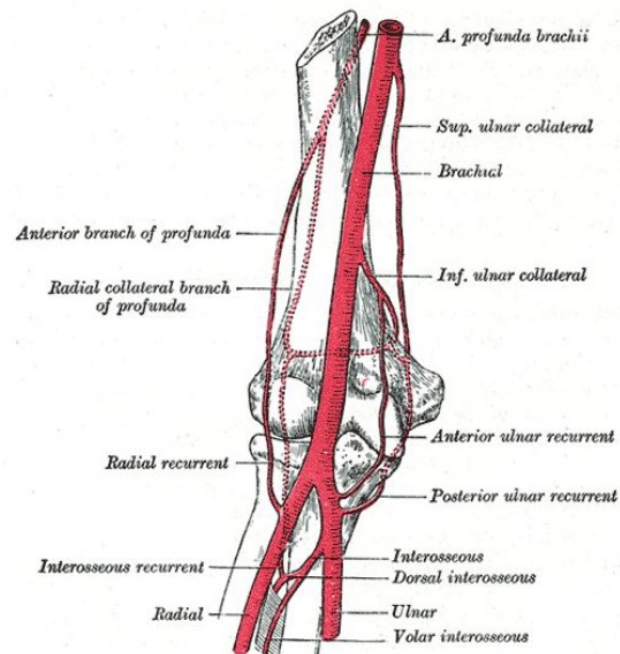


Misure di gas in soluzione

L'**emogasanalisi**, è un esame clinico tramite il quale, grazie al monitoraggio di parametri quali la **pressione parziale di O₂ e di CO₂**, il **pH** e la **concentrazione di carbonato** nel sangue arterioso del paziente (prelevato tipicamente dall'arteria radiale, brachiale o femorale con delle siringhe eparinizzate) è possibile stabilire la **ventilazione**, l'**equilibrio acido-base**, e gli **scompensi metabolici** in modo da valutare l'**eventuale necessità di ossigenoterapia**.



Misure di gas in soluzione

Una miscela di gas (ideali) esercita una **pressione uguale alla somma della pressioni parziali dei vari gas**. La pressione parziale relativa ad uno dei gas che compongono la miscela è la **pressione che il gas eserciterebbe se occupasse, da solo, l'intero volume considerato**.

Misure di gas in soluzione

In particolare, la determinazione della pressione parziale di alcuni gas è un aspetto molto importante in ambito clinico. Conoscere la concentrazione di gas quali O_2 e CO_2 , per esempio, è indispensabile nella **diagnosi di disturbi degli equilibri acido-base**.

Per esempio, un repentino aumento di CO_2 può essere il segnale di una imminente crisi respiratoria. Un metodo per **la rilevazione rapida di CO_2 è dunque essenziale nel monitoraggio di pazienti in terapia intensiva**.

La CO_2 nel sangue in condizioni fisiologiche è nel range 40-45 mmHg, mentre il pH è nel range 7,35-7,45. La maggior parte dell'anidride carbonica in soluzione **viene convertita in acido carbonico dall'anidrasi carbonica** e la maggior parte dell'acido carbonico si **dissocia in ioni idrogeno e ioni bicarbonato**.

Misure di gas in soluzione

Equilibrio acido base

L'equilibrio acido base si riferisce al bilanciamento tra l'**input (produzione)** e **output (eliminazione)** di ioni idrogeno. Il corpo si può considerare un **sistema all'equilibrio con l'ambiente esterno (scambio di gas a livello alveolare)** dove **la pressione parziale di CO₂ è identica alla tensione di CO₂ nel sangue.**

La P(CO₂) è infatti **direttamente proporzionale al rate di produzione di CO₂** (in situazione di ventilazione alveolare normale con aria "naturale") e **inversamente proporzionale alla ventilazione alveolare** (in situazione di produzione di CO₂ costante e aria "naturale").

La **CO₂ è prodotta costantemente dal metabolismo ossidativo** con un rate di circa 100 mmol/min (224 mL/min) e viene eliminata a livello polmonare con lo stesso rate. In questo modo la P(CO₂) nel sangue arterioso rimane tra i 35 e i 45 mmHg.

Misure di gas in soluzione

Ipercapnia

L'ipercapnia si ha nell'**insufficienza respiratoria avanzata**, quando cioè non è assicurato un sufficiente ricambio dei gas nel sangue (ingresso di O_2 ed eliminazione di CO_2). I primi stadi dell'insufficienza respiratoria sono caratterizzati da **diminuzione della pressione parziale di O_2** (insufficienza respiratoria **ipossiémica**). Negli stadi più avanzati, oltre alla diminuzione ulteriore di O_2 , si ha un **innalzamento dei valori di pressione parziale di CO_2** nel sangue (insufficienza respiratoria **iperapnica**).

Oltre agli squilibri metabolici un aumento della CO_2 nel sangue può essere sintomo di:

- Patologie respiratorie
- Disordini ormonali
- Patologie renali
- ...

Misure di gas in soluzione

Equilibrio acido base

Scompenso acido-base respiratorio: Quando la respirazione non è adeguata, si assiste ad un accumulo di CO_2 . Le molecole "extra" di CO_2 si combinano con l'acqua formando acido carbonico (anche chiamato acido respiratorio in gergo) il quale contribuirà ad aumentare il pH. Un possibile trattamento (se lo sbilanciamento è prolungato nel tempo) consiste nell'abbassamento della $P(\text{CO}_2)$ **insufflando il paziente con aria ad alto contenuto di ossigeno.**

Dunque una **misura di $[\text{CO}_2]$** dà una misura di questo tipo di scompenso.



Variazione di $[\text{CO}_2]$

Misure di gas in soluzione

Equilibrio acido base

Scompenso acido-base metabolico: quando l'attività metabolica è compromessa, si assiste ad una acidificazione del sangue. Un possibile esempio è la **formazione di acido lattico locale quando un non adeguato flusso sanguigno rallenta il metabolismo aerobico**. Questa **acidificazione**, non essendo dovuta a problemi respiratori, è chiamata **metabolica**. Se questa condizione persiste nel tempo può avvenire una condizione di shock (l'eccesso di prodotti acidi deve essere dunque prontamente neutralizzato).

Un modo per valutare questo scompenso deriva dalla **misura della concentrazione dello ione bicarbonato**.

Variazione di HCO_3^-

Nome corretto IUPAC:
monoidrogenotriosocarbonato

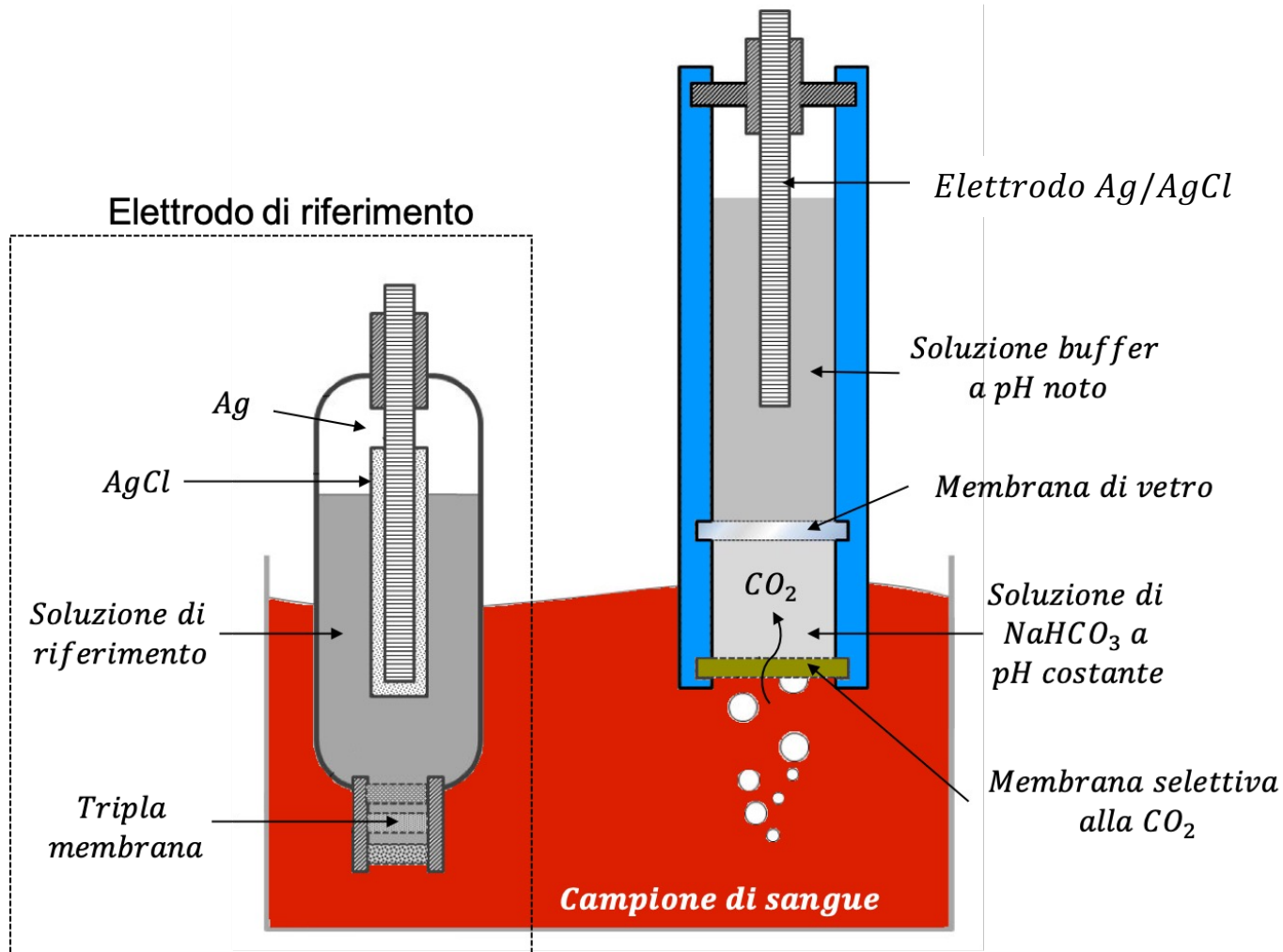
Misure di gas in soluzione – Elettrodo di Severinghaus

Un metodo utilizzato per la rilevazione della CO_2 è basato su un particolare elettrodo introdotto da Severinghaus e Bradley nel 1958.

Il principio di funzionamento di questo elettrodo è molto semplice: come accennato in precedenza, **la CO_2 presente nel liquido biologico (sangue per esempio) reagisce con l'acqua formando acido carbonico**, il quale si dissocia rilasciando ioni H^+ . È dunque sufficiente a questo punto **misurare il pH della soluzione e derivare la CO_2** .

Questo elettrodo, chiamato comunemente **elettrodo di Severinghaus**, è costituito da un **elettrodo a vetro combinato per la misura del pH**, immerso in una soluzione di bicarbonato. Il tutto è contenuto in una **camicia cilindrica chiusa sul fondo dalla membrana permeabile al solo gas da misurare (CO_2)**.

Misure di gas in soluzione – Elettrodo di Severinghaus



La CO₂ dissolta nel campione (per esempio un campione ematico) **diffonde attraverso la membrana selettiva** nel primo compartimento dell'elettrodo, all'interno della quale è presente una soluzione di NaHCO₃ (bicarbonato di sodio – nome corretto: carbonato monosodico) a pH noto.

All'interno di questo primo comparto si trova la membrana di vetro, il quale misurerà una variazione del pH all'interno della camera.

Le prime membrane selettive erano costituite da sottili **membrane di Teflon**, successivamente sostituite da altre membrane polimeriche via via più selettive.

Misure di gas in soluzione – Elettrodo di Severinghaus

Funzionamento

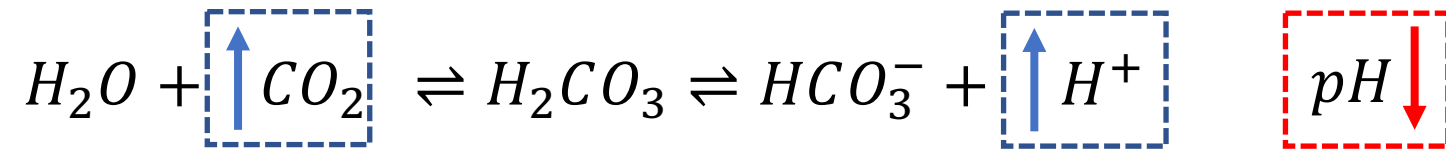
La pressione di CO_2 del campione si equilibra sulla membrana e l'elettrodo a vetro misura la variazione di pH risultante della soluzione contenente bicarbonato di sodio. La dissociazione avviene in **tre step** distinti:

- Idratazione CO_2 : $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$
- Dissociazione acido carbonico: $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$
- Variazione del pH della soluzione di NaHCO_3

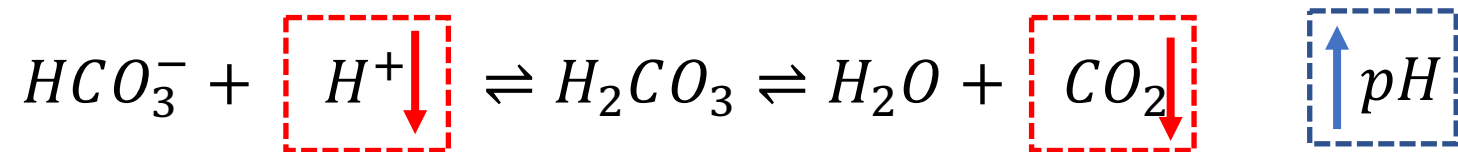
Misure di gas in soluzione – Elettrodo di Severinghaus

Esiste dunque una **relazione inversa tra pH e concentrazione di CO₂ disciolta**.

Quando i livelli di anidride carbonica aumentano (rispetto a un valore di riferimento), si forma più acido carbonico e vengono rilasciati ulteriori ioni idrogeno e bicarbonato e il pH diminuisce.



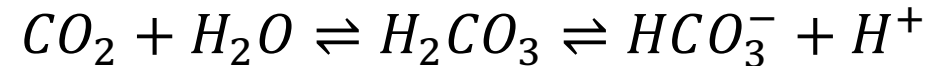
Quando la P(CO₂) diminuisce, diminuisce l'acido carbonico e di conseguenza il pH aumenta.



La **pressione parziale di CO₂** sarà quindi proporzionale al valore di pH.

Misura della concentrazione di HCO_3^-

Calcolo della concentrazione di acido carbonico:



Una descrizione dell'equilibrio acido-base è basata sull'equazione di Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log \frac{a_{HCO_3^-}}{a_{H_2CO_3}}$$

relazione tra il pH e la concentrazione di un acido

L'attività della H_2CO_3 può essere anche indicata in termini di **pressione parziale di CO_2 e solubilità della CO_2 nel plasma**, $a_{H_2CO_3} = S \cdot P(CO_2)$ (**equazione di Henry**). L'equazione precedente diventa dunque:

$$pH = pK_a + \log \frac{a_{HCO_3^-}}{S \cdot P(CO_2)}$$

Misura della concentrazione di HCO_3^-

Il valore di pK_a è 6.125 mentre la solubilità della CO_2 nel plasma a 37 °C è 0.23 mol/L/kPa (= 0.03 mol/L/mmHg):

$$[HCO_3^-] = 0.03 \cdot P(CO_2) \cdot 10^{(pH-6.125)}$$

La semplice **misura della concentrazione di bicarbonato nel plasma non è sufficiente da sola per valutare lo scompenso acido-base indotto dal metabolismo** (in quanto la $[HCO_3^-]$ varia sia a causa di scompensi respiratori che metabolici).

Il calcolo dell'effettivo scompenso metabolico acido base è indicato con l'abbreviazione B. E. (Base Excess) ed è calcolato con **l'equazione di Van Slyke**, la quale tiene conto di tutta una serie di fattori aggiuntivi (tra cui la concentrazione di emoglobina).

Misura della concentrazione di HCO_3^-

L'equazione di Van Slyke è stata **sviluppata da Siggaard-Anderson**, e nella sua formulazione generale (poi modificata e resa più accurata) prende la seguente forma (B. E. : Base Excess):

$$B.E. = \{[HCO_3^-] - 24.4 + (2.3 \cdot [Hb] + 7.7) \cdot (pH - 7.4)\} \cdot (1 - 0.23 \cdot [Hb])$$

- **pH del plasma a 37 °C**
- **concentrazione di bicarbonato nel plasma $[HCO_3^-]$**
- **concentrazione di emoglobina $[Hb]$ in mmol/L**

Dunque sostituendo l'equazione della concentrazione di bicarbonato otteniamo:

$$B.E. = \{0.03 \cdot P(CO_2) \cdot 10^{(pH-6.125)} - 24.4 + (2.3 \cdot [Hb] + 7.7) \cdot (pH - 7.4)\} \cdot (1 - 0.23 \cdot [Hb])$$

La derivazione dell'equazione va oltre il fine di questo corso. Da ricordare, più che l'equazione, il concetto:

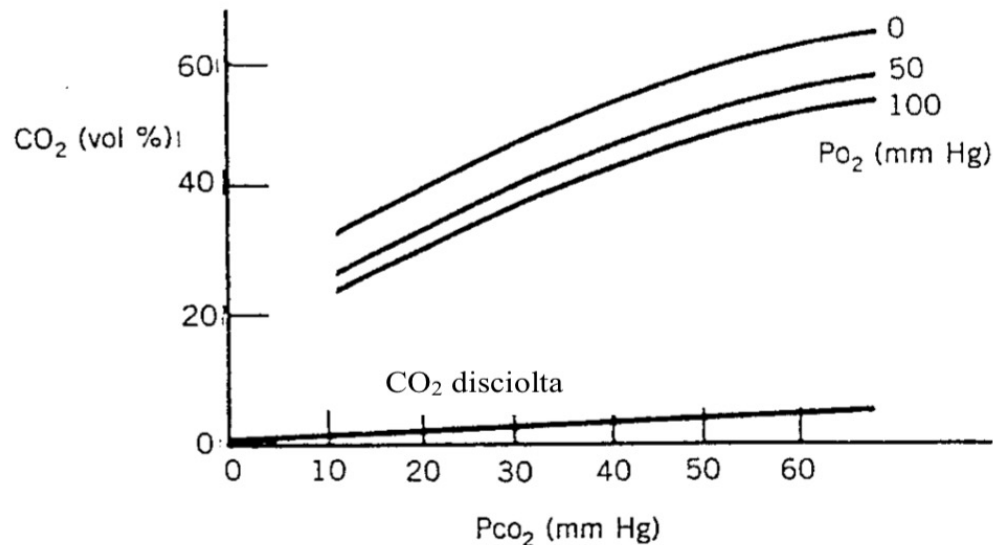
misurando il pH e la concentrazione di emoglobina, conoscendo la pressione parziale della CO_2 a livello alveolare e ricavando la concentrazione di bicarbonato è possibile valutare scompensi dell'equilibrio acido-base.

Misura di gas nel sangue – metodi ottici

Perché non basta la misura dell'eccesso di CO_2 per valutare gli scompensi acido-base?

L'anidride carbonica si può trovare nel plasma **disciolta oppure in combinazione con l'emoglobina** o altre proteine plasmatiche. Come abbiamo visto, quella disciolta reagisce con l'acqua formando acido carbonico, il quale si dissocia in ioni H^+ e ioni bicarbonato. La CO_2 in questo stato (che fa dunque parte del sistema buffer dell'acido carbonico) rappresenta circa l'85% del totale presente nel sangue in un individuo sano a riposo.

Del restante, il 10% si trova legato all'emoglobina e il 5% è presente non dissociato (la sua solubilità nel sangue è maggiore di quella dell'ossigeno). **La quantità totale di anidride carbonica** dipende dalla $P(\text{CO}_2)$ (ovviamente) ma anche **dalla $P(\text{O}_2)$** .



$P(\text{CO}_2)$ nel sangue arterioso = 40 mmHg

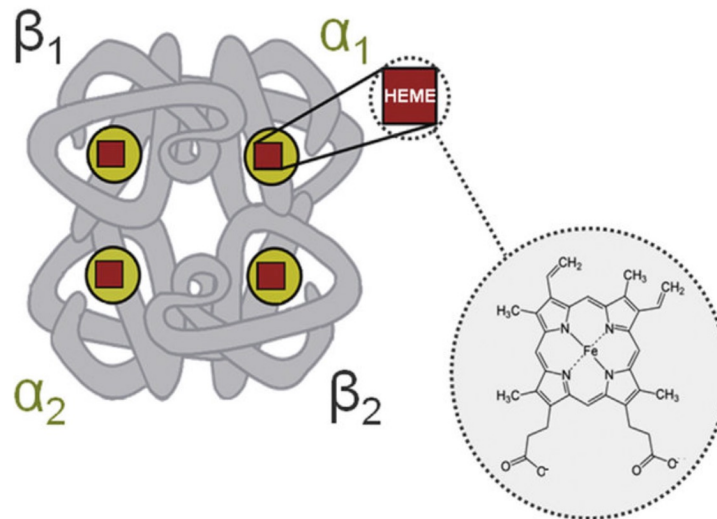
$P(\text{CO}_2)$ nel sangue venoso = 45 mmHg

Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

Struttura dell'emoglobina

L'emoglobina (indicata con Hb) è una proteina oligomerica composta da due paia di sub-unità differenti tra loro chiamate α e β .

