \cdot \frac{K^3 + 150X}{K^3 + 150X + 23400}$$

$$\text{Dove } X = PO_2 \cdot 10^{0.48(pH-7.4) - 0.0013(pCO_2-25)}$$

sO_2 viene calcolato da PO_2 e pH misurati e da HCO_3 ottenuto da PCO_2 e pH misurati.

Tuttavia, questo calcolo presuppone che il livello di affinità fra ossigeno ed emoglobina sia normale (ossia non tiene conto delle concentrazioni di difosfoglicerato (2,3-DPG) negli eritrociti che influiscono sulla curva di dissociazione dell'ossigeno).

Inoltre, il calcolo non tiene conto degli effetti dell'emoglobina fetale o delle emoglobine disfunzionali (carbossi-emoglobina, metaemoglobina e solfoemoglobina). L'uso di questo valore presunto di sO_2 per la saturazione dell'ossigeno in altri calcoli, ad esempio nella frazione di shunt, oppure supponendo che il valore ottenuto sia equivalente all'ossiemoglobina frazionale, può dare origine a errori importanti dal punto di vista clinico.

La saturazione dell'ossigeno è utile per prevedere la quantità di ossigeno disponibile per la perfusione dei tessuti. La diminuzione dei livelli di sO_2 può essere determinata da un basso valore di PO_2 o da una minore capacità di trasporto dell'ossigeno da parte dell'emoglobina.

3. Polarografia

3.1. Definizione

La polarografia è una tecnica analitica che permette di condurre delle analisi qualitative e quantitative tramite la misurazione della corrente che fluisce in un circuito durante un'elettrolisi a voltaggio controllato. Rappresenta una variante della voltammetria.

L'apparecchiatura in grado di svolgere questo tipo di analisi è detta polarografo. Un polarografo è costituito da un capillare da cui sgocciola mercurio (elettrodo di lavoro detto DME, elettrodo a goccia di mercurio) e da un controlettrodo a potenziale costante, normalmente un elettrodo a calomelano o un elettrodo ad Ag/AgCl.

L'elettrodo di lavoro in realtà non è costituito da tutto il capillare, bensì dalle singole gocce che, pur avendo un tempo di vita breve (5-20 s), interagiscono con la soluzione.

Questa tecnica fu ideata e sviluppata dal chimico cecoslovacco Jaroslav Heyrovský nel 1922. La corrente che viene monitorata in polarografia convenzionale è la corrente di diffusione, i_d . Questa corrente è proporzionale alla concentrazione delle specie da analizzare e quindi si può utilizzare per calcoli quantitativi.

Per avere una corrente di elettrolisi che dipenda solo dalla diffusione, dovuta al gradiente di concentrazione esistente tra la zona centrale e la zona adiacente all'elettrodo DME, si devono eliminare tutti gli altri fattori che causerebbero movimento degli ioni in soluzione. Questi fattori sono la convezione (agitazione meccanica o magnetica) e la migrazione elettrica. La convezione viene evitata lasciando in quiete la soluzione, mentre la migrazione elettrica viene contrastata tramite l'aggiunta di un elettrolita in grandi quantità, per esempio usando KCl.

Riportando su un grafico la corrente di elettrolisi contro il potenziale applicato all'elettrodo si ha un polarogramma.

La corrente che circola nel circuito polarografico viene misurata in continuazione e l'oscillazione della corrente nel polarogramma è dovuta al distacco e alla formazione delle gocce, che provocano una continua variazione della superficie dell'elettrodo. Lo sgocciolare, però, garantisce la riproducibilità dei dati in quanto l'elettrodo di lavoro è sempre nuovo e pulito. Un'analisi polarografica, quindi, dipende solo dalla concentrazione delle specie da analizzare e dai loro coefficienti di diffusione.

Oltre ad una elevata riproducibilità, un'analisi polarografica vanta la possibilità di essere ripetuta sullo stesso campione un numero elevato di volte senza mostrare variazioni apprezzabili nei risultati, con conseguente diminuzione dell'errore sperimentale. Questo è possibile poiché durante l'analisi viene ridotta solamente una piccolissima parte di analita.

La prima porzione di curva, quella parallela all'asse delle x, rappresenta la corrente di carica. Questa corrente non-faradica è dovuta alla formazione di un doppio strato elettrico in prossimità dell'elettrodo di lavoro, fenomeno legato alla polarizzabilità di quest'ultimo. La zona del grafico in cui si ha un forte incremento della corrente è la parte che indica che il potenziale d'elettrolisi è stato eguagliato e superato. Leggendo il potenziale a metà altezza

della curva si avrà il cosiddetto potenziale di semionda, $V_{1/2}$, approssimabile al potenziale standard di riduzione. Questo valore è caratteristico per ogni sostanza e permette di effettuare un'analisi qualitativa della soluzione in esame. Dopo questa impennata si ha una corrente costante (plateau) dovuta solo alla diffusione. Sottraendo la corrente del plateau alla corrente di carica si ha la corrente di diffusione.

