

# TURBIDIMETRIA E NEFELOMETRIA

Per descrivere esaurientemente la composizione di un liquido, non si può prescindere dalle **sostanze sospese**, di cui si cerca di sapere la concentrazione e la natura.

Tali sostanze, che si trovano in sospensione, sono essenzialmente sostanze solide non solubili, come ossidi metallici, grassi, alghe e microrganismi. Si tratta in generale di particelle dell'ordine di  $10^{-6}$  ...  $10^{-7}$  m ma che, non essendo dissociate in ioni, **non influenzano le caratteristiche chimiche** del liquido, ma **modificano anche notevolmente le sue caratteristiche fisiche**.

Irradiando un sistema disperso, formato cioè da particelle solide disperse in un mezzo disperdente liquido (sospensioni semplici, soluzioni colloidali) con una radiazione monocromatica, si osservano **fenomeni di diffusione o assorbimento** della luce che possono essere sfruttati a fini analitici, per la determinazione quantitativa del materiale in sospensione.

Perchè questi fenomeni di diffusione della luce possano essere utilizzati a fini analitici, occorre che si verifichino alcune condizioni necessarie:

la radiazione incidente deve essere monocromatica o anche policromatica purchè costituita da una banda di lunghezze d'onda comprese in un intervallo ristretto di 40-50 nm (banda passante del filtro)

**le sospensioni devono essere stabili** e non dare luogo a fenomeni di sedimentazione durante le letture; se ciò non è possibile, si possono aggiungere dei colloidoprotettori alle sospensioni, al fine di stabilizzarle. Il loro meccanismo di azione sfrutta sia fenomeni dovuti alle cariche elettrostatiche che possono essere presenti sulle particelle e che ne impediscono l'aggregazione, sia un aumento della densità e della viscosità del mezzo liquido disperdente

le dimensioni medie delle particelle sospese devono essere controllate e comunque, dello stesso ordine di grandezza delle lunghezze d'onda delle radiazioni incidenti

il mezzo disperdente e le particelle sospese, devono avere indici di rifrazione abbastanza diversi

Quando una radiazione luminosa attraversa una sospensione di particelle finemente disperse, si potranno avere o fenomeni di ASSORBIMENTO di una parte della radiazione, o di DIFFUSIONE (riflessione, rifrazione, diffrazione);

- se prevale il fenomeno di assorbimento (quando la dimensione delle particelle che provocano torbidità è dell'ordine o superiore al micrometro), si ricorre alla misura turbidimetrica;
- se, invece, si è in presenza di particelle di più piccole dimensioni (dell'ordine di decine o centinaia di nanometri), prevale il fenomeno di diffusione e si utilizza la nefelometria.

# Turbidimetria

La turbidimetria è una metodica ottica di analisi che permette di determinare, in qualità di parametro sia aspecifico che specifico, il livello di torbidità di un liquido sfruttando l'assorbimento e la riflessione di raggi luminosi di determinata lunghezza d'onda. La turbidimetria viene proficuamente applicata quando la dimensione delle particelle che provocano torbidità è dell'ordine o superiore al micrometro, condizione nella quale l'assorbimento prevale sulla diffusione.

L'intensità luminosa di un raggio che attraversa un fluido torbido (senza deviare dalla sua direzione) subisce un progressivo indebolimento, che può essere espresso mediante una funzione esponenziale :

$$I_u = I_i \cdot 10^{-ad}$$

**I<sub>u</sub>** è l'intensità luminosa uscente dal fluido,  
**I<sub>i</sub>** è l'intensità luminosa entrante nel fluido,  
**d** è la distanza percorsa dal raggio luminoso,  
**a** è il coefficiente di assorbimento.