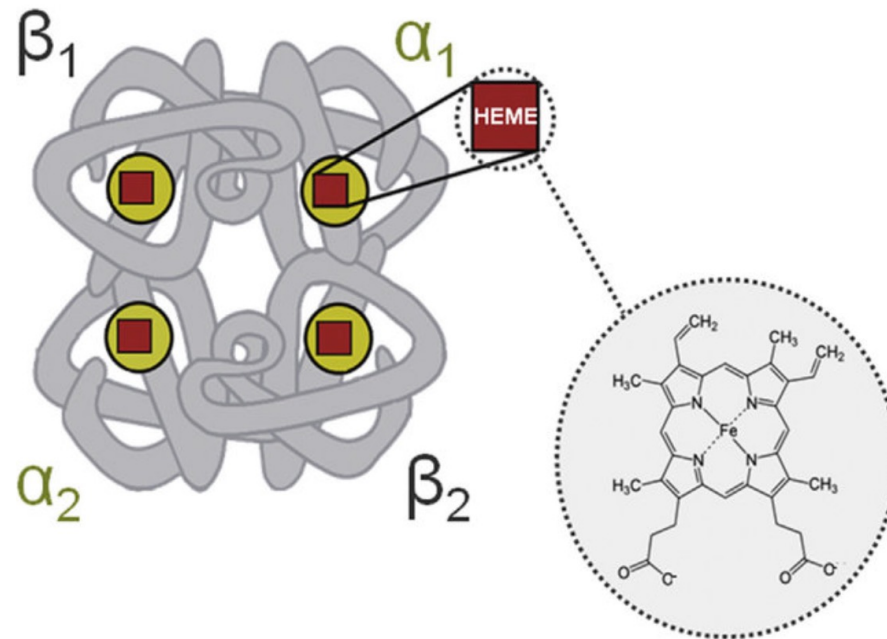
Ciascuna di queste sub-unità è costituita da una catena polipeptidica contenente un gruppo HEME (una metallo-porfirina). Al centro di ogni gruppo HEME è presente uno ione Fe^{2+} al quale **si può legare una molecola di ossigeno**. Quando tutti e 4 i gruppi HEME sono legati ad una molecola di ossigeno siamo di fronte alla **ossiemoglobina** (O_2Hb), in caso contrario avremo la **deossiemoglobina**.



Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

Struttura dell'emoglobina

La capacità dell'emoglobina di legarsi all'ossigeno a livello polmonare e rilasciarlo nei tessuti è dovuta a **modifiche conformazionali nella sua struttura quaternaria**, le quali sono associate a **variazioni dell'affinità del gruppo HEME (EME in italiano) con l'ossigeno** (lo vedremo più avanti in dettaglio).



Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

Struttura dell'emoglobina

Ossiemoglobina: emoglobina legata all'ossigeno

Deossiemoglobina: emoglobina non legata all'ossigeno

Metaemoglobina (MetHb o Hi): è una molecola caratterizzata da un diverso stato di ossidazione del ferro nell'HEME (Fe^{3+} invece di Fe^{2+}). **Non ha la capacità di legare l'ossigeno.**

Solfoemoglobina (SHb): è una molecola di emoglobina al quale si è legato irreversibilmente un atomo di zolfo. **Non è capace di trasportare l'ossigeno.**

Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

Struttura dell'emoglobina

Carbossiemoglobina (COHb): l'emoglobina presenta una altissima affinità per la CO (monossido di carbonio). Quando è legata alla CO, l'emoglobina prende il nome di carbossiemoglobina e **non è più capace di trasportare ossigeno**. Anche se in piccolissime quantità, la presenza di carbossiemoglobina può essere sintomo di grave intossicazione.

Carbaminoemoglobina: emoglobina legata alla CO₂.

Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

Concentrazione nel sangue di emoglobina (ctHb g/L)

Uomo adulto	13.5– 17.5
Donna adulta	11.5– 15.5
Bambini (da 1 anno alla pubertà)	11 – 13.5
Infante (da 3 mesi a 1 anno)	9.5 – 12.5
Neonato	15 – 21

Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

La tecnica più utilizzata per la rilevazione della concentrazione di emoglobina nel sangue è **la spettroscopia ad assorbimento**.

Questa tecnica è basata sulla **legge di Lambert-Beer**, la quale mette in relazione le **proprietà fisiche della luce** che attraversa un materiale (trasmessa) con le **proprietà della sostanza attraverso la quale la luce è stata trasmessa**. Più precisamente:

L'assorbanza misurata per un dato composto/elemento è direttamente proporzionale alla concentrazione del composto stesso e alla lunghezza del percorso ottico attraverso la sostanza.

Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

L'assorbimento A (anche assorbanza o densità ottica) è definito quantitativamente in termini di **intensità del raggio incidente I^i** e **intensità del raggio trasmesso I^T** nel modo seguente (**legge di Lambert-Beer**):

$$A = -\log \left(\frac{I^T}{I^i} \right) = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

A : assorbanza (adimensionale)

d : cammino ottico (in cm)

ε : coefficiente di estinzione o coefficiente di assorbimento molare (in cm^2/mol)

c : concentrazione molare

la capacità di un materiale di assorbire la radiazione elettromagnetica viene misurato dal suo **spettro di assorbimento** il quale consiste in un grafico che riporta **l'assorbimento del campione in funzione della lunghezza d'onda della luce che lo attraversa**.

Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

Per una soluzione contenente più soluti l'equazione di Lambert-beer (per una specifica lunghezza d'onda) diventa:

$$A_{\lambda} = d \cdot \sum_{i=1}^N \varepsilon_i^{\lambda} \cdot c_i$$

I coefficienti di assorbimento molare sono peculiari della specifica specie assorbente. Dipendono **dalla lunghezza d'onda** e sono **determinati per via empirica**.

Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

Configurazione generale di uno spettrofotometro ad assorbimento

- **Sorgente luminosa** a **filamento di tungsteno** per il **visibile** o a vapori di deuterio per la spettrofotometria UV-VIS (comunque, policromatiche).

Il tungsteno ha un altissimo punto di fusione (circa 3400 °C). Il calore ottenuto non arriva a fonderlo o farlo sublimare rapidamente, ma rimane sotto forma di energia cinetica delle vibrazioni degli atomi del metallo. Le vibrazioni avvengono in tanti modi possibili a seconda della struttura del solido, emettendo onde elettromagnetiche; lo spettro di frequenza della radiazione emessa è continuo e comprende tutte le λ **dal lontano infrarosso fino al visibile**.

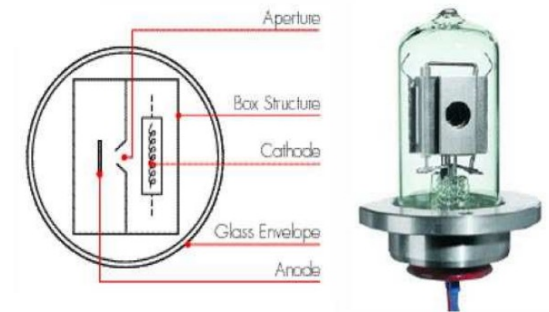


Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

Configurazione generale di uno spettrofotometro ad assorbimento

- **Sorgente luminosa** a filamento di tungsteno per il visibile o a **vapori di deuterio** per la spettrofotometria **UV-VIS** (comunque, policromatiche).

La lampada a deuterio è un tipo di lampada a tubo di scarica (dunque con un filamento emettitore di elettroni e degli elettrodi di accelerazione). La struttura è ottimizzata per favorire la collimazione del fascio. Forniscono uno spettro luminoso **quasi continuo** nella gamma di λ che spazia dagli **UV (185-400 nm)** alla **gamma spettrale visibile (400-800 nm)**.



Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

Configurazione generale di uno spettrofotometro ad assorbimento

- Sistema di fenditure, filtri e lenti per **focalizzare, filtrare e indirizzare il fascio di luce** in modo opportuno.
- **Monocromatore**: dispositivo che, attraversato da un fascio di radiazione policromatica, lascia uscire solo la componente di una lunghezza d'onda selezionabile.
- Serie di specchi e/o fibre ottiche per indirizzare il raggio.
- **Rilevatore (o rivelatore)**: dispositivo capace di trasformare l'intensità luminosa in un segnale elettrico ad essa proporzionale.

Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

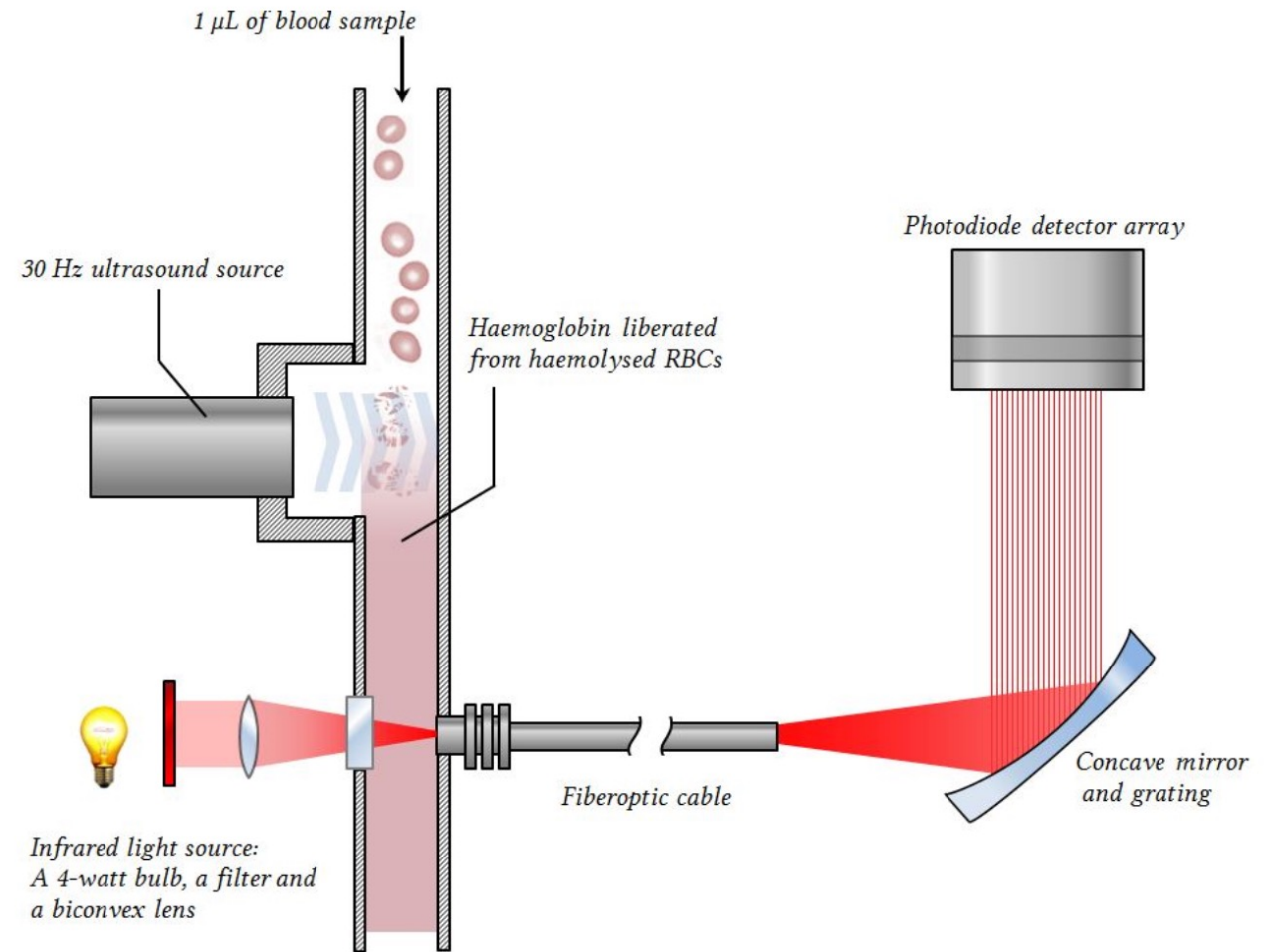
Nel caso specifico di misure di emoglobina, è necessario un **sistema per “liberare” la proteina dalle cellule** in cui è contenuta (i globuli rossi).

Uno dei metodi utilizzati per estrarre l'emoglobina dai globuli rossi è la **rottura delle loro membrane cellulari tramite ultrasuoni**. La purea risultante viene fatta fluire in un capillare (trasparente alla radiazione luminosa incidente) posto davanti alla sorgente.

Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

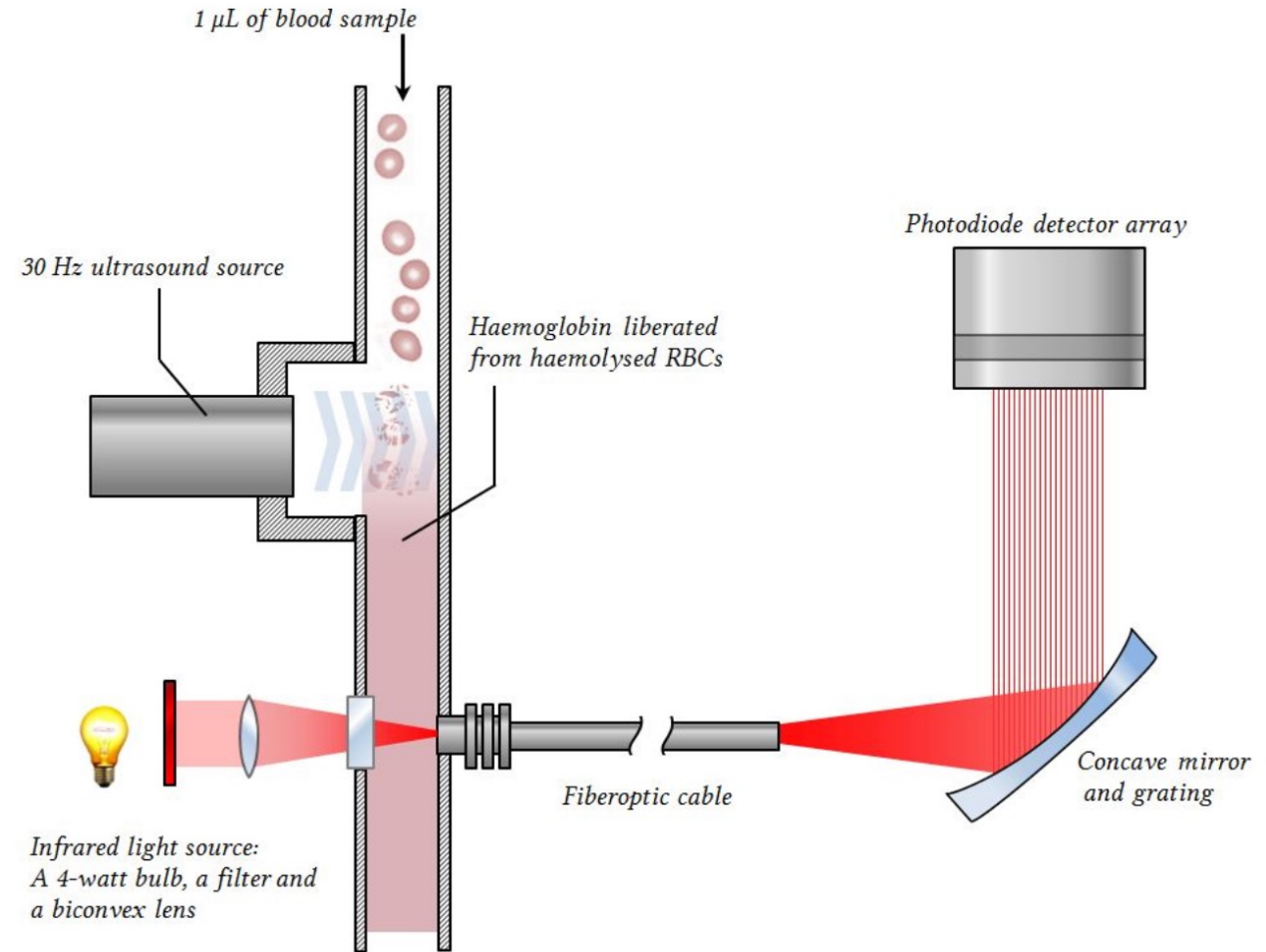
Esempio di sistema commerciale: la luce trasmessa (sorgente nell'infrarosso) è separata tramite uno specchio concavo particolare in 128 raggi collimati i quali sono indirizzati alla matrice dei rilevatori.

I rilevatori sono tipicamente dei **fotodiodi**, e ognuno di essi è responsabile della **lettura di una specifica lunghezza d'onda** e riporta in uscita l'intensità della luce che attraversa il campione.



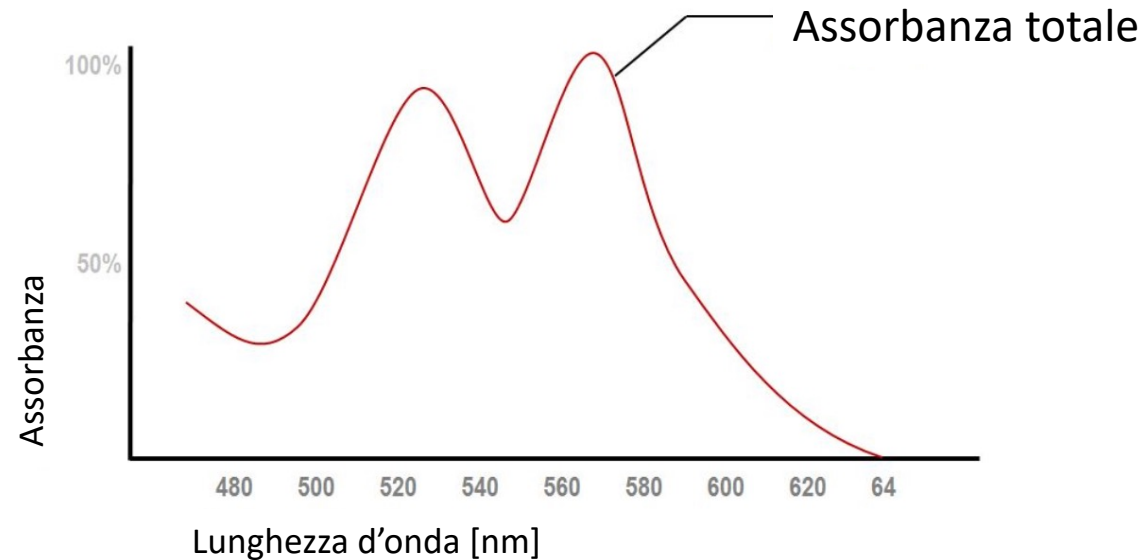
Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

Maggiore l'intensità rilevata, minore è l'assorbanza (in altre parole, la componente della sorgente relativa a quella determinata lunghezza d'onda è stata assorbita meno dal campione).



Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

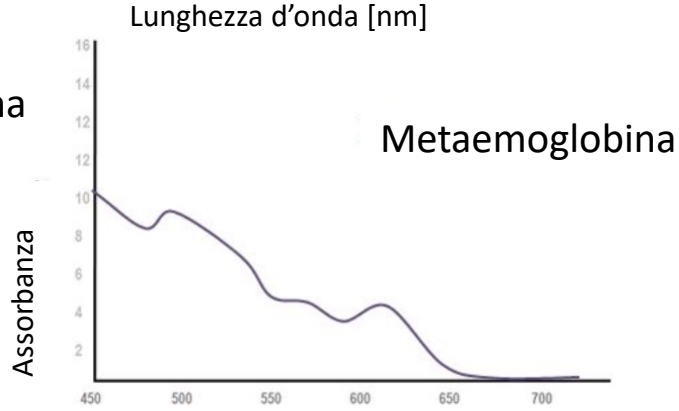
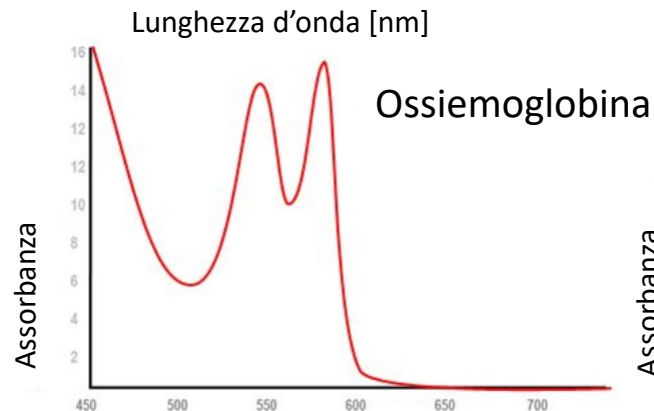
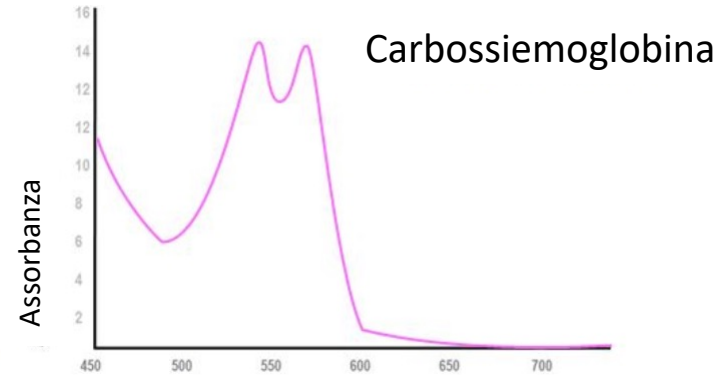
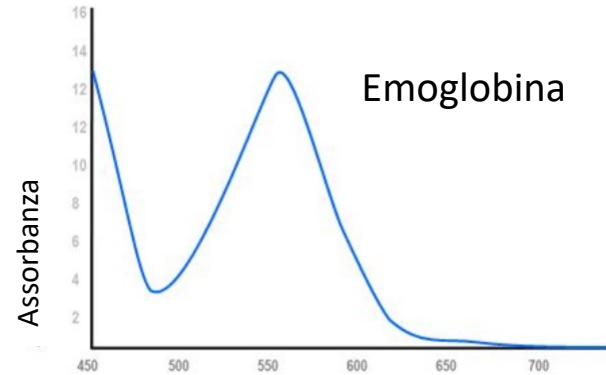
In questo specifico sistema, per ogni campione di sangue vengono effettuate 128 misure di assorbanza (per 128 lunghezze d'onda differenti). **Graficando l'assorbanza in funzione della lunghezza d'onda** si ottiene uno spettro del genere:



che indica **l'assorbanza totale dovuta a tutte le diverse specie di emoglobina presenti nel campione**. Conoscendo i coefficienti di assorbimento di queste specie per ogni data lunghezza d'onda è tuttavia **possibile ottenere la concentrazione di ogni singola tipologia di emoglobina separatamente**.

Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

Graficando l'assorbanza relativa ad ogni specie di emoglobina in fase di studio per ogni specifica lunghezza d'onda si ottengono grafici di questo tipo. **Il contributo di ogni specie per ogni lunghezza d'onda sarà proporzionale alla concentrazione della specie nel campione.**

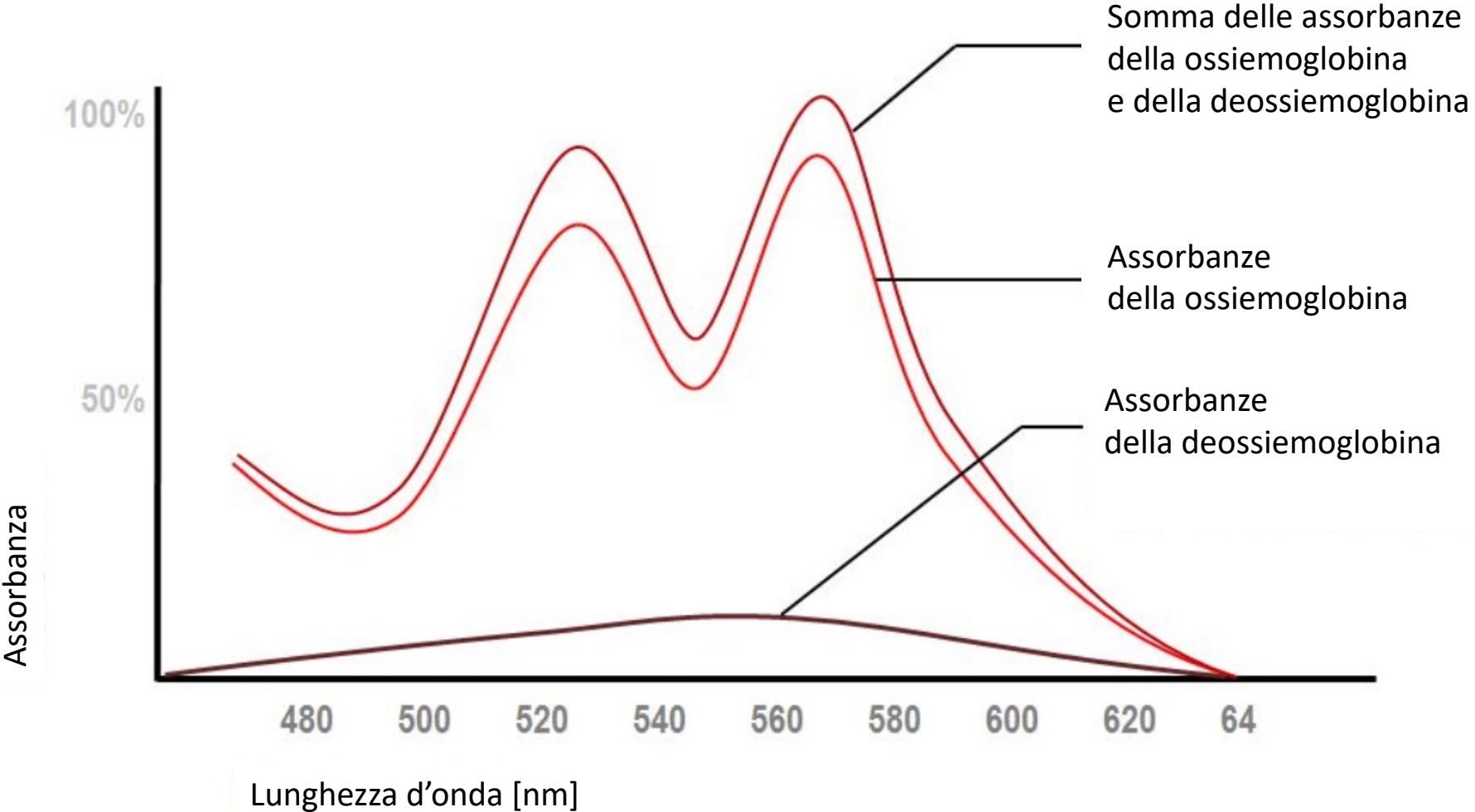


Lunghezza d'onda [nm]

Lunghezza d'onda [nm]

Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

Esempio: emoglobina **totale**, **ossi**emoglobina e **deossi**emoglobina nel sangue arterioso:



Concentrazione di emoglobina: misure di assorbimento

È possibile risalire alla concentrazione di ogni singola specie presente nel campione partendo dall'assorbanza totale (misurata per ogni lunghezza d'onda).

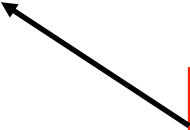
$$c_i = \sum_{n=1}^{128} K_i^{\lambda_n} \cdot A_{totale}^{\lambda_n}$$

c_i : concentrazione della specie i

$A_{totale}^{\lambda_n}$: assorbanza totale del campione alla lunghezza d'onda λ_n

$K_i^{\lambda_n}$: parametro costante, specifico per la specie i -esima alla frequenza d'onda λ_n .

Determinato empiricamente



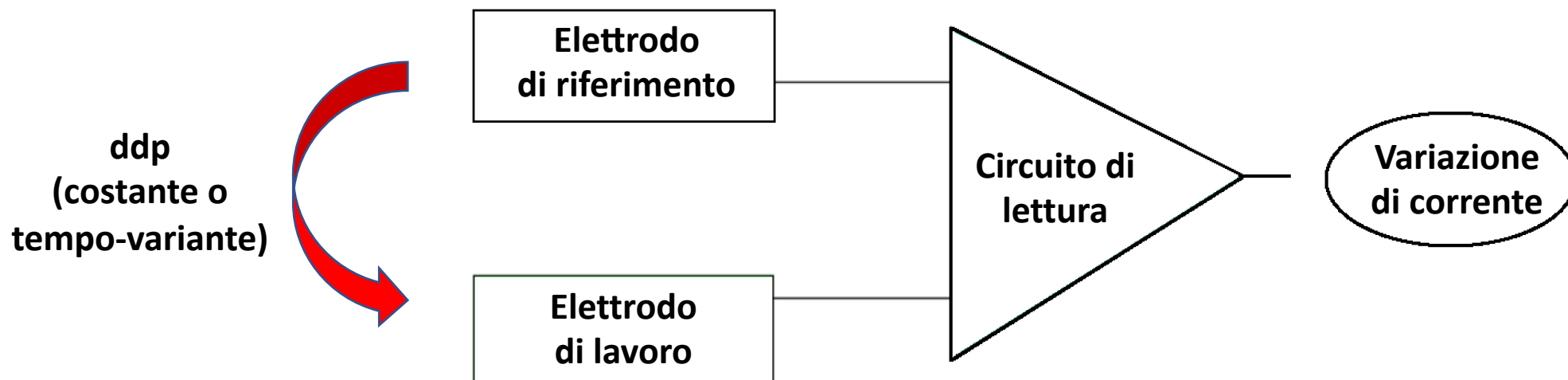
Sensori chimici

Approccio amperometrico

Sensori amperometrici

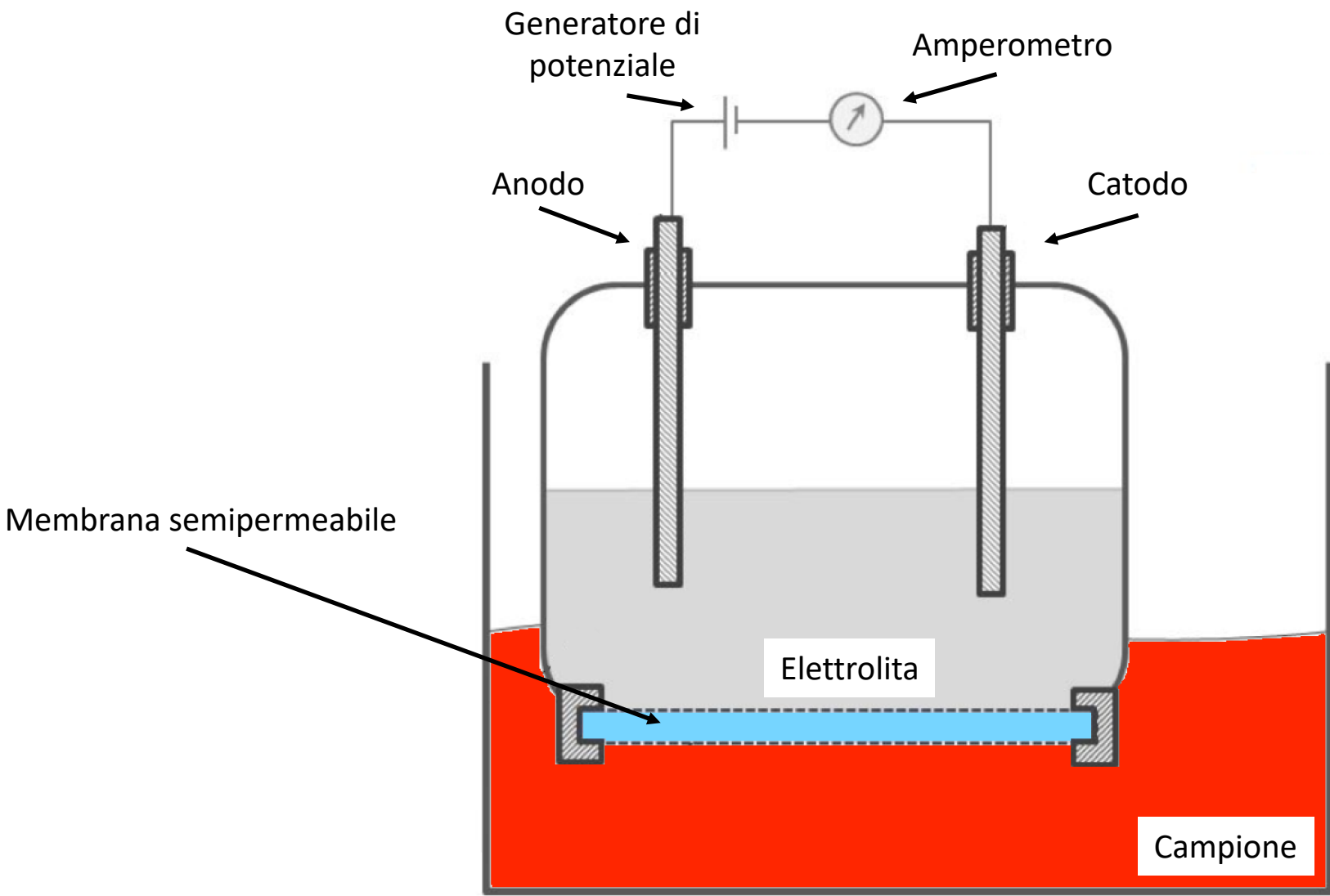
In chimica, l'amperometria è una tecnica per la rilevazione voltammetrica di specie in soluzione basata sul **monitoraggio della corrente** che scorre in una cella elettrochimica in seguito **all'applicazione di una differenza di potenziale tra un elettrodo di lavoro e un elettrodo di riferimento** (a differenza, per esempio, degli elettrodi ionoselettivi, i quali come abbiamo visto misurano il potenziale che si instaura all'equilibrio attraverso una membrana a causa della differente attività dello ione di interesse nelle soluzioni interna ed esterna).

Questa **corrente dipenderà dalla specifica reazione di ossidoriduzione all'elettrodo di misura** che a sua volta sarà proporzionale alla concentrazione delle specie coinvolte nella reazione stessa.



Sensori amperometrici

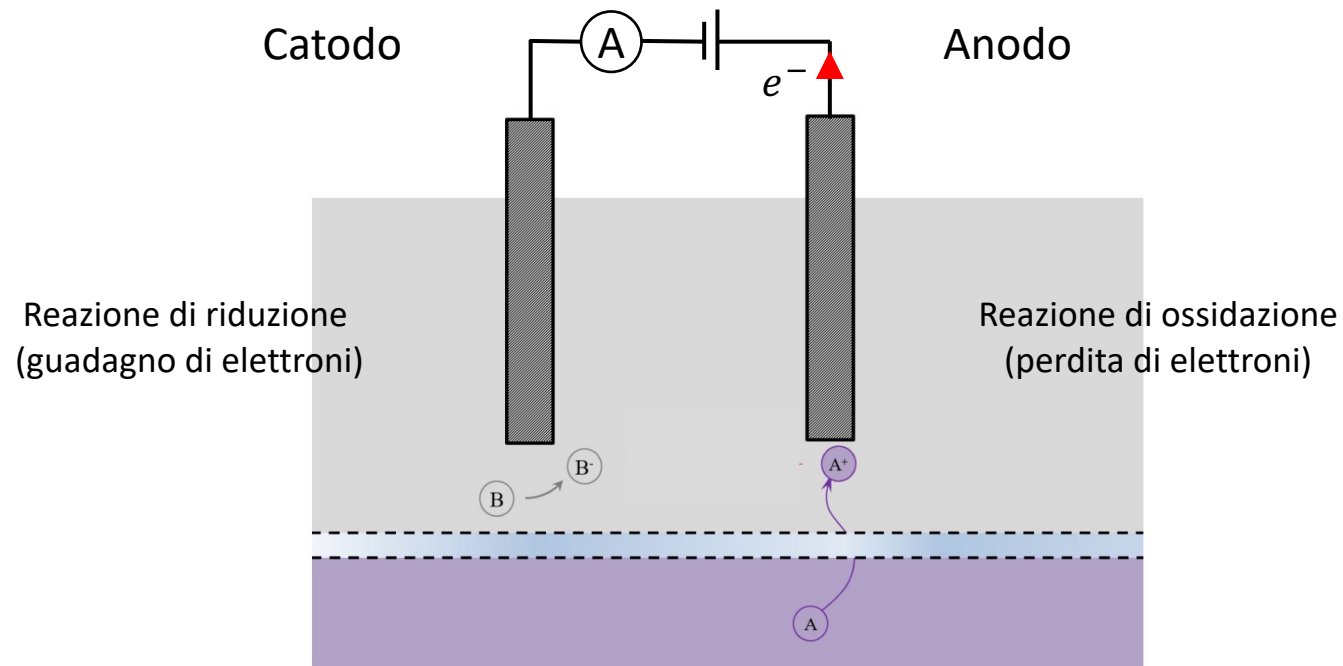
Esempio: struttura di una generica cella a due elettrodi per misure amperometriche di specie in soluzione.



Sensori amperometrici

Il soluto d'interesse attraversa la membrana semipermeabile, la quale deve essere la più selettiva possibile in quanto **la presenza di specie aggiuntive può alterare la corrente misurata in virtù di reazioni redox indesiderate.**

Esempio: l'analita di interesse (A) **diffonde nella soluzione nota fino ad arrivare all'anodo, dove avviene la reazione di ossidazione** (perdita di elettroni). **Gli elettroni introdotti nel circuito verranno così utilizzati al catodo** dove verranno utilizzati per la **reazione di riduzione di un secondo elemento (B).**



Sensori amperometrici

Questo passaggio di elettroni nel circuito dovuto alle reazioni di ossidazione e riduzione rispettivamente all'anodo e al catodo genera una corrente che può essere misurata utilizzando un amperometro.

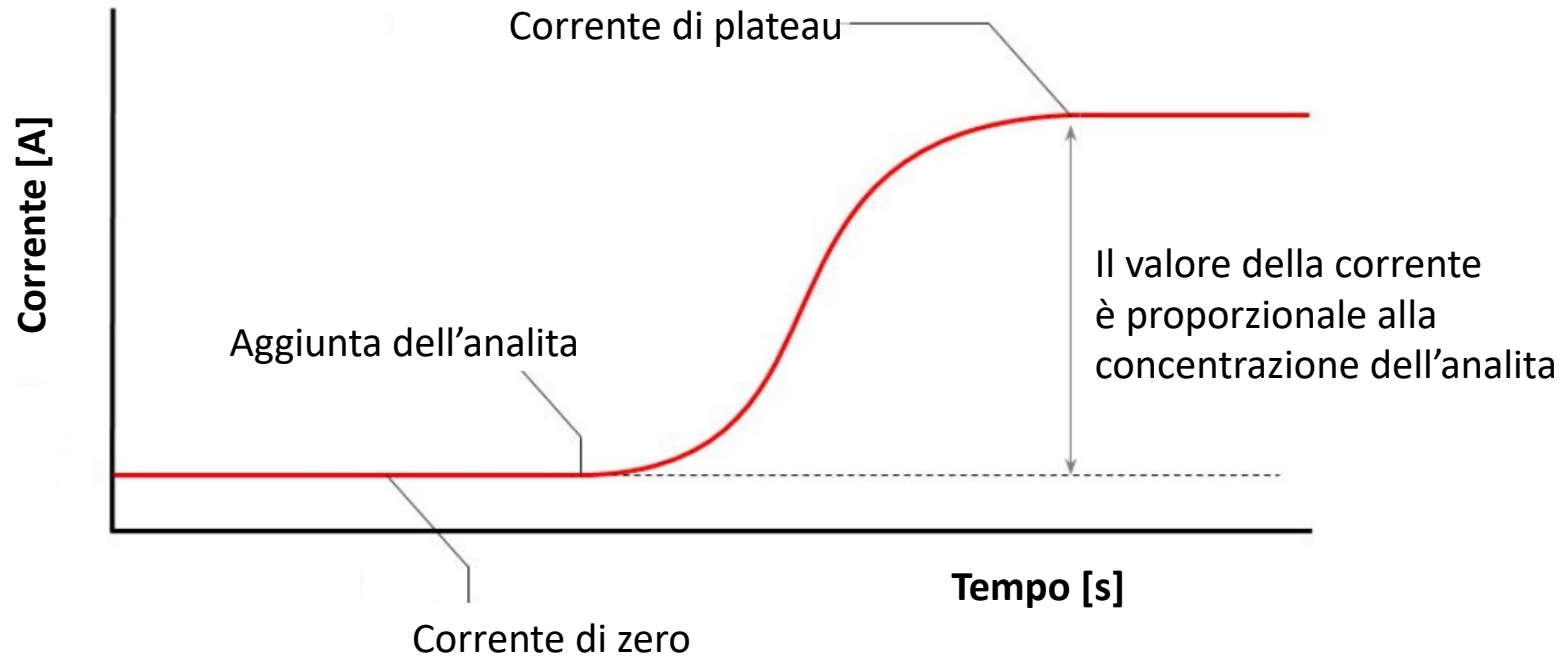
Questa **corrente è dunque direttamente proporzionale alla quantità di elettroni scambiati nella reazione**, e tale quantità è, nel caso dell'esempio precedente, **dipendente dalla concentrazione della specie A**.