La corrente di diffusione può essere espressa tramite l'equazione di Ilkovic:

$$i_d = 708nCD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6}$$

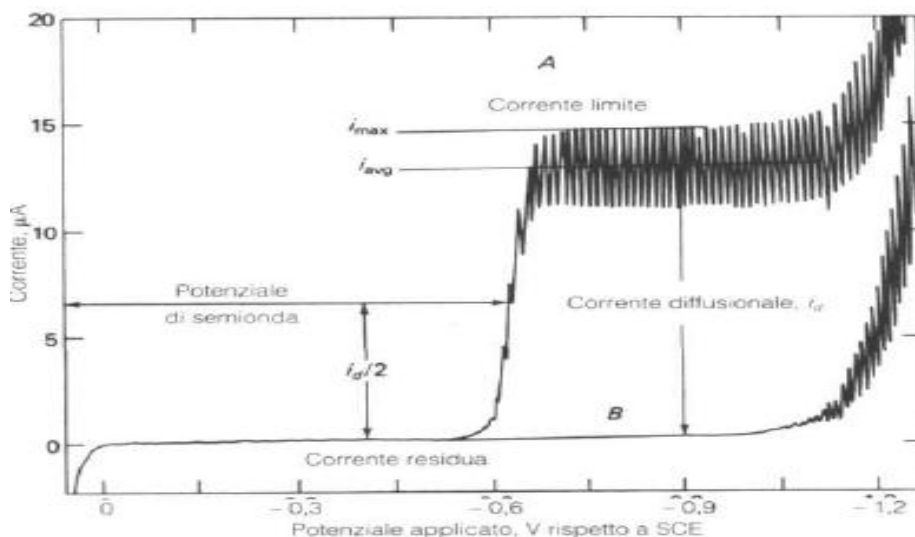
dove:

- n = numero di elettroni implicati nella reazione di elettrolisi;
- C e D = rispettivamente, concentrazione e coefficiente di diffusione della specie oggetto dell'elettrolisi;
- t = tempo di sgocciolamento;
- m = peso del mercurio caduto nell'unità di tempo.

Questa legge è valida approssimando la goccia di Hg ad una forma sferica.

Utilizzando questa legge quindi si può determinare, oltre alla concentrazione, anche il coefficiente di diffusione di una determinata specie chimica. Raggruppando i termini costanti, l'equazione assume la forma semplificata $i_d = K C$.

Se la soluzione da analizzare comprende più elementi il polarogramma avrà più plateau, uno per ogni specie analizzata. Ogni incremento di corrente indicherà una specie diversa perché corrisponderà ad un diverso potenziale standard di riduzione. In questo caso la corrente di diffusione, i_d , sarà calcolata sottraendo le correnti relative ai due plateau interessati.



Un problema comune a tutte le analisi polarografiche è la presenza di ossigeno disciolto in soluzione, infatti l'ossigeno può essere ridotto durante l'analisi, verso -0.1 V a O^- come H_2O_2 e successivamente verso -0.9 V a O^{2-} come H_2O , interferendo quindi con le correnti di

diffusione degli analiti. Per eliminare l'ossigeno dalla soluzione vi si fa gorgogliare azoto gassoso in modo da saturare l'ambiente. È evidente quindi che in un'analisi polarografica gli elettrodi ed il campione da analizzare devono essere isolati dall'ambiente esterno.

La tecnica polarografica finora descritta ha un limite di rivelabilità pari a circa 10^{-6} moli/litro. Altri metodi polarografici, più moderni, sono in grado di arrivare a concentrazioni pari a 10^{-8} , 10^{-9} M.

Alcuni metodi per aumentare la sensibilità si basano sulla riduzione della corrente di carica, altri associano a questo sistema l'aumento della corrente prodotta per elettrolisi (corrente faradica), altre invece si basano sulla preconcentrazione degli analiti tramite elettrolisi veloce e comunque esistono sistemi combinati di questi accorgimenti.