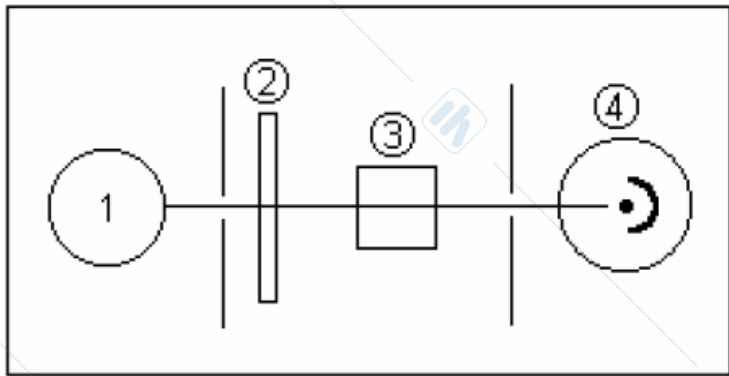
Come si vede quando la torbidità è nulla o quando il percorso del raggio luminoso nel fluido è molto breve, risulta **I<sub>u</sub> = I<sub>i</sub>**.

Data una determinata distanza **d** (prefissata costruttivamente nel turbidimetro), con la massima torbidità, cioè con il massimo valore di **a**, si ottiene la minima intensità **I<sub>u</sub>** in uscita.

# Misura di assorbimento della luce;

Rapporto tra assorbimento e concentrazione della sostanza in sospensione che segue abbastanza bene la legge di Lambert-Beer;

Uso di un fotometro o spettrofotometro



1. sorgente continua
2. monocromatore (a filtri o a reticolo)
3. cuvetta (cella porta campione)
4. rivelatore (fototubo)

Metodo non particolarmente preciso ed accurato;  
applicato quando si preferisce avere una misura rapida piuttosto che una più lenta anche se più precisa.

# Fattori influenzanti la misura turbidimetrica

Le misure di torbidità sono influenzate, oltre che dalla concentrazione delle sostanze sospese, da vari fattori, come:

1. la granulometria, ossia la grandezza delle particelle;
2. la lunghezza d'onda della luce incidente;
3. il colore e la forma delle particelle;
4. il colore del liquido;
5. l'indice di rifrazione delle particelle e del liquido;
6. il peso specifico delle particelle;

nonché da caratteristiche strumentali, come:

1. la lunghezza del percorso del raggio luminoso nel liquido in esame;
2. la caratteristica spettrale di emissione della sorgente luminosa;
3. la caratteristica spettrale di sensibilità del fotodiode;
4. l'ampiezza angolare del raggio, ossia il grado di focalizzazione dell'eventuale sistema ottico.

## APPLICAZIONI DELLA TURBIDIMETRIA

L'assorbimento di radiazione dovuto a torbidità, per concentrazioni minori a  $10^{-5}$  M, segue la legge di Lambert-Beer. Il classico coefficiente di estinzione viene in questo caso sostituito da un altro coefficiente che tiene conto dei fattori che influenzano la misura turbidimetrica, legati al liquido alle particelle sospese.

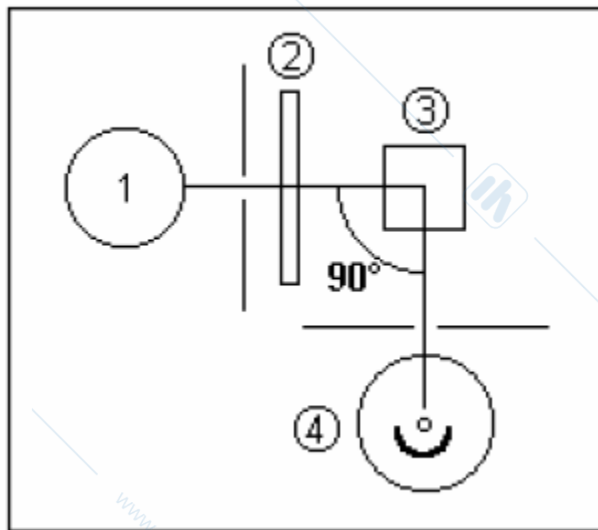
Inoltre bisogna tenere conto che già al valore di concentrazione  $10^{-5}$  M possono cominciarsi ad avere perdite di sensibilità e linearità.