In questo modo è possibile calcolare la concentrazione della specie A nel campione, sotto **l'ipotesi di equilibrio della specie stessa con la soluzione interna e supponendo che il 100% di A che arriva all'elettrodo venga utilizzato nella reazione**.

La corrente presente nel circuito in assenza dell'analita è indicata come **corrente di zero** e il suo valore è stabilito in fase di taratura del sistema.

Sensori amperometrici

Questi fenomeni avvengono in funzione di una ddp applicata dall'esterno. **A ddp costante** (e nel caso in cui l'analita sia presente ad una concentrazione costante), la corrente generata nel processo **aumenterà fino ad un plateau**, il quale rappresenta uno **stato di equilibrio del sistema** (in altre parole, il rate di ossidazione e quello di riduzione sono in equilibrio con la quantità di materiale fornita). La **corrente di saturazione sarà proporzionale alla concentrazione dell'analita**.



Sensori amperometrici

È possibile ricavare una la concentrazione c_i dell'analita utilizzando i parametri di taratura del sensore, in particolare la **sensibilità** della cella **S** e la **corrente di zero** I_0 definita in precedenza:

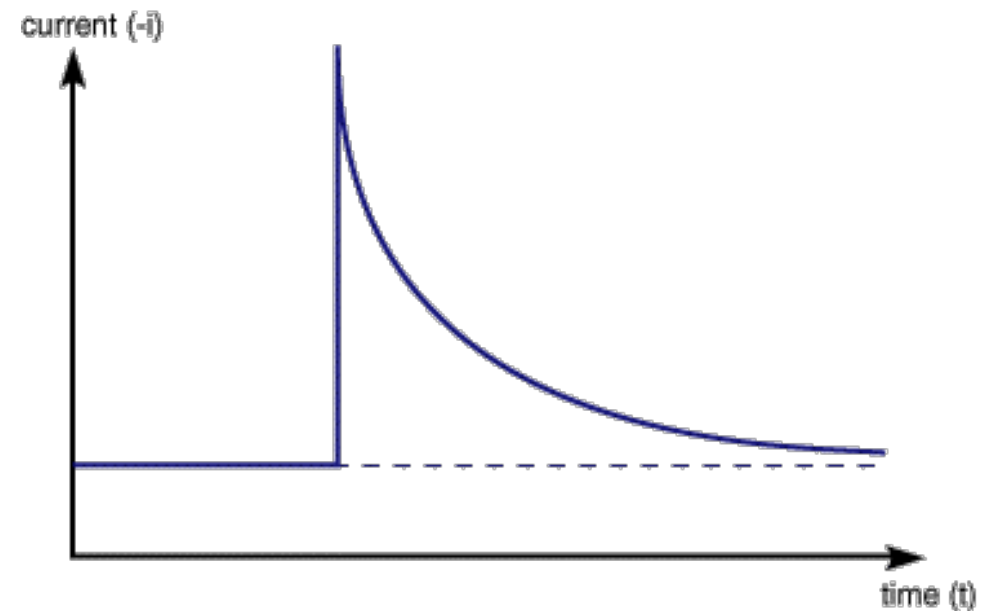
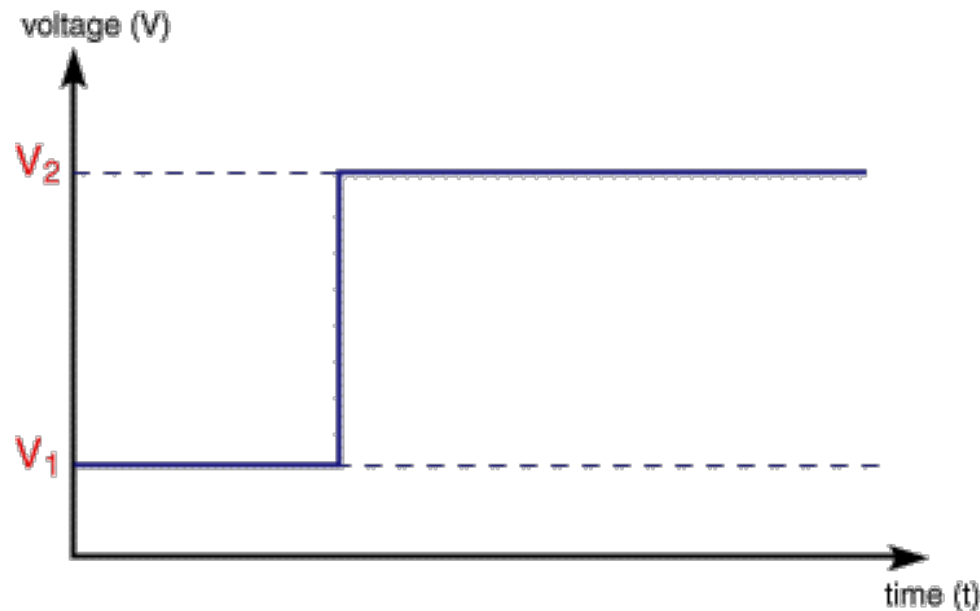
$$c_{i, sconosciuta} = \frac{I_{analita} - I_0}{S}$$

La **sensibilità** si ricava dalla **curva di taratura** come già visto parlando delle proprietà dei sensori:

$$S = \frac{\Delta I_{analita}}{\Delta c_{i, nota}}$$

Sensori amperometrici

Quanto appena esposto vale quando l'analita viene presentato **continuamente con un certo rate**. Se è invece presente in **quantità limitata**, in seguito all'applicazione di un gradino di tensione (di entità sufficiente da promuovere la reazione redox) si assisterà ad un picco della corrente, la quale tornerà a zero una volta esaurita la specie d'interesse.



Sensori amperometrici

Questo fenomeno è descritto dall'equazione di **Cottrell**, la quale descrive la **variazione di corrente elettrica nel tempo durante un esperimento a potenziale controllato** (la cronoamperometria ne è un esempio).

Per una coppia redox standard la corrente misurata dipende dalla diffusione dell'analita verso il sito di misura (il fenomeno è dunque chiamato “**diffusion controlled**”). Per un elettrodo planare la relazione tra corrente elettrica **i** e tempo **t** è:

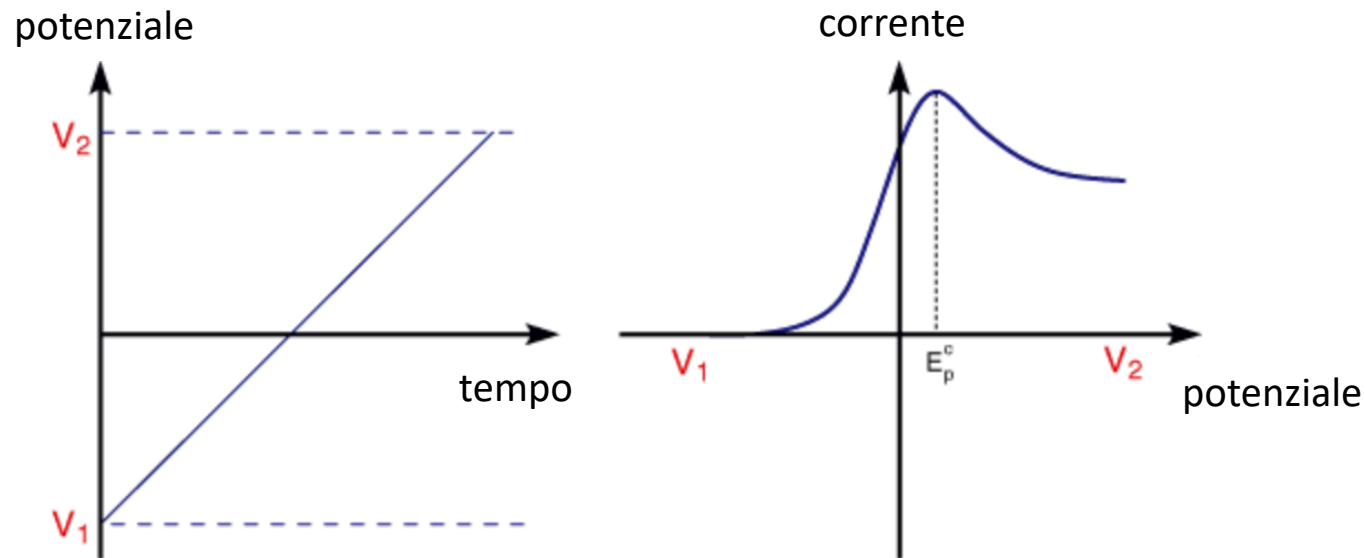
$$i = \frac{nFAc_j^0 \sqrt{D_j}}{\sqrt{\pi t}}$$

Dove

- n : numero di elettroni implicati nella reazione redox
- F : costante di Faraday
- A : area dell'elettrodo piano
- c_j^0 : concentrazione iniziale di analita
- D_j : diffusività di materia della specie j-esima
- t : tempo

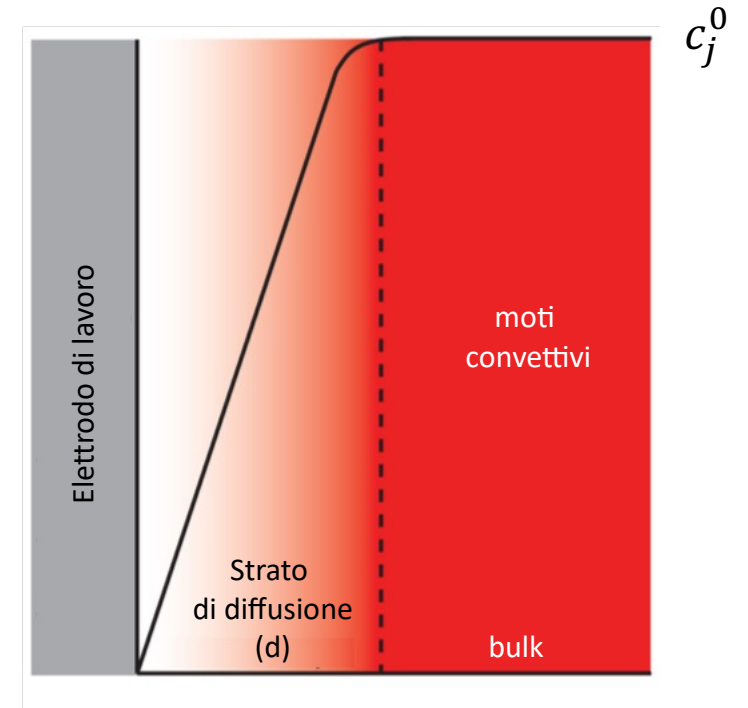
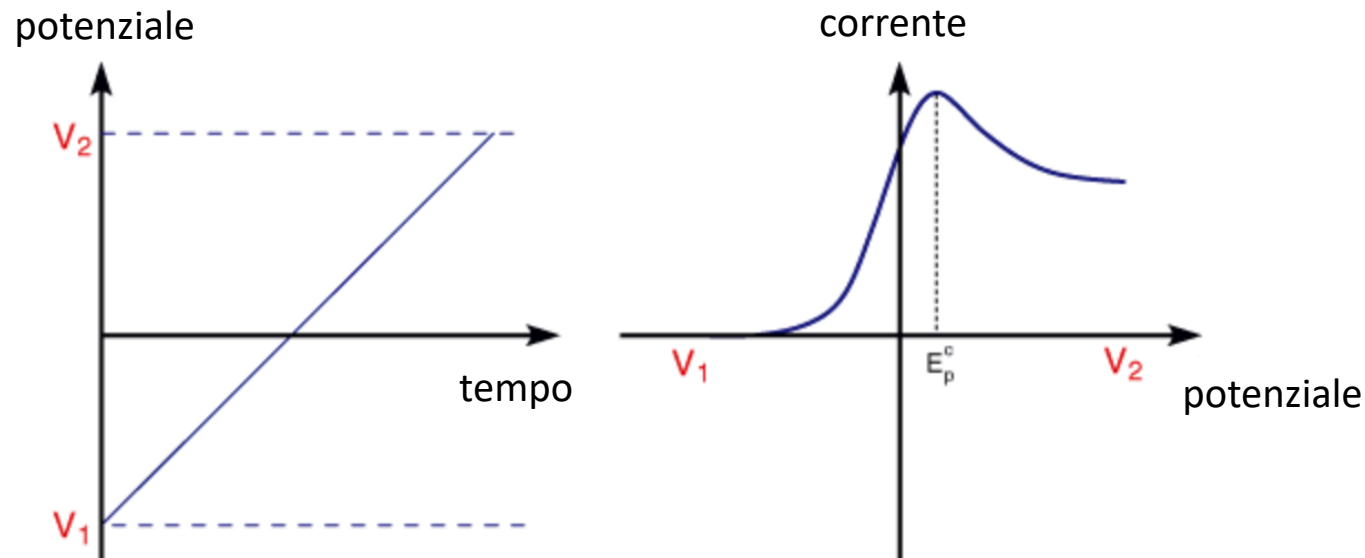
Sensori amperometrici

Al variare della tensione (**a velocità costante**) è possibile invece ottenere il cosiddetto **voltammogramma**. Man mano che la scansione procede verso valori più "riducenti" (dunque col catodo sempre più negativo rispetto all'anodo) comincia a scorrere una corrente netta misurabile. La corrente aumenta via via che il potenziale viene portato lontano da quello di equilibrio (più reagenti vengono convertiti).



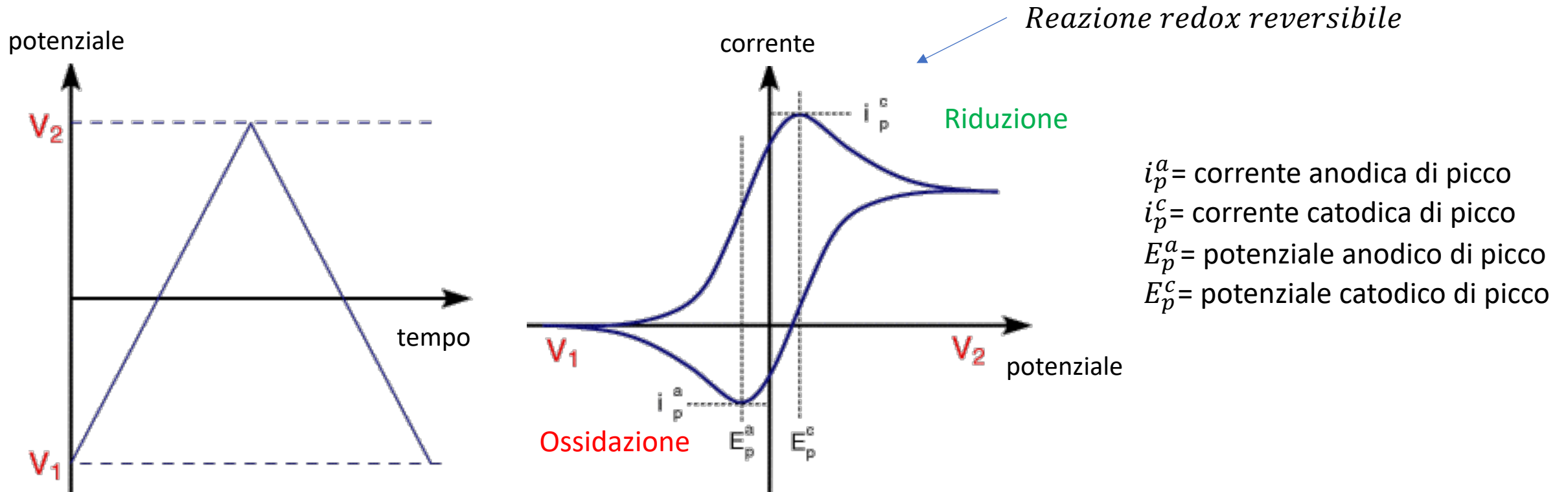
Sensori amperometrici

Ad un certo punto si arriverà ad un picco dovuto al fatto che lo spessore del **layer di diffusione** (d) sarà sufficiente **da limitare il flusso di reagenti verso la superficie dell'elettrodo** (e per questo motivo non saranno sufficienti per soddisfare le condizioni imposte dall'equazione di Nernst per quel potenziale applicato). Oltre il punto di picco assisteremo ad una **decrecita della corrente che sarà descritta dall'equazione di Cottrell**.



Sensori amperometrici

Se operiamo lo sweep in entrambe le direzioni otteniamo il cosiddetto ciclovoltammogramma il quale ci dà informazioni sui **potenziali di riduzione e di ossidazione**, **fenomeni diffusivi**, **adsorbimenti** di specie sull'elettrodo di lavoro...



Sensori amperometrici

Se operiamo lo sweep in entrambe le direzioni otteniamo il cosiddetto ciclovoltammogramma il quale ci dà informazioni sui **potenziali di riduzione e di ossidazione**, **fenomeni diffusivi**, **adsorbimenti** di specie sull'elettrodo di lavoro...

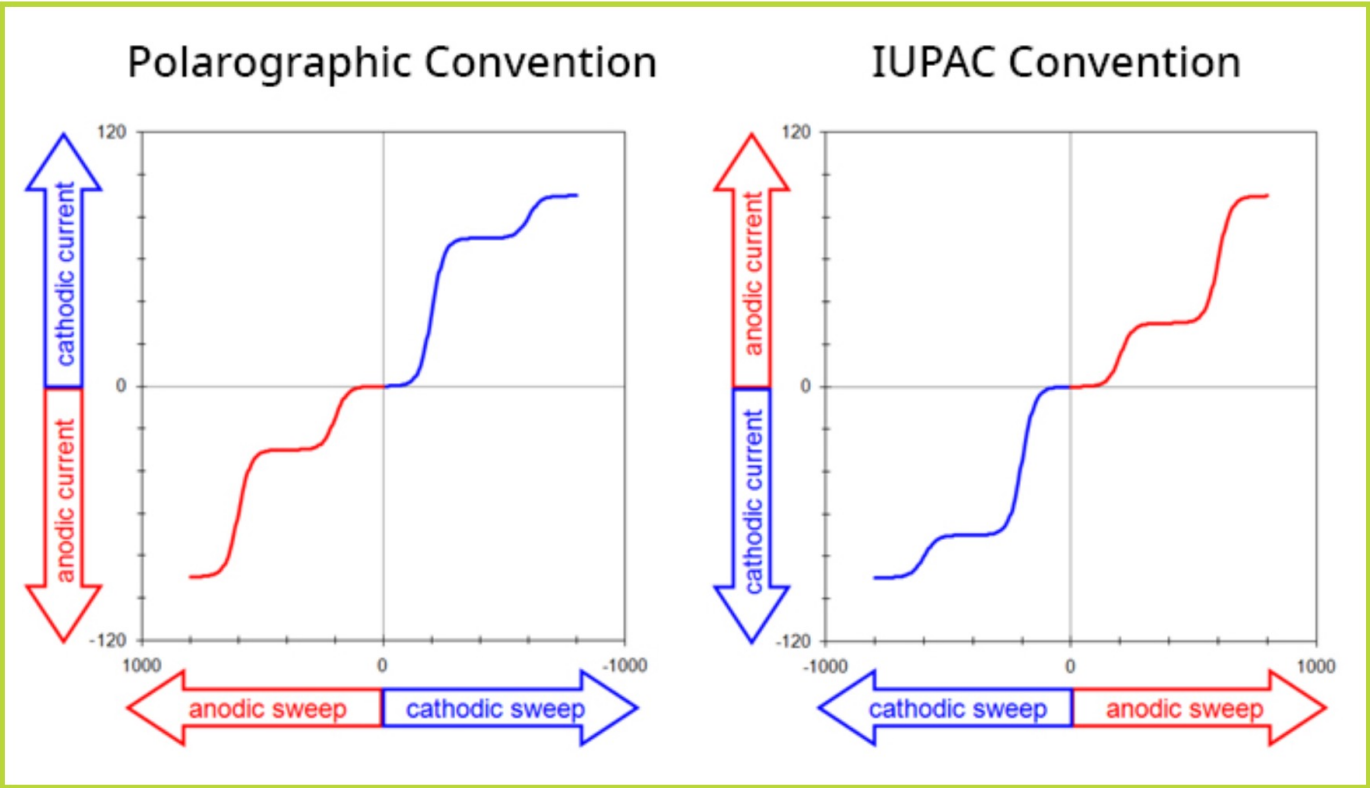
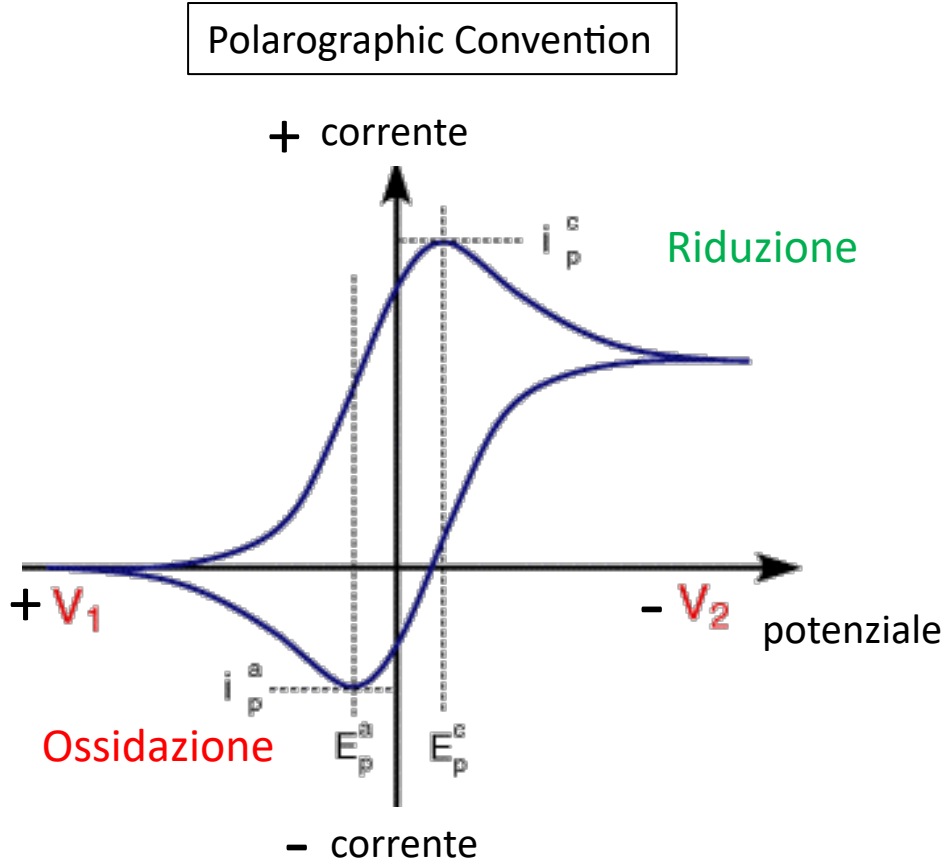


Figure 1. Polarographic vs IUPAC voltammetry plotting conventions



<https://pineresearch.com/shop/kb/theory/general-electrochemistry/voltammetry-plotting-conventions/>

Sensori amperometrici – misura dell'ossigeno

L'ossigeno ha un ruolo essenziale nella funzionalità cellulare, specialmente nella **produzione dell'energia (sotto forma di ATP) a livello mitocondriale**.