3.2. Polarografia ad impulsi

Per diminuire la corrente di carica si effettuano delle misurazioni di corrente dopo aver somministrato un impulso di tensione sempre crescente per circa 40 ms, in modo da avere tra un impulso e l'altro tensione nulla. L'impulso viene somministrato prima della caduta della goccia e negli ultimi 20 ms di vita della goccia e dell'impulso si misura la corrente. In questo modo quando si effettua la misura, la corrente di carica è minima. Questa tecnica si chiama polarografia ad impulsi e, oltre a diminuire la corrente di carica, ha come effetto quello di aumentare la corrente faradica.

Una tecnica simile a questa è sfruttata dalla polarografia ad impulsi differenziali. A differenza della metodica precedente, in questa tecnica la tensione non va mai a zero ma aumenta linearmente; in questo modo l'impulso ha sempre la stessa intensità. Questa tecnica comporta una diminuzione della corrente di carica e prevede la misurazione della corrente faradica circa 20 ms prima che venga somministrato l'impulso e circa 20 ms prima che cada la goccia. Anche in questo caso l'impulso è somministrato circa 40 ms prima che la goccia cada.

Se consideriamo il polarogramma derivante dalla polarografia ad impulsi lo troviamo pressoché uguale al polarogramma convenzionale (la curva segue lo stesso andamento). Un polarogramma derivante da una tecnica ad impulsi differenziali si presenta invece con una forma a campana, questo perché in grafico non è riportata la corrente in funzione della differenza di potenziale, bensì la differenza tra le due misurazioni della corrente per ogni goccia contro la differenza di potenziale.

Nelle tecniche polarografiche ad impulsi la vita della goccia è controllata meccanicamente, in questo modo la misurazione della corrente e l'impulso possono essere effettuate in maniera riproducibile.

3.3. Polarografia di stripping anodico

Una metodica utilizzata per determinare la concentrazione di elementi quali piombo, cadmio e rame è la tecnica detta di stripping anodico, che sfrutta dei principi per un certo verso contrari alla polarografia convenzionale.

Mentre nella tecnica convenzionale si misura una corrente di riduzione dovuta alle specie presenti in soluzione, nello stripping anodico si misura la corrente di ossidazione delle specie presenti in una amalgama di Hg. Come già detto, nella polarografia convenzionale si effettua un'elettrolisi delle sostanze da analizzare (si passa da potenziali leggermente positivi, 0.6 V, a potenziali negativi -1.2 V) mentre nello stripping anodico si effettua una preconcentrazione nella goccia di Hg, che per altro in questo caso è unica e pendente, formando un amalgama. Finita l'elettrolisi si effettua un'ossidazione degli analiti seguendo una rampa di potenziale che assume valori sempre più positivi secondo una semplice variazione lineare (Linear Sweep Voltammetry LSV) o una tecnica ad impulsi differenziali (Differential Pulse Voltammetry DPV) o meglio ancora una Voltammetria ad onda quadra (Square Wave Voltammetry SWV) che consiste in un'onda quadra sovrapposta ad una rampa di tensione a gradini, entrambe con lo stesso periodo ed in fase. Naturalmente, avendo una unica goccia, la misurazione della corrente avviene 20 ms prima dell'impulso e 20 ms prima della fine dell'impulso che in totale dura 40 ms.

Nello stripping anodico la corrente misurata non è solo quella di diffusione in quanto nella fase di preconcentrazione si agita la soluzione. Questo non è un problema dal punto di vista analitico perché anche questa corrente è proporzionale alla concentrazione. La riproducibilità della tecnica è anch'essa garantita perché tutte le operazioni sono controllate da un calcolatore, quindi sia il tempo d'agitazione che l'intensità sono standard per ogni analisi. Questa tecnica ha il limite di determinazione più basso: 10^{-9} M.

4. Tipi diversi di sensori di ossigeno

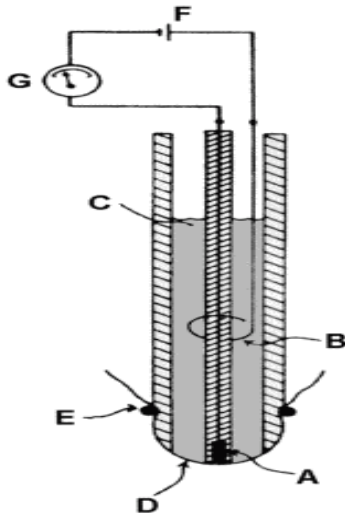
4.1. Elettrodo di Clark

Il sensore di Clark è un dispositivo elettrochimico che permette di misurare per via amperometrica la concentrazione di ossigeno disciolto nelle acque o in fluidi biologici. Ideato da Leland Clark, venne brevettato nel 1956.

Nella pratica comune viene spesso erroneamente indicato come elettrodo di Clark.

È formato internamente da due elettrodi: un catodo di platino ed un anodo di Ag/AgCl.