La turbidimetria viene sfruttata in ambito chimico per effettuare determinazioni di anioni quali  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  dopo avere sfruttato la formazione del loro composto insolubile con il bario. In chimica clinica determinazioni turbidimetriche riguardano il fibrinogeno, le proteine sieriche ed urinarie, enzimi quali l'amilasi e il lisozima.

Per garantire elevata riproducibilità è necessario stabilizzare la sospensione mediante l'aggiunta di colloidii protettori o sostanze quali la glicerina o il glicoletilenico, che agiscono sia aumentando la densità e viscosità della fase liquida sia influenzando le interazioni elettrostatiche.

# Nefelometria

Misura della diffusione della luce dalla sospensione in una direzione a  $90^\circ$  rispetto a quella della radiazione incidente (fotometri o spettrofotometri):



1. sorgente continua
2. monocromatore (a filtri o a reticolo)
3. cuvetta
4. rivelatore (fototubo o fotomoltiplicatore)

**presenta elevati livelli di sensibilità e, opportunamente standardizzata, può essere anche molto precisa;**

**si applica la legge di Rayleigh**

$$I = k \cdot \frac{N \cdot V^2}{r^2 \cdot \lambda^4} \cdot I_0$$

I = intensità luce diffusa

$I_0$  = intensità luce incidente

$\lambda$  = lunghezza d'onda della luce

N = numero particelle disperdenti per unità di volume

V = volume delle particelle

r = distanza del rivelatore dalla cuvetta

k = costante

Operando ad una lunghezza d'onda fissa e con dimensioni delle particelle e luce incidente costanti, l'equazione precedente diventa:

$$I = K \times N$$

quindi l'intensità della luce dispersa diventa funzione lineare della quantità di particelle in sospensione;

per valori di concentrazione superiori ad un certo limite, la radiazione luminosa inizierebbe ad essere assorbita, per cui si perderebbe la linearità tra intensità di luce diffusa e concentrazione delle particelle in sospensione; metodo preciso, ma condizionato da fattori quali pH, forza ionica, presenza di sostanze interferenti.

## Applicazioni NEFELOMETRIA

Gli studi nefelometrici occupano una posizione molto importante nei laboratori clinici. Le applicazioni vanno dalla determinazione di immunoglobuline e proteine di fase acuta, complemento e coagulazione.

### Rilevazione di immunocomplessi

Quando un campione biologico contiene un antigene di interesse, viene miscelato (in una soluzione tampone) con un anticorpo per formare un complesso immunitario.

La nefelometria misura la quantità di luce che viene dispersa dalla reazione antigene-anticorpo (Ag-Ac), e in questo modo vengono rilevati i complessi immunitari.

Questo studio può essere effettuato con due metodi:

### Nefelometria del punto finale:

Questa tecnica può essere utilizzata per l'analisi del punto finale, in cui l'anticorpo del campione biologico studiato viene incubato per ventiquattro ore.

Il complesso Ag-Ac viene misurato utilizzando un nefelometro e la quantità di luce diffusa viene confrontata con la stessa misurazione eseguita prima della formazione del complesso.

## Nefelometria cinetica

In questo metodo, il tasso di formazione dei complessi viene monitorato continuamente. La velocità di reazione dipende dalla concentrazione dell'antigene nel campione. Qui le misure sono prese in funzione del tempo, quindi la prima misurazione viene eseguita al momento "zero" ( $t = 0$ ).

La nefelometria cinetica è la tecnica più utilizzata, poiché lo studio può essere eseguito in 1 ora, rispetto al lungo periodo di tempo del metodo endpoint. Il rapporto di dispersione viene misurato subito dopo l'aggiunta del reagente.

Pertanto, finché il reagente è costante, la quantità di antigene presente è considerata direttamente proporzionale alla velocità di cambiamento