L'importanza del suo monitoraggio ha portato allo studio e alla messa a punto di strumenti sempre più rapidi ed efficienti in grado di monitorare in maniera efficace la presenza di ossigeno nei fluidi biologici e nei tessuti.

La concentrazione di O_2 in un dato volume di soluzione è indicato in **ml/L** e sarà dipendente dalla sua pressione parziale $P(O_2)$ (espressa in mmHg). In questo caso la concentrazione è anche chiamata **tensione di ossigeno**.

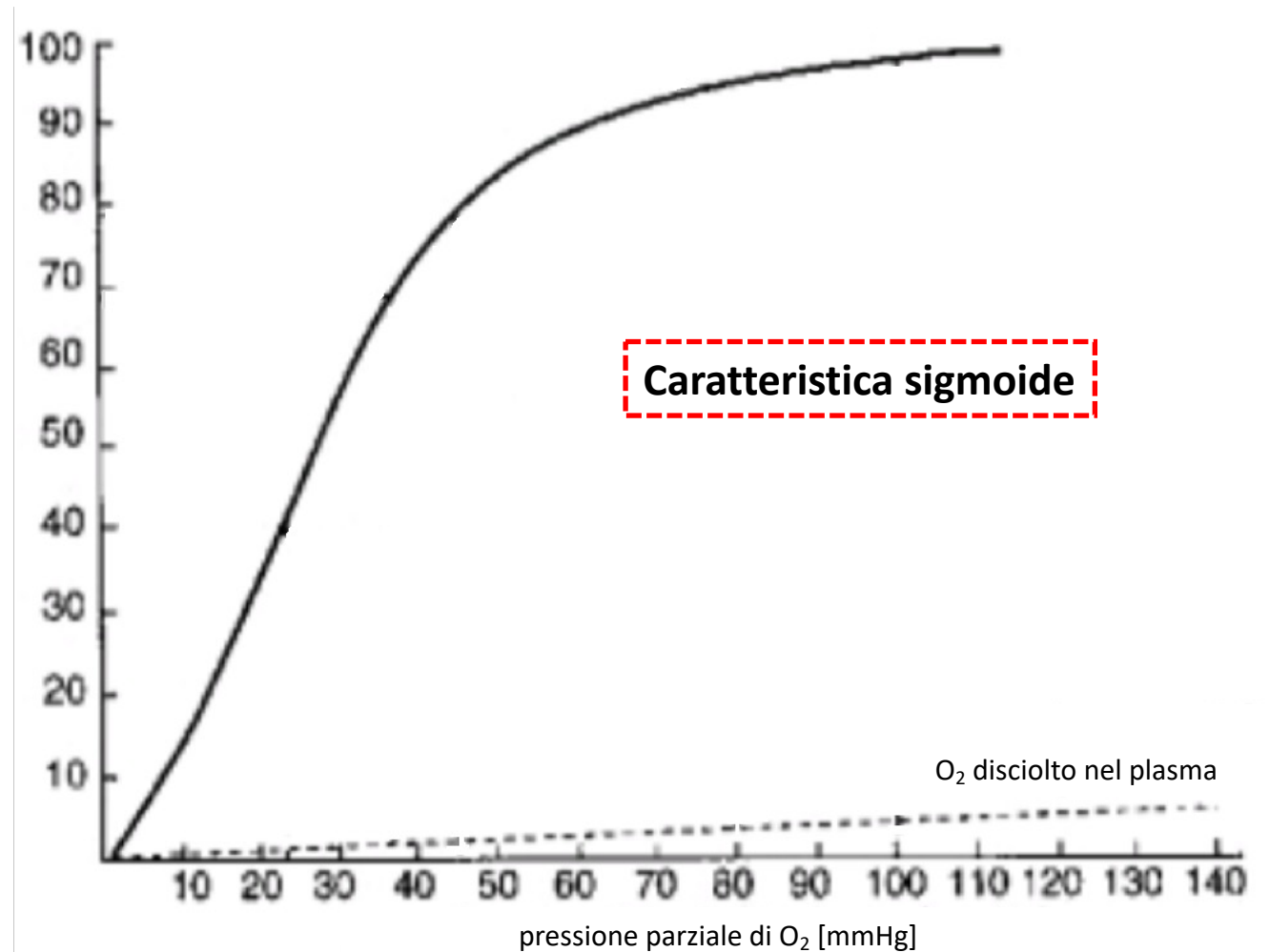
Nel caso in cui l'ossigeno si trovi in soluzione senza essere legato a qualche altra molecola, la sua tensione dunque sarà direttamente proporzionale alla concentrazione (**legge di Henry**) come già visto per la CO_2 .

Sensori amperometrici – misura dell'ossigeno

Nel sangue però, come abbiamo visto, l'ossigeno si trova principalmente legato all'emoglobina. È dunque possibile identificare una sua **concentrazione di saturazione** che sarà dipendente dalla quantità massima di ossigeno che si può legare all'emoglobina stessa.

La quantità totale dipenderà anche dalla minima **parte di ossigeno che si può trovare disciolto nel plasma**.

Saturazione Hb: O₂ legato all'Hb (% della capacità MAX)

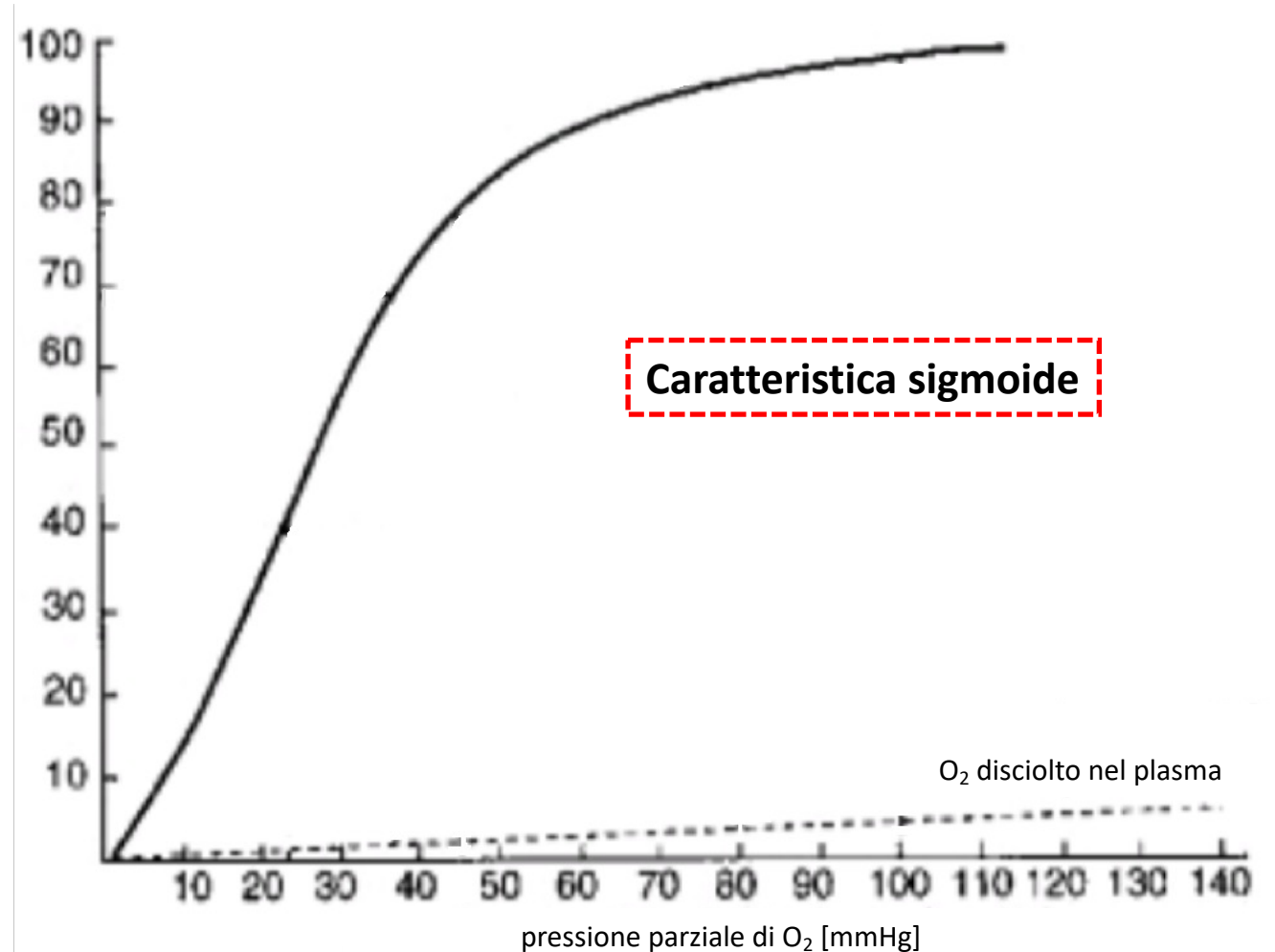


Sensori amperometrici – misura dell'ossigeno

L'affinità dell'emoglobina dipende dalla pressione parziale di ossigeno: per **alte percentuali di ossigeno**, l'Hb cambia conformazione **aumentando l'affinità (stato rilassato - R)** e dunque la capacità di legare O_2 (come avviene a livello alveolare).

Man mano che la percentuale di **ossigeno diminuisce**, l'Hb **perde la sua affinità** per l' O_2 (**stato teso - T**) e questo permette il suo rilascio a livello dei tessuti periferici.

Saturazione Hb: O_2 legato all'Hb (% della capacità MAX)

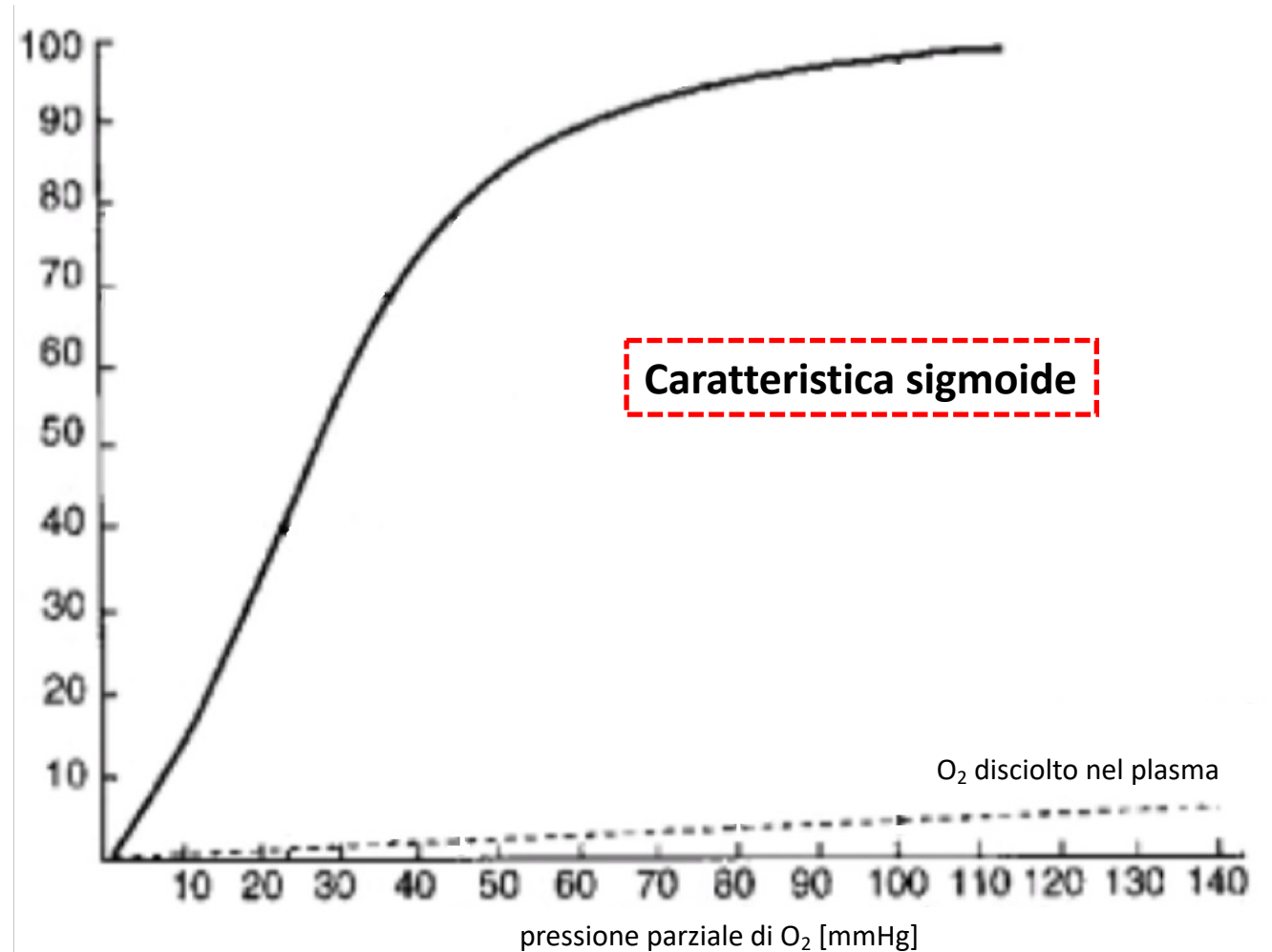


Sensori amperometrici – misura dell'ossigeno

Solo il 2% di O_2 è presente disciolto nel plasma, mentre il restante 98% è presente legato reversibilmente all'emoglobina.

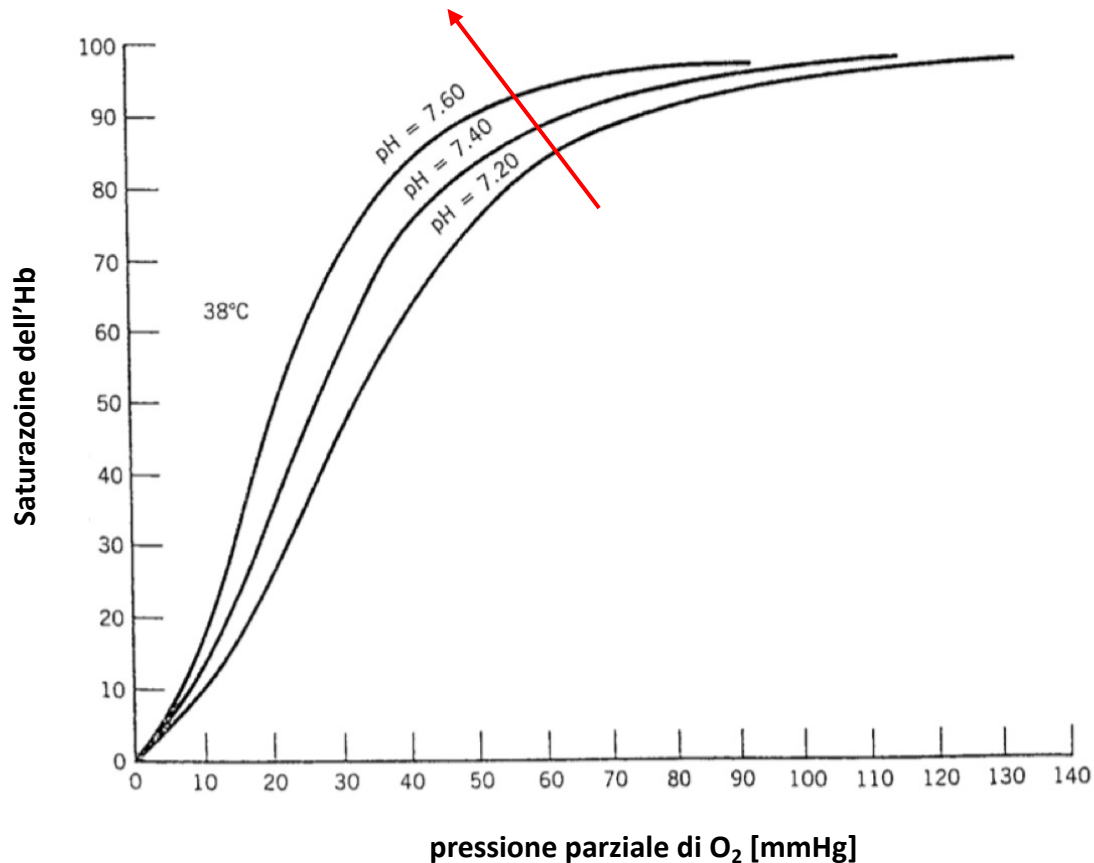
La percentuale di ossigeno disciolto dipende linearmente dalla pressione parziale, mentre la **percentuale di ossigeno legato all'emoglobina** dipende **non linearmente dalla pressione parziale** (caratteristica sigmoidale).

Saturazione Hb: O_2 legato all'Hb (% della capacità MAX)



Sensori amperometrici – misura dell'ossigeno

Nel **sangue arterioso** la PO_2 si attesta intorno ai **100 mmHg** (saturazione dell'Hb 98-100%), mentre a **livello venoso** la PO_2 è circa **40 mmHg** (saturazione dell'Hb circa 75%).