Il catodo è posto in un cilindro isolante su cui è avvolto l'anodo, il tutto è contenuto in un altro cilindro che contiene una soluzione di cloruro di potassio. In fondo il sensore è



Sensore di Clark: elettrodi di Pt (A) e Ag/AgCl (B), soluzione di KCl (C), membrana (D), anello di gomma(E), potenziostato (F), galvanometro (G).

chiuso da una membrana di un polimero permeabile ai gas (solitamente PE o PTFE). Tra i due elettrodi è imposta una ddp di $600 \div 800$ mV.

Si tratta del capostipite dei sensori a membrana gas-permeabile. In questo modo si evitano i problemi di avvelenamento dell'elettrodo dovuti, tra i vari fattori anche alla deposizione di proteine sul catodo. Nell'elettrodo di Clark non c'è nessun contatto elettrico con la soluzione in esame e l'elettrodo di riferimento è contenuto all'interno del dispositivo stesso. Un ulteriore vantaggio risiede nella possibilità di misurare la tensione di ossigeno anche in mezzi non conduttivi.

4.2 Sensore di tipo polarometrico



Il funzionamento del sensore Polarometrico è basato sul seguente principio:

- L'ossigeno in presenza dell'elettrolita innesca una reazione tra l'anodo ed il catodo. L'intensità della corrente è funzione lineare della percentuale di ossigeno nell'atmosfera a contatto con l'elettrodo;

- misura continua del livello dell'elettrolita mediante fibra ottica. Se il livello dell'elettrolita dovesse scendere sotto il livello prestabilito, si attiva un segnale di allarme sulla centralina visualizzato mediante display alfanumerico;

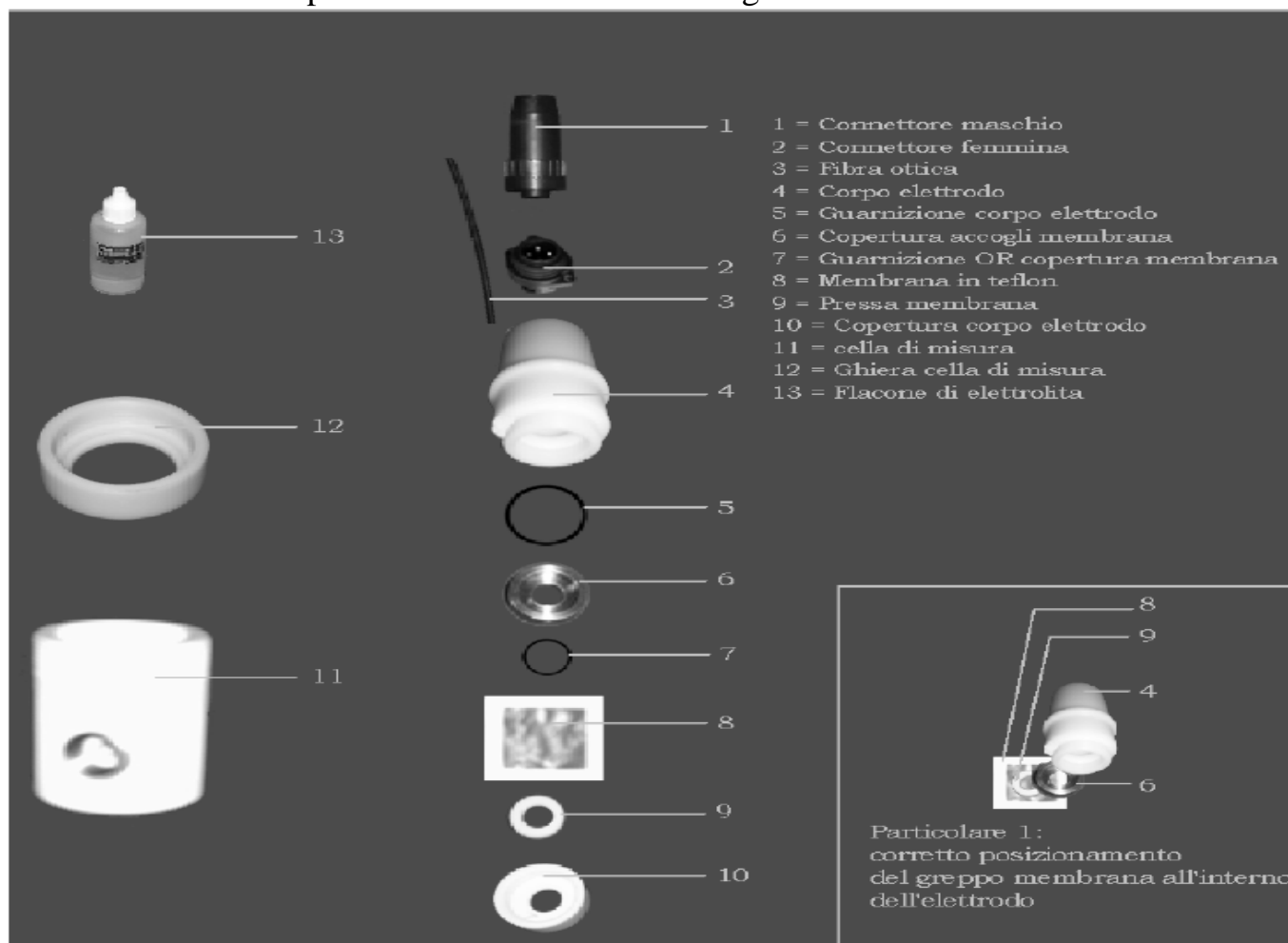
- Per ristabilire il corretto livello di elettrolita consultare il successivo paragrafo sulla manutenzione.

CARATTERISTICHE TECNICHE	
Tipologia elettrodo	Polarometrico Pt / Ag
Costruzione del sensore	Teflon - derlin
Compensazione automatica della temperatura	SI
Temperatura gas campione	Max 40 °C
Rilevamento automatico livello elettrolita	SI
Stabilità	A pressione costante 2 % della lettura a settimana

MANUTENZIONE ORDINARIA DELL'ETTRODO DI MISURA O₂

Questa operazione è da svolgersi ad intervalli regolari di 3-4 mesi.

Per individuare i componenti si fa riferimento alla figura sottostante:



4.3. Tipi vari...

4.3.1. Sensori di Ossigeno Disciolto T17DO4000

I sensori T17DO4000 costituiscono, assieme al trasmettitore a microprocessore della famiglia Micro2Chem™, un sistema semplice e sicuro per la misura dell'Ossigeno Disciolto in liquidi di processo. Le sonde ad immersione sono realizzate per consentire l'inserimento diretto del sensore di ossigeno in vasche, canali e bacini. La sonda in cella a deflusso permette di misurare la concentrazione di ossigeno in un sistema a campionamento continuo non in pressione.

Il sensore è di tipo amperometrico a membrana. La cella di misura è costituita da un elettrodo in oro e da un controelettrodo in rame, immersi in un opportuno elettrolita, ed è separata dal campione tramite una membrana in teflon, permeabile alla fase gassosa, che consente lo scambio dell'ossigeno disciolto tra il campione e la cella.

L'effetto depolarizzante dovuto alla presenza di ossigeno nello strato di elettrolita tra la membrana e l'elettrodo di misura causa la circolazione di una corrente che è proporzionale alla concentrazione dell'ossigeno disciolto nel campione. Le sonde sono realizzate in materiale plastico e sono studiate per garantire la protezione meccanica del sensore ed il funzionamento in immersione; il pressacavo assicura la tenuta IP68.

Per l'applicazione su fluidi di processo che contengono grassi o sostanze sporcanti è disponibile un accessorio opzionale per la pulizia automatica del sensore, che permette di aumentare notevolmente i tempi d'intervallo tra un'operazione di manutenzione e l'altra.

Durante la sequenza di pulizia, sia automatica sia manuale, è previsto, sul trasmettitore, il congelamento del segnale in uscita.



CARATTERISTICHE GENERALI

- Elevata affidabilità: la cella di misura è autopolarizzante (elettrodi Au/Cu); non essendo richiesto nessun circuito di controllo della tensione di alimentazione, è garantita la stabilità della misura;
- Estesa superficie della membrana di misura: consente elevata stabilità e limitati interventi di manutenzione. La membrana è montata su un supporto filettato di facile sostituzione;
- Serbatoio di elettrolita di elevata capacità: assicura prolungati periodi di esercizio senza richiedere la sostituzione della soluzione;
- Resistenza di termocompensazione: corregge rapidamente il segnale per variazioni di sensibilità dovute alle variazioni di temperatura del campione;
- Sonde di misura di varie lunghezze: sono disponibili sonde di varie lunghezze (0,3m; 1,2m e 1,7 m); la profondità d'immersione è per tutte 3 m (le sonde sono a protezione IP68). La sonda da 0,3 m è disponibile anche in versione con cella a deflusso.