Effetto Bohr
(minore affinità
dell'Hb all' O_2 al
diminuire del pH)

In generale:

- spostamento della curva verso **sinistra** → **aumento dell'affinità** dell'Hb per l' O_2
- spostamento della curva verso **destra** → **diminuzione dell'affinità** dell'Hb per l' O_2

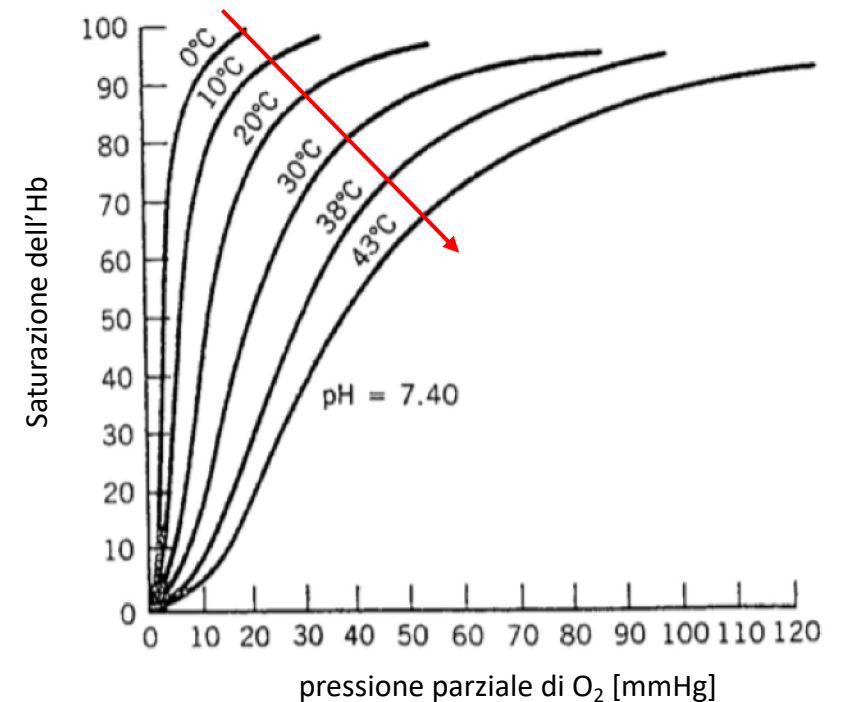
Sensori amperometrici – misura dell'ossigeno

Nel **sangue arterioso** la PO_2 si attesta intorno ai **100 mmHg** (saturazione dell'Hb 98-100%), mentre a **livello venoso** la PO_2 è circa **40 mmHg** (saturazione dell'Hb circa 75%).

Indebolimento del
legame Hb-O₂
all'aumentare della T

In generale:

- spostamento della curva verso **sinistra** → **aumento dell'affinità** dell'Hb per l'O₂
- spostamento della curva verso **destra** → **diminuzione dell'affinità** dell'Hb per l'O₂



Punto della situazione

Dove siamo arrivati e quanto manca.

Sensori chimici

- Concetti generali: concentrazioni e soluzioni acquose
- Approccio potenziometrico (potenziali di semicella, elettrodi di riferimento...)
- Interfaccia elettrodo/elettrolita
- Elettrodi ione selettivi (a membrana solida e polimerica): misure di K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , F^-
- Misure di gas in soluzione (CO_2 ed elettrodo di Severinghaus)
- **Sensori amperometrici**
 - **Elettrodo di Clark (sensore di O_2)**
 - **Misure transcutanee dei gas e pulsossimetro.**

Punto della situazione

Dove siamo arrivati e quanto manca.

Biosensori

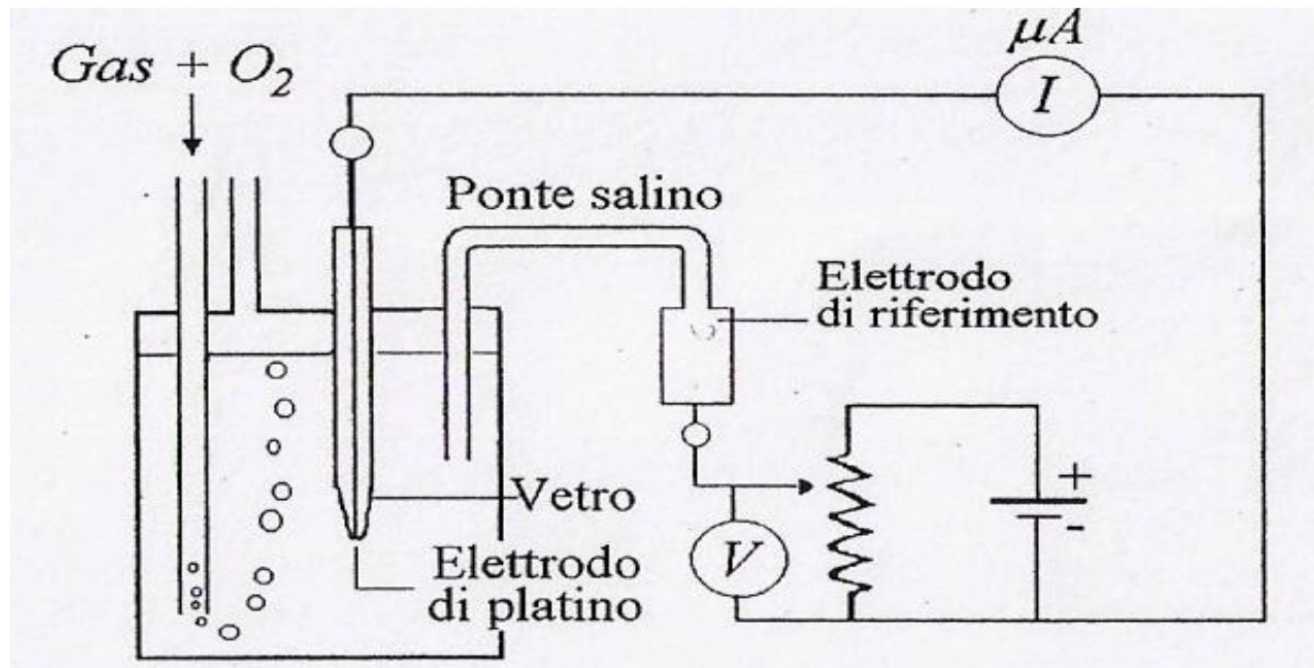
- Concetti generali e classificazione
- Biosensori ad affinità
- Biosensori potenziometrici, amperometrici (sensing di glucosio), ottici e gravimetrici
- Tempo di risposta di un biosensore

Elettrodi per biopotenziali: generalità

Sensori amperometrici – rilevazione dell'ossigeno

La **misura dell'ossigeno disciolto in una soluzione** può essere effettuata utilizzando una cella composta da un **elettrodo di platino immerso nella soluzione stessa, polarizzato rispetto ad un riferimento.**

La corrente misurata in seguito all'applicazione di una ddp dipenderà dalla pressione parziale di O_2 .



Implementazione non adatta alle misure su fluidi biologici.

Sensori amperometrici – l'elettrodo di Clark

L'implementazione dell'elettrodo ad ossigeno vista in precedenza **non è però utilizzabile in ambito biomedico**. Uno dei principali problemi di quella cella è dovuto al fatto che **l'elettrodo di platino si trova a diretto contatto con la soluzione da misurare**.

Trattando di fluidi biologici, questo porta principalmente due effetti indesiderati:

- **Inquinamento dell'elettrodo** di misura dovuto all'adsorbimento di macromolecole sulla sua superficie. Questo può portare a drift nella misura e ad un deterioramento dell'elettrodo stesso. **Perdita di stabilità**.
- **Reazioni indesiderate**. È infatti possibile che nella finestra di tensioni utilizzate avvengano delle reazioni redox tra specie che non sono d'interesse. **Perdita di specificità**.

Sensori amperometrici – l'elettrodo di Clark

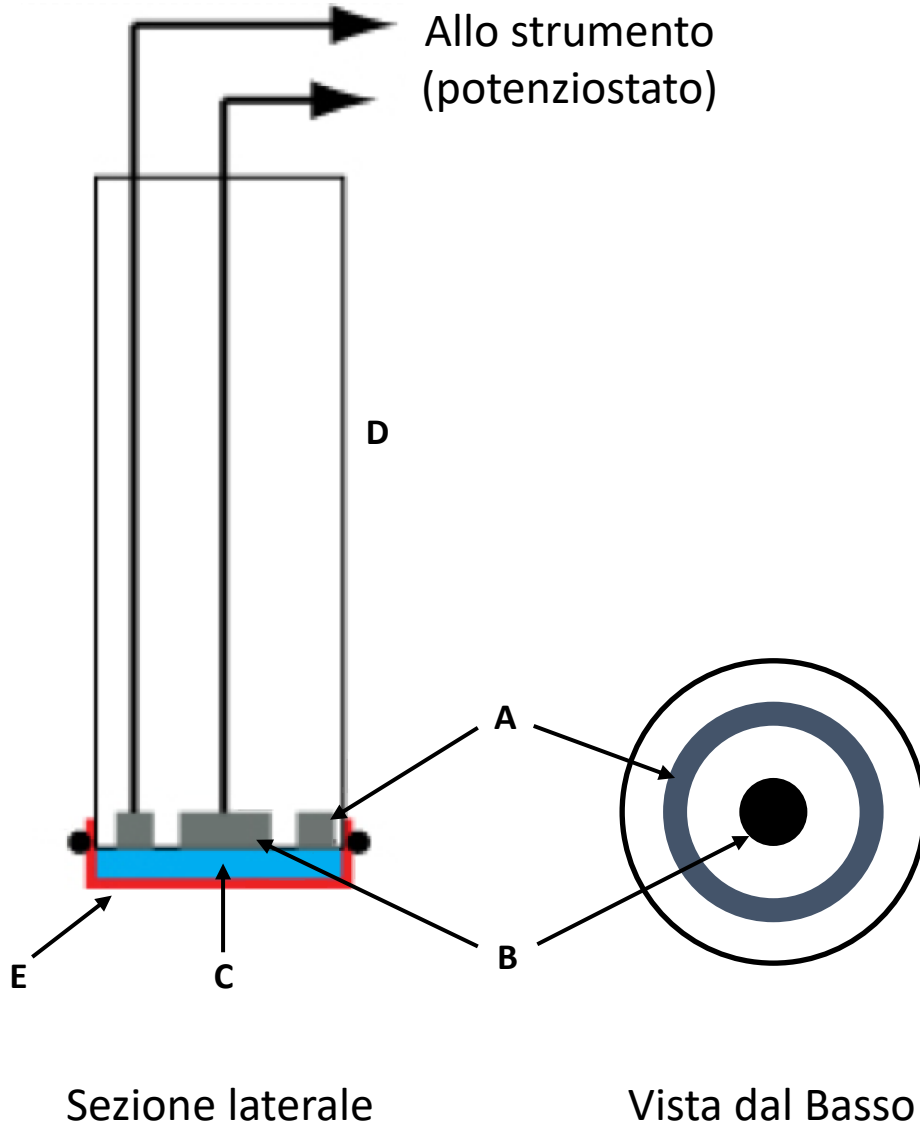
Una configurazione che risolve i problemi appena esposti è quella introdotta da Clark negli anni '50. **L'elettrodo di Clark è di fatto un elettrodo combinato** costituito da un tubo di materiale plastico al cui interno sono presenti sia l'elettrodo di platino che quello di riferimento.

L'ossigeno viene portato all'elettrodo di misura attraverso una **membrana altamente** che non permette alle macromolecole eventualmente presenti nell'ambiente di test di raggiungerlo.

L'alta selettività della membrana permette di **minimizzare effetti parassiti o di inquinamento** dovuti all'adsorbimento proteico sulla superficie dell'elettrodo.

Dato che non c'è contatto elettrico tra soluzione in esame ed elettrodo di riferimento (il quale è contenuto all'interno del dispositivo), è **possibile misurare la tensione di ossigeno anche in mezzi non conduttivi** (come miscele gassose).

Sensori amperometrici – l'elettrodo di Clark

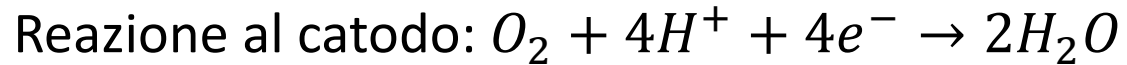


Moderna implementazione dell'elettrodo di Clark: una **sottile membrana permeabile all'ossigeno** è immobilizzata attorno alla fine del cilindro contenente gli elettrodi, ed è da loro separata attraverso un **sottile layer di KCl**. L'elettrodo di platino è in realtà un piccolo dischetto mentre il riferimento in Ag/AgCl è realizzato sotto forma di anello.

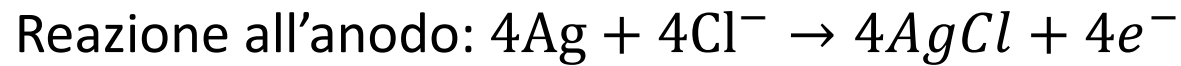
- A. Anodo (Ag/AgCl)
- B. Catodo (piattino di Platino)
- C. Soluzione di KCl
- D. Contenitore principale in plexiglas
- E. Membrana permeabile all'ossigeno (teflon)

Sensori amperometrici

La corrente nella cella, come accennato in precedenza parlando in generale dell'approccio amperometrico, **dipende dal numero di elettroni scambiati durante la reazione**. Nel caso delle misure amperometriche di ossigeno si hanno le seguenti reazioni catodiche e anodiche (considerando un catodo in platino e un anodo in Ag/AgCl):



Reazione di riduzione al catodo

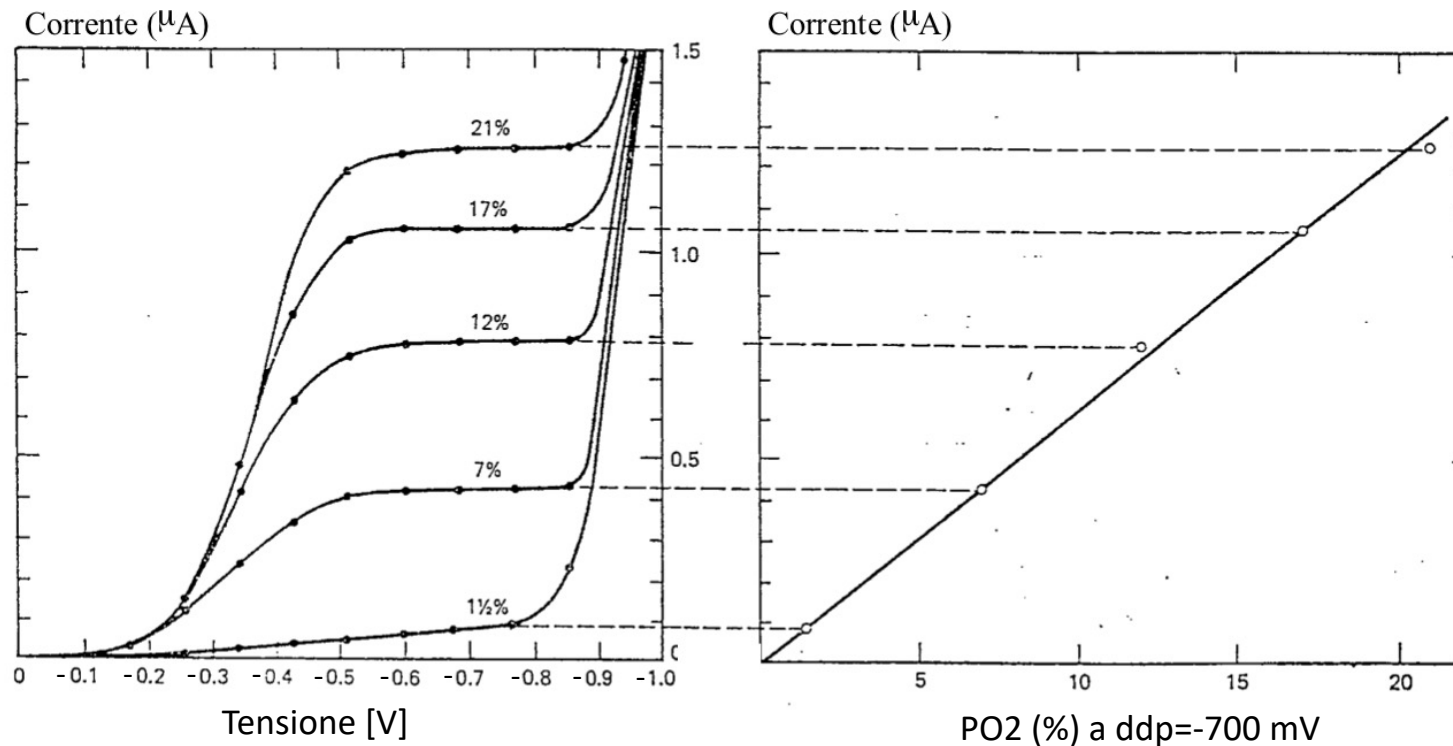


Reazione di ossidazione all'anodo

Attenzione: nelle applicazioni amperometriche, si misura la corrente di cella in seguito all'applicazione di un **potenziale dall'esterno**. Il polo **positivo è dunque l'anodo** (l'ossidazione deve venire indotta sottraendo elettroni) mentre **quello negativo è il catodo** (platino).

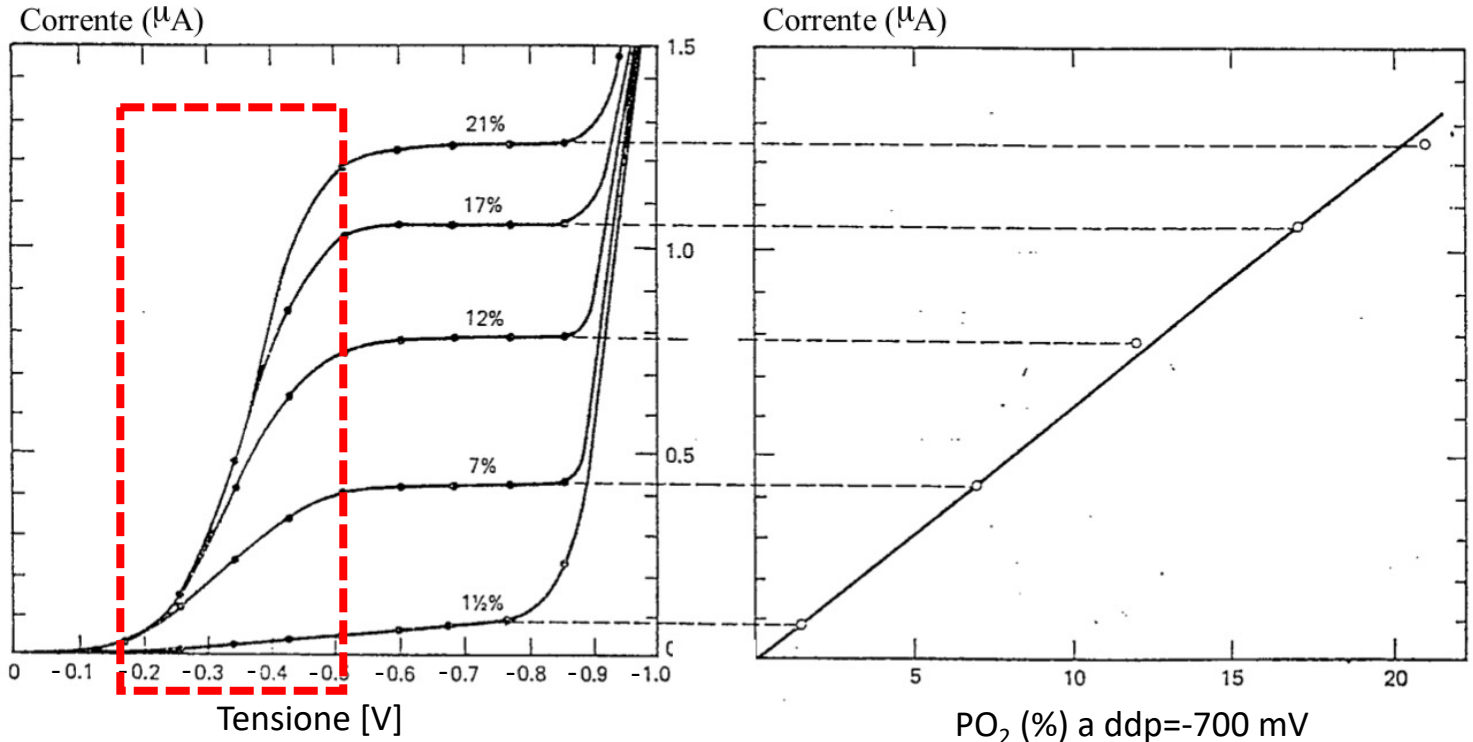
Sensori amperometrici

Il valore di tensione è scelto in funzione del comportamento stesso dell'elettrodo. In particolare, **la corrente tenderà ad aumentare con l'aumentare della polarizzazione applicata all'elettrodo di platino fino ad un plateau**, cioè una zona in cui la corrente non dipende più dalla tensione. Questo valore di tensione (chiamato **sovratensione diffusiva**) definisce la regione in cui è possibile ottenere una **relazione lineare tra la corrente e la concentrazione di O_2** .



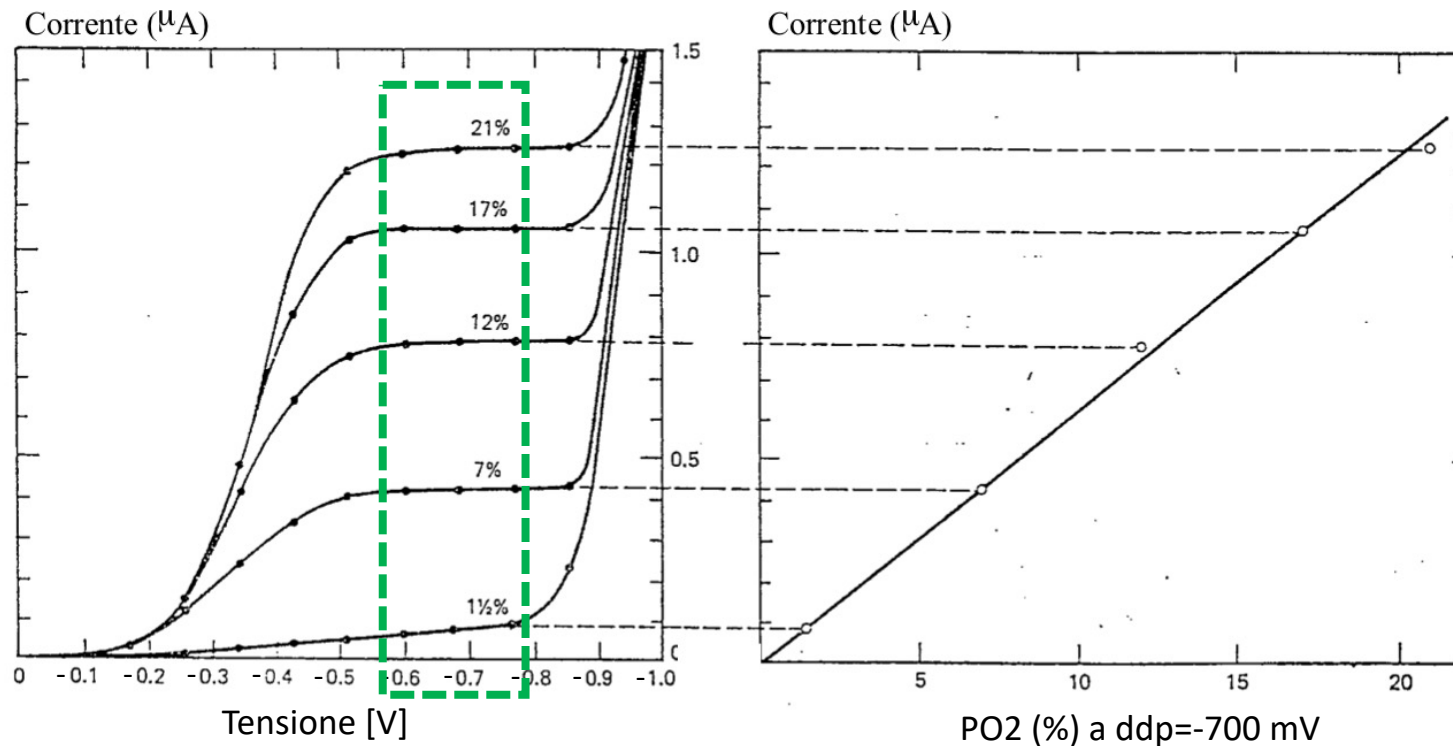
Sensori amperometrici

Per piccole tensioni applicate la corrente si può considerare **limitata dal trasferimento elettronico** dovuto alla reazione redox.



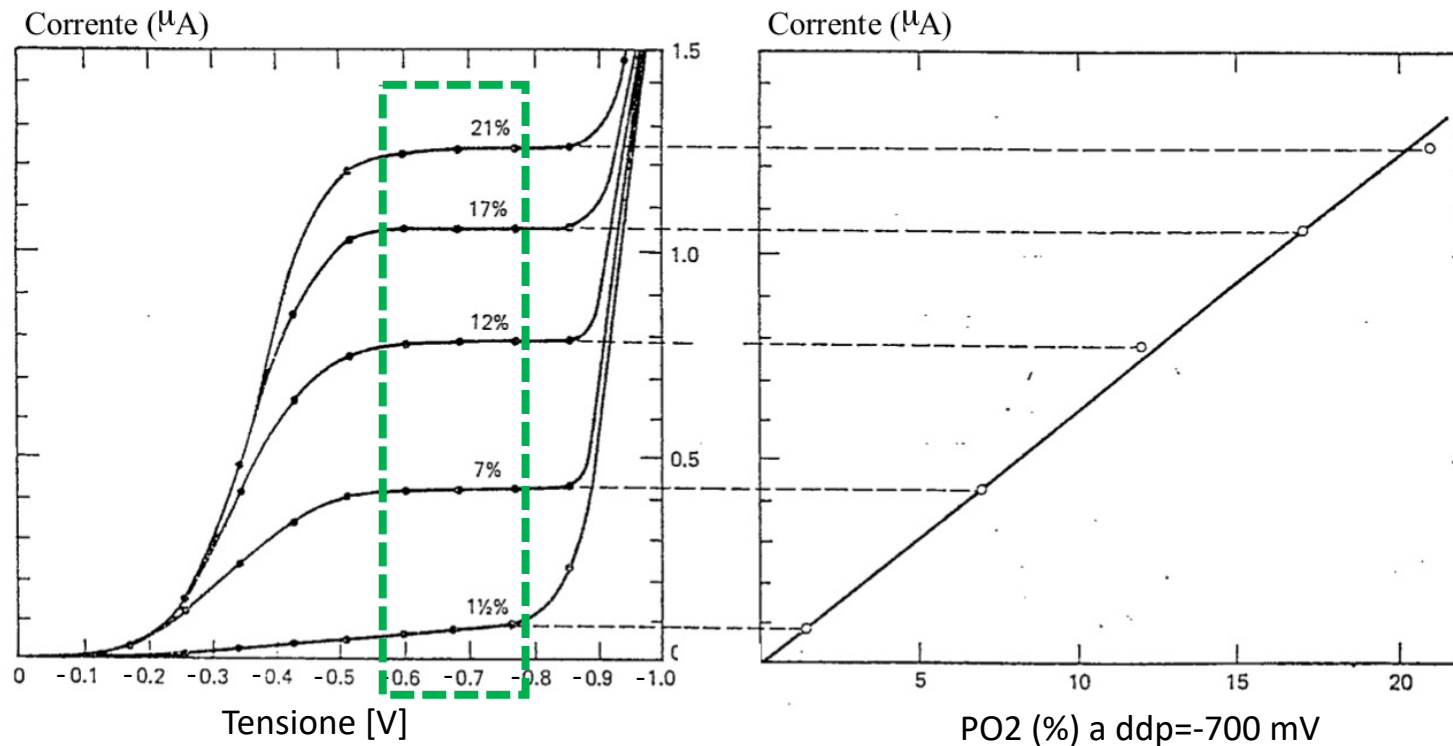
Sensori amperometrici

Quando un potenziale di -0.68 V è applicato al catodo **la corrente che viene prodotta è direttamente proporzionale alla pressione di ossigeno del campione che diffonde attraverso la membrana.**



Sensori amperometrici

Data l'alta efficienza della reazione di riduzione dell'ossigeno, **sulla superficie del catodo si può considerare nulla la sua concentrazione effettiva** (appena arriva sulla superficie viene istantaneamente ridotto). Il meccanismo si dice dunque **limitato dalla diffusione** e **Il rate di riduzione dipenderà dal processo di diffusione dell'ossigeno attraverso la membrana, il quale è proporzionale alla sua concentrazione nel bulk.**



Sensori amperometrici

Dunque **la corrente** che scorre nella cella quando la polarizzazione dell'elettrodo di Pt rispetto all'anodo in Ag/AgCl è circa -0.7 V **è proporzionale alla tensione dell'ossigeno nella soluzione di test.**

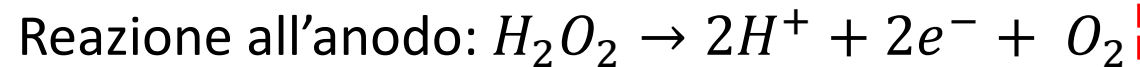
Cosa succede se invece polarizziamo l'elettrodo di Pt positivamente rispetto a quello di Ag/AgCl?

Sensori amperometrici

Dunque **la corrente** che scorre nella cella quando la polarizzazione dell'elettrodo di Pt rispetto all'anodo in Ag/AgCl è circa -0.7 V **è proporzionale alla tensione dell'ossigeno nella soluzione di test.**

Cosa succede se invece polarizziamo l'elettrodo di Pt positivamente rispetto a quello di Ag/AgCl? Intanto la prima cosa a cui fare attenzione è la terminologia: l'elettrodo di platino sarà adesso l'anodo mentre l'Ag/AgCl il catodo.

In **presenza di H₂O₂** avverranno le seguenti reazioni:



L'elettrodo può quindi essere utilizzato per la **rilevazione di H₂O₂** (potenziale da applicare: +600 mV).

Sensori amperometrici

Problematiche associate all'elettrodo di Clark.

La reazione è molto **sensibile alle variazioni di temperatura** e alla **salinità della soluzione**. Per mantenere una reazione lineare tra la concentrazione di ossigeno (o di perossido di idrogeno) e la corrente **la temperatura deve essere controllata** con una precisione di almeno 0.1 °C (sistema compensato in temperatura).

Il platino (che comunque rimane il materiale più utilizzato per la realizzazione degli elettrodo di lavoro) è costoso.

La riduzione di ioni idrogeno sulla superficie dell'elettrodo di lavoro provoca la **formazione di idrogeno gassoso anche a bassi voltaggi**, fenomeno che deve essere monitorato con attenzione e che potrebbe inficiare la misura.

Sensori amperometrici

Caratteristiche dell'elettrodo di lavoro: L'aspetto più importante di un elettrodo di riferimento per applicazioni amperometriche è la sua **inerzia chimica** rispetto a potenziali reazioni redox che possono avvenire nel range di potenziali nel quale è utilizzato.

Il tipo di elettrodo di lavoro può variare a seconda dell'applicazione d'interesse in modo da **selezionare opportunamente la finestra di potenziale relativa alla reazione desiderata**. Il **platino** è quello maggiormente utilizzato in quanto presenta elevata inerzia chimica e può facilmente essere fabbricato in diverse forme e dimensioni.

Dato che il funzionamento di questi sistemi dipende da ciò che accade sulla superficie degli elettrodi, bisogna fare moltissima **attenzione alla loro pulizia** (protocolli molto accurati da seguire...).

Sensori amperometrici – elettrodi di lavoro

Qualche elettrodo di lavoro

<u>Material</u>	<u>Advantages</u>	<u>Limitations</u>
Pt	available wire, flat plate & tube large range of sizes Pt-Rh alloy for rigidity	low hydrogen overvoltage so cathodic potential range limited expensive
Au	configurations same as Pt larger cathodic potential range	larger cathodic potential range anodic window limited by surface oxidation expensive
Carbon	many types and configurations good cathodic potential range	quality varies greatly hard to shape
C-paste	wide potential range low background current inexpensive	unstable in flow cells cannot use in organic solvents
Hg	excellent cathodic window easy to “refresh” forms amalgams	limited anodic window due to mercury oxidation toxic

Misura transcutanea di CO₂ e O₂

Grazie alle proprietà della pelle, la quale presenta una **permeabilità a gas quali O₂ e CO₂**, e ai recenti progressi tecnologici, la misura transcutanea dei gas presenti nel sangue è diventata una pratica clinica ormai consolidata. Grazie alle sue intrinseche caratteristiche di **non invasività**, gli approcci transcutanei trovano spazio in ambiti quali la **neonatologia**, dove lo stress indotto sul paziente deve essere il più contenuto possibile.

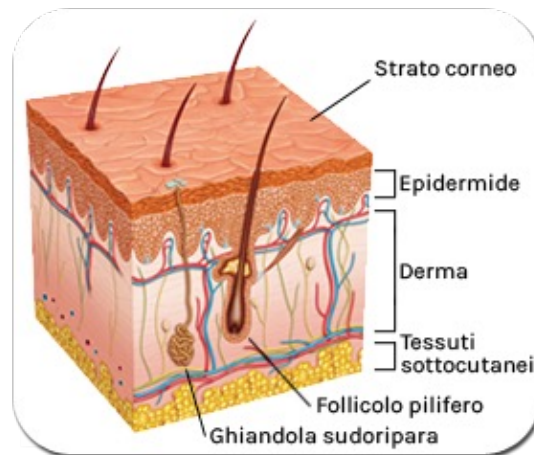
Oltre ai vantaggi da questo punto di vista, un'altra importante proprietà delle misure transcutanee è il fatto di poter effettuare il **monitoraggio continuo dei gas** (cosa non possibile con gli spettrofotometri da laboratorio), requisito essenziale in condizioni di alta criticità in cui possono avvenire rapide variazioni dell'equilibrio acido-base quali:

- Ipossia (carenza di ossigeno)
- Iperossia (eccesso di ossigeno)
- Ipercapnia (eccesso di CO₂)

Misura transcutanea di CO₂ e O₂

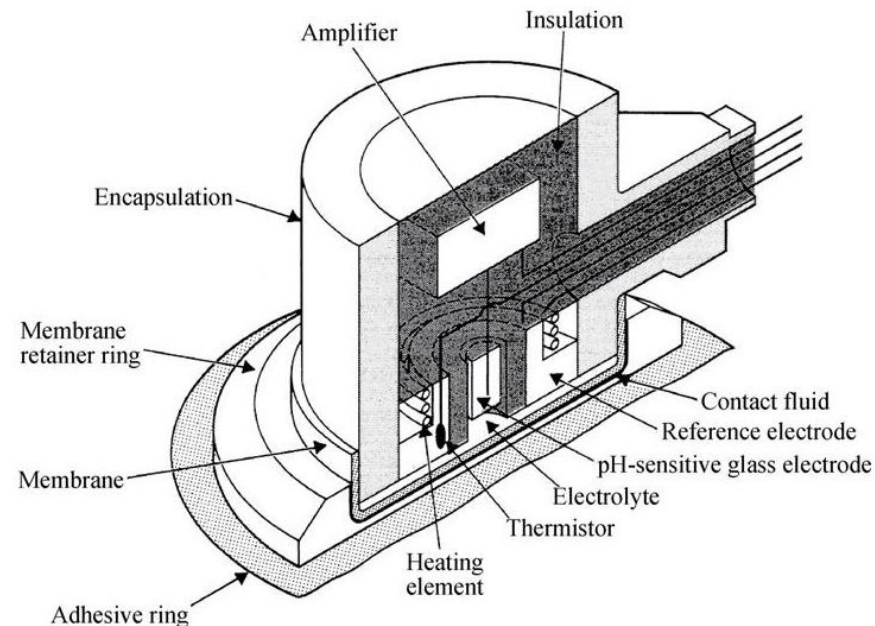
Le pressioni parziali di O₂ e CO₂ possono, come accennato precedentemente, essere rilevate grazie alla **permeabilità degli strati più superficiali della pelle** (l'epidermide e lo strato corneo), la quale permette a parte del gas di diffondere dallo strato più profondo (derma) dove è presente la fitta rete di capillari responsabili dell'irrorazione sanguigna periferica.

In condizioni normali, la permeabilità di questi strati all'ossigeno è molto bassa e la pressione parziale che si può misurare in prossimità della pelle è anch'essa molto bassa (intorno ai 2.5 mmHg). **Scaldando la zona si può però ottenere un sostanziale aumento della permeabilità.** Ad una temperatura di 43-44 °C, nella zona di misura la pressione parziale esterna si porta a valori vicini a quelli sanguigni.



Misura transcutanea di CO₂ e O₂

Un tipico sensore transcutaneo di CO₂ si basa su una **particolare versione ingegnerizzata e miniaturizzata dell'elettrodo di Severinghaus**. In particolare il sensore contiene un sensore di pH a membrana di vetro con riferimento esterno in Ag/AgCl. Il sistema prevede anche la presenza di una **membrana selettiva alla CO₂** (esattamente come per l'elettrodo di Severinghaus) e di un **riscaldatore** per promuovere la diffusione del gas verso l'esterno. Tra la membrana e gli elettrodi è presente un elettrolita tampone (tipicamente HCO³⁻).



Misura transcutanea di CO₂ e O₂

Problematiche associate alle misure transcutanee di CO₂.

L'effetto del riscaldamento è duplice: **aumento della CO₂** (in virtù della diminuzione della sua solubilità nel plasma) e **aumento del metabolismo locale**. Questo determina una **CO₂ misurata che è maggiore di quella corrispondente arteriosa**. Una accurata **calibrazione** del fenomeno può però minimizzare questo problema (che può essere visto come un offset da sottrarre alla misura).

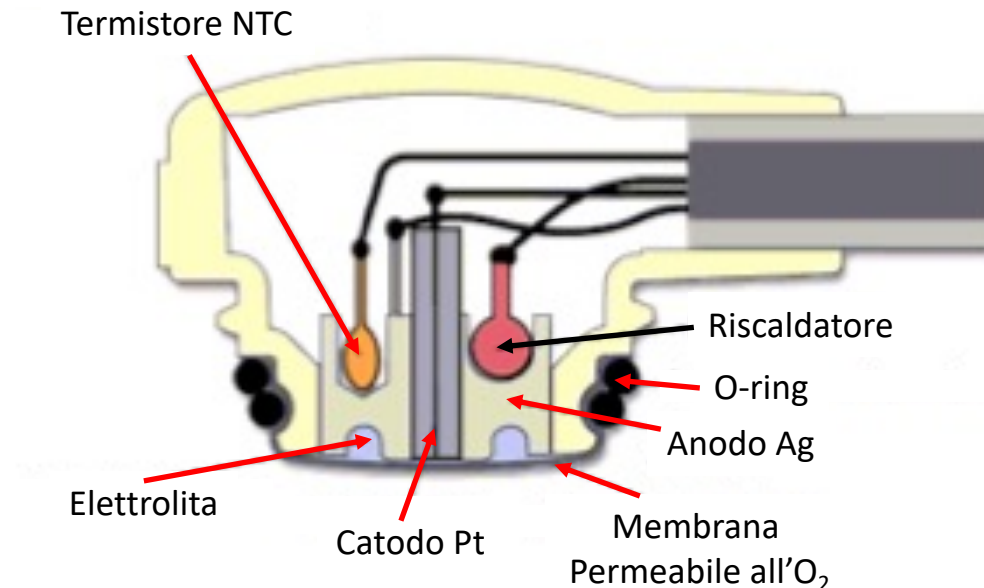
Il **posizionamento dell'elettrodo** stesso è critico (è importante infatti minimizzare lo scambio gassoso tra la zona di misura e l'ambiente circostante). Sistema molto aderente alla pelle → comfort non altissimo, specialmente per misure molto lunghe.

La **temperatura** locale deve essere controllata con estrema accuratezza (+/- 0.1 °C) → sistemi di compensazione a volte non banali.

Misura transcutanea di CO₂ e O₂

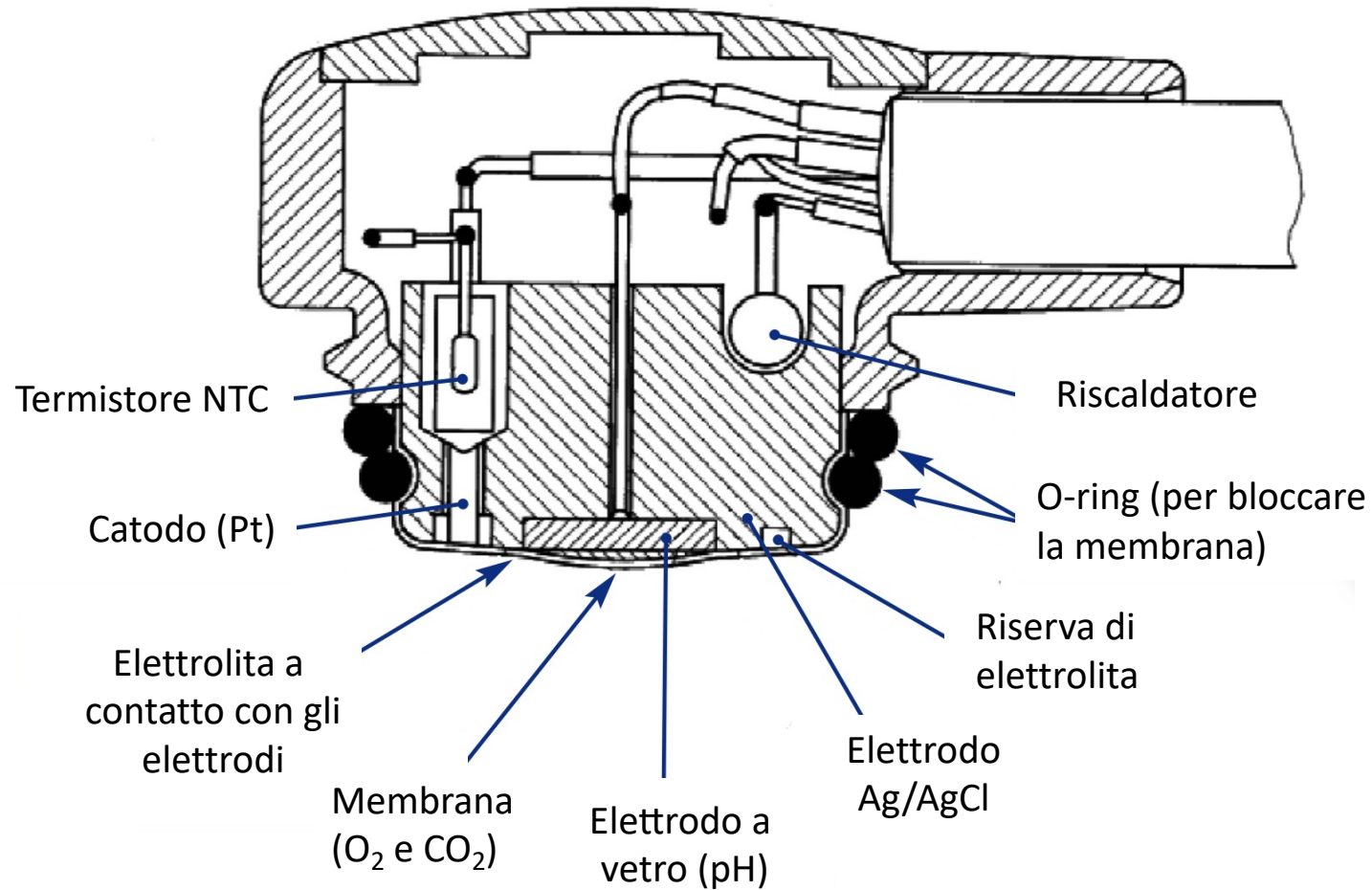
Il sensore transcutaneo di O₂ si basa invece su una **particolare implementazione dell'elettrodo di Clark**. Questo sensore consiste un catodo di platino (elettrodo di lavoro) e in anodo cilindrico in Ag/AgCl. L'elettrolita è costituito da un tampone a base di KCl. Gli elettrodi e l'elettrolita sono separati dalla pelle attraverso una **membrana permeabile all'ossigeno** mentre un sistema comprendente un **riscaldatore e un termistore** sono utilizzati per il riscaldamento controllato della zona.