4.3.2. Oxygraph

Oxygraph è un sistema controllato da computer per la misura dell'evoluzione dell'ossigeno in sospensioni liquide variabili da 200 μ l a 2.5ml. Il sistema è collegato mediante porta seriale ad un computer con sistema operativo Windows® 3.1, 3.11, Win95 o Win98 e viene controllato mediante il software fornito. Il segnale proveniente dall'elettrodo ad ossigeno viene visualizzato sullo schermo del PC come traccia e/o in forma numerica. Il software dispone di strumenti di analisi dei dati e di personalizzazione delle tracce, come ad esempio caselle di testo per marcare i singoli eventi. Tutti i dati originali e calcolati possono essere facilmente esportati ad altre applicazioni.



Le misure di ossigeno vengono effettuate nella unità elettrodo DW1. Essa consiste in un porta campioni in borosilicato a volume regolabile (da 200 μ l a 2.5 ml) con un elettrodo ad

ossigeno removibile posizionato alla base della camera porta campione. Attorno alla camera si trova una camicia d'acqua trasparente con due porte per ingresso ed uscita di acqua termostatante proveniente da un bagnetto (non fornito). Il controllo della temperatura è un elemento fondamentale nelle misure di ossigeno.

L'unità di controllo Oxygraph combina le funzioni della tradizionale unità di controllo (CB1-D3), dell'agitatore magnetico (A1) ed un'interfaccia analogica - digitale (IF2) in un'unica unità integrata.

Lo strumento è controllato mediante PC collegato con cavo seriale tipo RS-232, il sistema è compatibile con sistemi operativi Windows 3.1x or Win95, Win98 PC (non forniti). Il software di controllo ed analisi dei dati presenta funzioni e strumenti personalizzabili. La calibrazione viene eseguita via PC ed è estremamente semplice. I dati vengono visualizzati in diretta con emulazione di un chart recorder con facilità di marcare gli eventi più significativi; è inoltre possibile tabulare i dati ed esportarli ad altre applicazioni.

Il sistema può essere configurato per registrare un segnale da 0-4V (OXY/AUX) e può essere esteso a sistema multi canale pilotati da un unico PC (da 1 a 8 canali).

4.3.3. Strumento portatile di misura dell'ossigeno

Lo strumento portatile di misura dell'ossigeno (666 224) associato all'elettrodo ossigeno (667 458) serve a misurare la quantità assoluta e relativa di ossigeno contenuto nei liquidi e nell'aria. L'effetto della temperatura viene compensato automaticamente da un sensore incorporato al sistema. Il sistema dispone anche di un sensore di pressione che serve a compensare automaticamente gli effetti della pressione dell'aria. Il dispositivo è in grado di visualizzare anche i valori della temperatura e della pressione.

Principio della misura:

Il funzionamento del sensore si basa sul principio dell'elettrodo di Clark; il suo vantaggio consiste nel fatto che l'ossigeno molecolare allo stato di gas disciolto, a contatto con un elettrodo di platino, si riduce in ioni OH⁻ con una tensione di polarizzazione di 800 mV. Alla corrente di polarizzazione che ne deriva corrisponde la quantità di ossigeno contenuto nella soluzione. Gli ioni esterni alla soluzione non si ossidano, o riducono, poiché l'elettrodo è chiuso ermeticamente in una membrana di Teflon permeabile soltanto ai gas.





La misura può essere alterata dalla presenza di piccole quantità di SO₂, Cl₂ ed H₂S e dalla presenza, in maggiore quantità, di ioni disciolti.


Il sensore di temperatura integrato all'elettrodo permette di misurare anche la temperatura.


Misura:

Accendere lo strumento premendo il tasto ON/OFF. Prima di passare in modalità polarizzazione, il dispositivo esegue un breve autotest (1 secondo) durante il quale si accendono tutte le spie luminose. Sul display compare l'indicazione "POL". L'indicatore analogico segnala la fase di polarizzazione. Terminata la polarizzazione (circa 10 minuti), lo

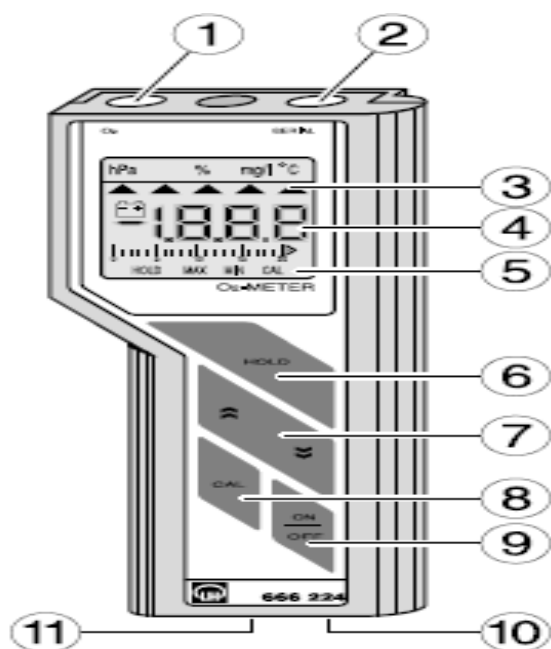
strumento si porta automaticamente nella modalità usata nell'ultima misura. Immergere la cella di misura nella soluzione campione ed agitarla facendola roteare circolarmente.