I sensori di questo tipo sono tenuti in posizione attraverso un anello autoadesivo (come nei comuni elettrodi per ECG). **La finestra di utilizzo di questi sensori è 5-6 ore.**



Misura transcutanea di CO₂ e O₂

Sensore integrato per misure di CO₂ e O₂.

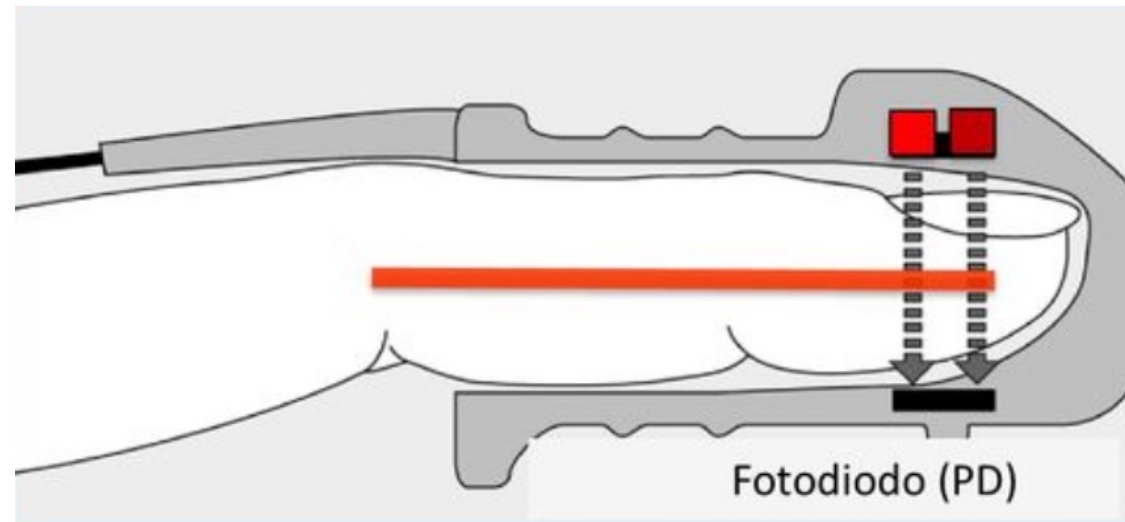


Il pulsossimetro

Come abbiamo già visto, la maggior parte dell'ossigeno nel plasma si trova legato all'emoglobina. Il suo livello di saturazione si può esprimere in questo modo:

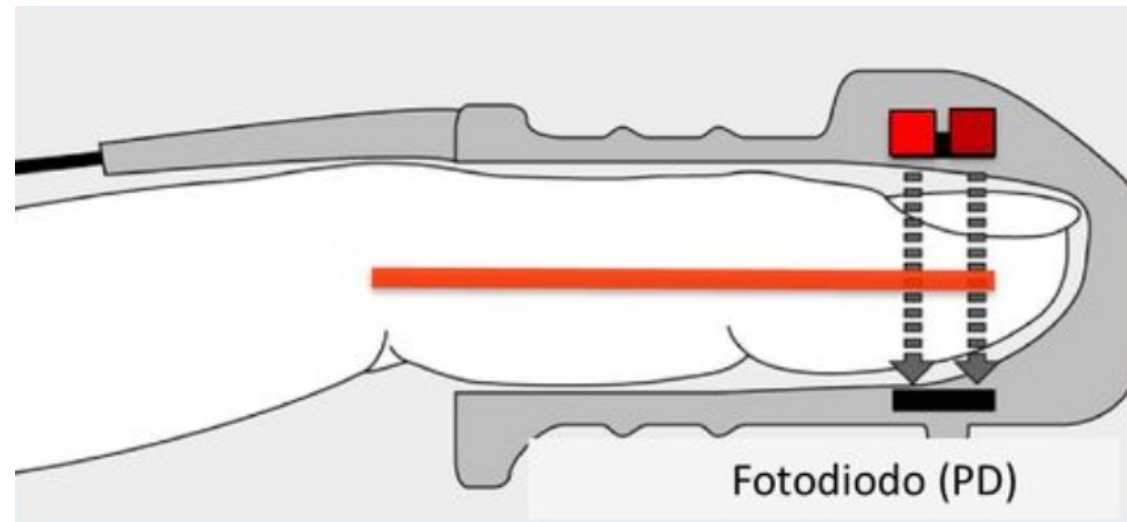
$$SaO_2 = \frac{[HbO_2]}{[HbO_2] + [Hb]} \cdot 100$$

Un altro modo **non invasivo** per valutare (in maniera indiretta) la saturazione del sangue arterioso (SaO_2) è la **pulsossimetria**, una particolare misura spettrofotometrica.



Il pulsossimetro

Il suo funzionamento si basa sull'utilizzo di **due sorgenti luminose** (luce rossa a 660 nm e infrarossa a 940 nm) e di un **fotodiodo**. La luce viene fatta passare attraverso un a porzione del corpo (spesso un dito, ma anche il lobo dell'orecchio o l'intero palmo nella mano o del piede in applicazioni neonatologiche) e la luce che attraversa il tessuto viene rilevata dal fotodiodo.



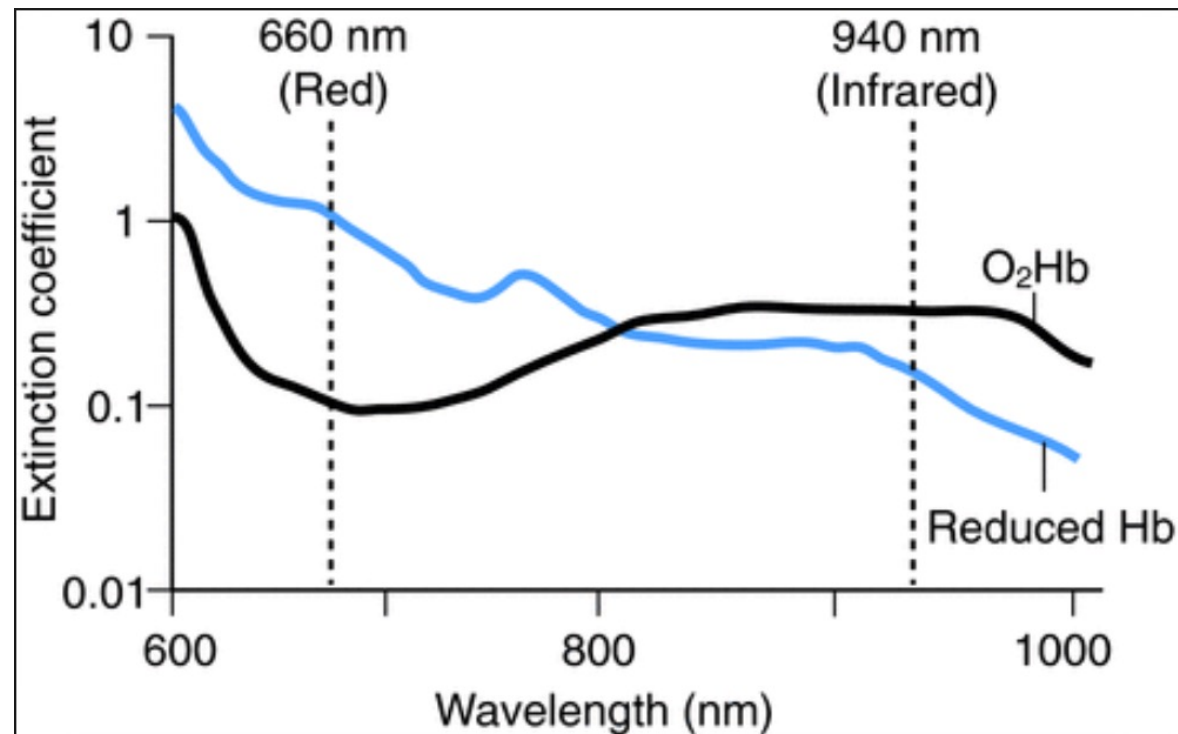
Il pulsossimetro

Il principio di funzionamento si basa sulla **natura pulsatile della sola componente arteriosa** e sulla **diversa assorbanza della ossiemoglobina rispetto alla deossiemoglobina**.

- La ossiemoglobina presenta il massimo dell'assorbimento nella regione infrarossa (meno assorbimento nel rosso)
- La deossiemoglobina ha invece il picco di assorbimento nel rosso e assorbe meno nell'infrarosso.

Assorbanza

$$A_{\lambda} = -\log \frac{I^T}{I^i} = d \sum_{i=1}^N \epsilon_i^{\lambda} \cdot c_i$$



Il pulsossimetro

Il pulsossimetro è capace di dare informazioni su due importanti parametri d'interesse biomedico:

- La saturazione di O_2 (tecnica spettrofotometrica).
- Ritmo cardiaco (tecnica pletismografica).

In particolare in seguito ad ogni fase **sistolica** il **volume ematico aumenta**, provocando un **aumento dell'assorbimento della luce**.

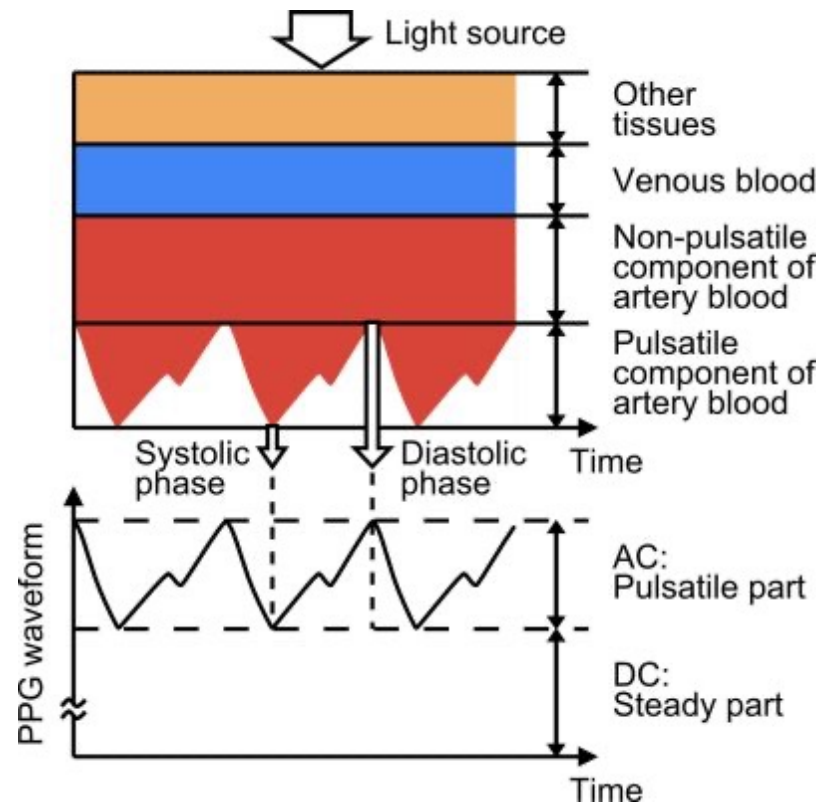
Durante la **diastole** il **volume ematico diminuisce** e dunque **l'assorbimento della luce diminuisce di conseguenza**.

In particolare, nel suo percorso la luce verrà assorbita in diverso modo da diversi tessuti:

- Tessuto muscolare
- Tessuto osseo e cartilagineo
- Sangue Venoso
- Sangue arterioso
 - Componente non pulsatile (venosa)
 - **Componente variabile in funzione del ciclo cardiaco (arteriosa)**

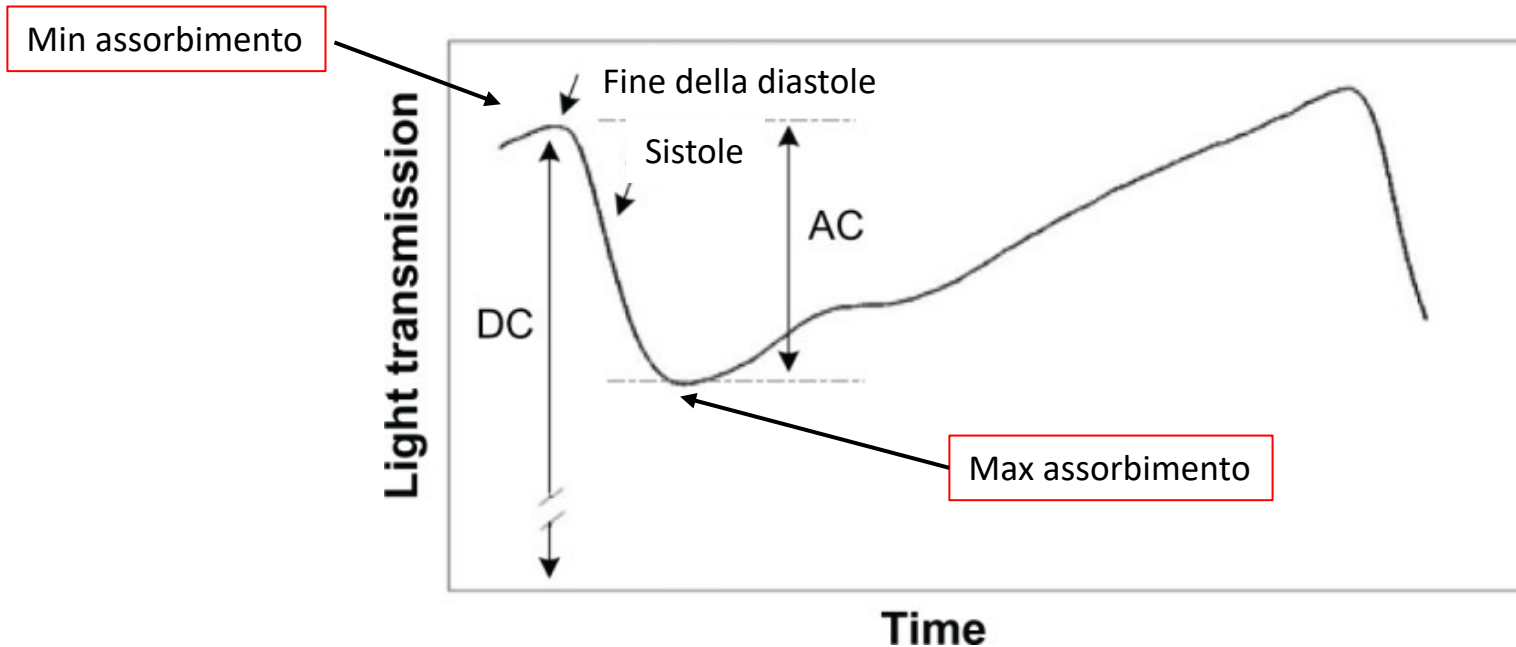
Il pulsossimetro

L'ultima componente del volume ematico a livello arterioso è dunque l'unica che varia (con buona approssimazione, tutti gli altri contributi possono essere considerati costanti). Fatta questa considerazione è dunque possibile ottenere **informazioni sia sul livello di ossigenazione del sangue arterioso che sul ritmo cardiaco in modo continuo e non invasivo**.



Il pulsossimetro

Considerando come **DC** le componenti non variabili nel tempo e **AC** quelle che invece variano durante il ciclo cardiaco è possibile valutare le variazioni della saturazione di ossigeno semplicemente valutando, per entrambe le lunghezze d'onda, il **rapporto (R) tra AC e DC**.

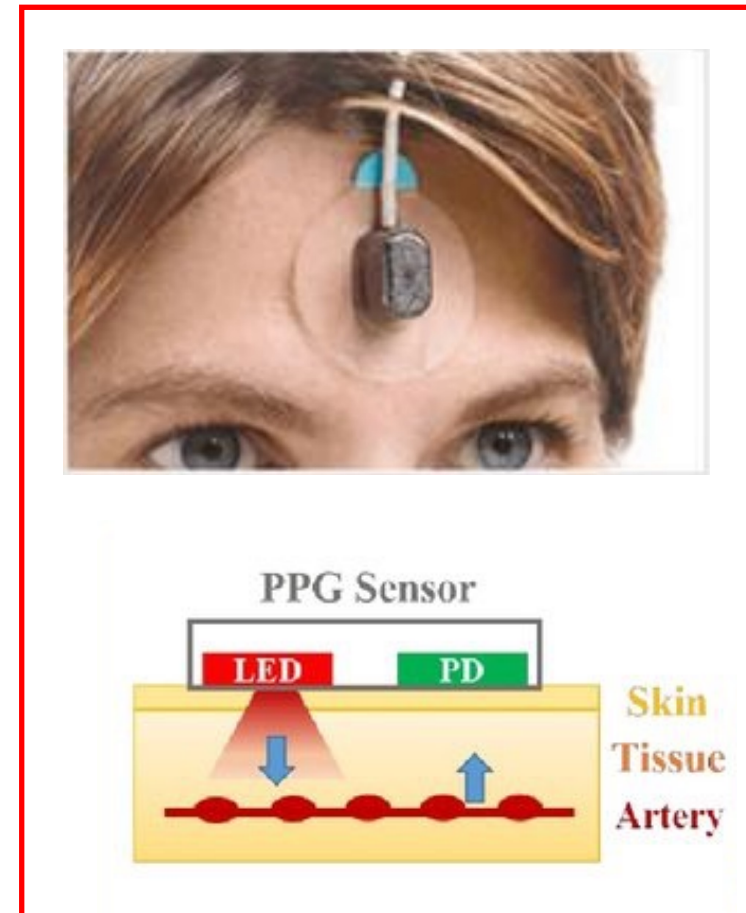


$$R = \frac{\left(\frac{AC}{DC}\right)_{\lambda_1}}{\left(\frac{AC}{DC}\right)_{\lambda_2}}$$

$$SaO_2 = \frac{\epsilon_{deossiHb\lambda_1} - R \cdot \epsilon_{deossiHb\lambda_2}}{R(\epsilon_{OssiHb\lambda_2} - \epsilon_{deossiHb\lambda_2}) + (\epsilon_{DeossiHb\lambda_1} - \epsilon_{OssiHb\lambda_1})}$$

Il pulsossimetro

Tipologie di pulsossimetro. Il pulsossimetro può essere a **trasmissione** (rilevatore dalla parte opposta rispetto alla sorgente) o a **riflettanza** (sensore dalla stessa parte dei LED).



Il pulsossimetro

Principali limitazioni del pulsossimetro.

Rispetto alle misure (invasive) effettuate con gli spettrofotometri da laboratorio, le misure pulsossimetriche possono presentare un **errore anche del 3%–4%**. Questo livello di accuratezza è comunque sufficiente per la rilevazione di declini significativi nelle funzioni respiratorie (ma in alcuni casi non è sufficiente).

I pulsossimetri permettono generalmente **solo l'analisi delle emoglobine funzionali** (quelle cioè che possono trasportare ossigeno). Con l'approccio standard a due lunghezze d'onda si perde dunque l'informazione relativa alla presenza di carbossiemoglobina, metaemoglobina etc.

Sono in studio sistemi a più sorgenti per risolvere questo problema.