Premendo il tasto “” o il tasto “” si può saltare la fase di polarizzazione. Usando il tasto “” o il tasto “” è possibile visualizzare anche i valori di hPa, %, mg/l e °C.

Premendo il tasto _ di Hold, si possono memorizzare i risultati della misura; sul display compare il segnalatore corrispondente. Premendo il tasto “”, sul display dello strumento compare il messaggio “MAX” con il valore massimo corrispondente.

Premendo il tasto “”, sul display dello strumento compare il messaggio “MIN” con il valore minimo corrispondente (fatta eccezione per il valore della pressione dell'aria). Premendo ancora il tasto _ di Hold, si prosegue nella misura.

Spegnendo e accendendo il dispositivo, i valori minimi e massimi vengono azzerati, mentre restano memorizzati tutti i settaggi e la calibrazione. Lo strumento si spegne automaticamente dopo 30 minuti dall'ultima misura, tranne il caso in cui è collegato al PC o al display digitale grande o al data logger.



- (1) Collegamento per l'elettrodo ossigeno (667 458);
- (2) Uscita dati seriale per il display digitale grande e per il computer Display ed indicatori;
- (3) Unità di misura delle varie grandezze in hPa, %, mg/l e °C;
- (4) Display con indicatore analogico a barre
Visualizzazione numerica della grandezza misurata
Indicazione carica batteria;
- (5) Indicazione di stato;
- (6) Tasto HOLD per la memorizzazione dei risultati della misura;
- (7) Tasto di selezione del range di misura e di visualizzazione dei valori minimo e massimo;
- (8) Tasto CAL (calibrazione);
- (9) Tasto ON/OFF ;
- (10) Sede della batteria (fornita con lo strumento);
- (11) Istruzioni di funzionamento sul retro del dispositivo.

5. Applicazione nella medicina

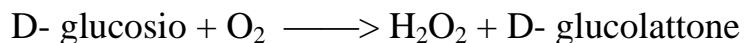
Un biosensore elettrochimico è formato da un trasduttore di segnale elettrico chiamato generalmente elettrodo e da un sistema biologico, che quasi sempre è un enzima immobilizzato sulla sua superficie. Il principio di funzionamento di un sensore così preparato è il seguente: una specie chimica, non elettroattiva, reagisce con l'enzima immobilizzato sulla superficie dell'elettrodo. Il prodotto di questa reazione è un elemento o composto elettroattivo che diffonde sulla superficie elettrodica e genera un segnale elettrico

che viene rilevato da uno strumento e messo in relazione alla concentrazione del metabolita in esame.

Il funzionamento di un biosensore elettrochimico. La grande sensibilità ed affidabilità di questi biosensori deriva dal fatto che l'enzima è nella maggior parte dei casi estremamente specifico per la specie che si vuol misurare, mentre l'elettrodo è selettivo per il prodotto elettroattivo. Questo è indubbiamente un enorme vantaggio poiché consente di applicare i biosensori in matrici cosiddette "sporche" dove altri metodi di analisi richiederebbero procedure lunghe e molto complicate. Gli elettrodi che normalmente si utilizzano per assemblare biosensori elettrochimici sono di due tipi: amperometrici e potenziometrici.

5.1 Determinazione del glucosio

Circa il 5% della popolazione adulta dei paesi industrializzati ha il diabete. La Chimica analitica ha avuto e tuttora gioca un ruolo molto importante nella lotta contro il diabete mellito (Turner e Pickup 1985). Sono stati sviluppati innumerevoli metodi di misura del glucosio ma la specificità della reazione enzimatica e la sensibilità e selettività dei sensori elettrochimici ha reso ormai popolare ed estremamente vantaggioso l'uso delle tecniche elettrochimiche. Il principio di funzionamento è sempre basato sulla reazione catalizzata dalla glucosio ossidasi (GOD) come segue:



Il sensore usato è un sensore ad ossigeno. In altri strumenti viene usato il sensore ad H_2O_2 e recentemente un sensore a carbone "mediato" con ferrocene. Questi strumenti sono stati realizzati principalmente per le analisi cliniche quindi essi analizzano campioni singoli, li diluiscono, ne analizzano la specie in esame ed infine confrontano i valori di corrente con quelli ottenuti misurando soluzioni standard di glucosio.

Tuttavia uno dei più significativi problemi della misura del glucosio nel sangue è stato recentemente affrontato dalle industrie giapponesi. Nello strumento Gluco 20 A il sensore lavora con 20 μl di sangue intero non diluito e si è ottenuta una buona correlazione tra questo metodo e quello dell'esokinasi che utilizza invece il siero. Studi comparativi hanno però mostrato che i valori del glucosio nel sangue sono sempre il 13% più bassi di quelli presenti nel siero. Questa differenza è stata riscontrata anche con lo strumento Auto and Stat GA-1110 e usando il Glukometer GKM 01. Dai risultati ottenuti si è giunti alla conclusione che questa differenza di valori riflette nel caso del sangue intero non diluito, una indicazione incompleta dovuta al glucosio presente negli eritrociti. Usando infatti il sangue diluito 1/10 ed un metodo di misura differenziale basato sull' H_2O_2 , i risultati ottenuti con lo strumento Glukometer GKM 01 sono risultati in buon accordo con quelli ottenuti con il metodo di riferimento glucosio ossidasiperossidasi.

Il gruppo tedesco quindi ha suggerito la diluizione del campione al fine di ottenere un'indicazione "reale" della concentrazione del glucosio nel sangue. Tuttavia alcuni

laboratori di ricerca stanno ancora studiando su questo problema in quanto l'enzima catalasi presente nel sangue catalizza la seguente reazione:



5.2 Determinazione dell' acido lattico

L'importanza della determinazione del lattato nel sangue è tenuta sempre più in considerazione dall'ambiente scientifico medico perché è correlata a specifici stati patologici come shock, insufficienza respiratoria, malattie cardiache e principalmente per il suo coinvolgimento nel metabolismo del glucosio. Un settore particolare ove la misura dell'acido lattico riveste grande importanza è la medicina sportiva. Inoltre la misura del lattato nel fluido cerebrospinale è un parametro importante per discriminare tra meningite virale o purulenta e nella determinazione della diminuzione di ossigeno nel cervello. Per determinare il lattato con un biosensore amperometrico sono disponibili ben quattro enzimi, il più efficiente ed utile per applicazioni cliniche è stato l'enzima lattato ossidasi che catalizza la seguente reazione (Matsunaga e al 1982; Mascini e al 1985 b):



Quest'enzima è risultato essere altamente selettivo per il lattato, molto stabile nel tempo ed esente da interferenze come ad esempio gli ioni cloruro che sono invece risultati essere una severa interferenza per un altro enzima lattato ossidasi (Mascini e al 1984). Questo enzima è stato immobilizzato su di un sensore ad ossigeno e dopo aver "collaudato" l'elettrodo con soluzioni standard rientranti nel "range" di misura del lattato nel sangue, si è misurato il lattato in sieri umani e si è correlata la risposta del sensore con quella ottenuta con il metodo spettrofotometrico in uso nei laboratori clinici.

5.3 Determinazione del colesterolo

La determinazione del colesterolo nella bile è utile per la diagnosi dei calcoli biliari e per il calcolo del cosiddetto indice litogenico (Campanella e al 1985), quest'indice è funzione del contenuto totale del colesterolo nella bile ma non dei sali biliari e dei fosfolipidi; inoltre i campioni di bile sono estremamente complessi e fortemente colorati tanto è vero che i metodi colorimetrici danno risultati spesso insoddisfacenti.

Utilizzando un sensore ad ossigeno e gli enzimi colesterolo esterasi e colesterolo ossidasi è stato possibile misurare sia il colesterolo libero che quello totale in campioni di bile sia epatica che colecistica (Mascini e al 1983). L'enzima colesterolo ossidasi è stato immobilizzato su una rete di nylon poi fissata sul sensore e protetta da una membrana da dialisi. Le soluzioni standard di colesterolo sono state preparate con tampone fosfato contenente lo 0.1% di Triton X-100 che assicurava la solubilità del colesterolo. La

procedura di misura era estremamente semplice consistendo nell'aggiungere ad una soluzione tampone prima il campione di bile e poi lo standard. Le variazioni di corrente erano registrate e correlate alla concentrazione di colesterolo totale, al campione di bile in soluzione era prima aggiunto l'enzima colesterolo esterasi e dopo aver atteso un tempo opportuno per l'idrolisi, veniva eseguita la stessa procedura per la misura del colesterolo libero.

