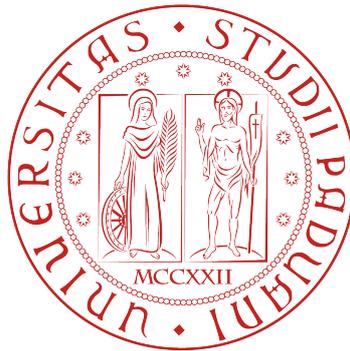


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI INGEGNERIA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE



TESI DI LAUREA

**ESPERIMENTI PER LA MISURA DI CAMPI ELETTRICI
IN CERVELLO DI RATTO**

RELATORE:

Prof. Ing. Alfredo Ruggeri

CORRELATORE:

Dott. Ing Elisabetta Sieni

CANDIDATA:

Azzurra Carlon

- ANNO ACCADEMICO 2009/2010 -

A Davide,

"Il più bello dei nostri mari è quello che non navigammo.

Il più bello dei nostri figli non è ancora cresciuto.

I più belli dei nostri giorni non li abbiamo ancora vissuti.

E quello che vorrei dirti di più bello,

non te l'ho ancora detto."

[N. Hikmet]

RINGRAZIAMENTI

I ringraziamenti non sono sicuramente il mio forte. Con questo lavoro di tesi si chiudono tre anni ricchi di emozioni. Questi tre anni di carriera universitaria mi hanno insegnato molto sotto il profilo intellettuale e umano. Ho imparato che per realizzare un buon lavoro ci vuole tantissimo sacrificio. Ho imparato che la determinazione, la volontà e la perseveranza non sono mai abbastanza ma che, soprattutto, ci vuole tantissima passione. Ho imparato a non demoralizzarmi mai di fronte alle difficoltà. Ho imparato che fare ricerca è un lavoro duro quanto appagante. Questo lavoro di tesi mi ha appassionato. Mi ha coinvolto sotto ogni aspetto perchè per la prima volta ho partecipato nella realizzazione di qualcosa di nuovo e unico. Per la prima volta mi sono sentita utile. Mi sono sentita un piccolo anello di una catena che spero potrà allungarsi molto. Per la prima volta ho fatto ciò che vorrei fare nella mia vita: l'ingegnere.

Ringrazio, innanzitutto, il Prof. Alfredo Ruggeri e il Prof. Stefano Vassanelli che mi hanno dato l'opportunità di lavorare a questa tesi e che hanno sempre mostrato grande disponibilità nei miei confronti. Un ringraziamento particolare va alla Dott. Ing. Elisabetta Sieni che mi ha affiancato in questa nuova esperienza mettendomi a disposizione tutta la sua esperienza e la sua competenza in materia e che, con molta disponibilità e pazienza, mi ha seguito durante questo lungo percorso. Ringrazio di cuore i ricercatori del Dipartimento di Fisiologia che hanno messo a mia disposizione il laboratorio e tutta la strumentazione necessaria per realizzare gli esperimenti e ringrazio in modo particolare il Dott. Stefano Girardi per avermi aiutato durante la preparazione delle prove e per avermi insegnato molte cose.

Ringrazio tutti compagni di avventura/disavventura con cui ho condiviso le gioie e i drammi di ogni singola giornata vissuta da pendolare e i compagni di corso con cui ho coltivato un'ottimo feeling intellettuale e che hanno sempre dimostrato grande stima e rispetto nei miei confronti.

Ringrazio la mia famiglia che mi ha supportato ma, soprattutto, sopportato durante questi anni di studio, che hanno reso possibile che io potessi intraprendere una carriera universitaria, che mi ha insegnato che vale sempre la pena di lavorare sodo e che spero di non aver mai deluso.

Ringrazio, infine, il mio ragazzo Davide: Tu hai sempre creduto in me. Tu mi ha sempre dato la forza. Tu solamente non mi hai mai abbandonato. Tu sei sempre stato il mio esempio. Tu mi hai reso la persona che ho sempre voluto essere. Grazie di amarmi...sempre...

Indice

1. Introduzione	1
2. Sorgente di segnali e sistema di misura: concetti base	2
2.1. Introduzione	2
2.2. Architettura di un sistema per misure biomediche	3
2.2.1. La sorgente	3
2.2.2. Il sensore	4
2.2.3. La manipolazione del segnale	4
2.2.4. La visualizzazione	4
2.2.5. I dispositivi ausiliari	5
2.3. Descrizione funzionale di un sistema di misura	5
2.3.1. Le tecniche di compensazione	6
2.3.2. L'errore di interconnessione	7
3. Elettrodi per biopotenziali	9
3.1. Introduzione	9
3.2. L'interfaccia elettrodo-elettrolita	9
3.3. Elettrodi polarizzabili e non polarizzabili	11
3.3.1. L'elettrodo ad argento/cloruro d'argento	12
3.4. Comportamento elettrico degli elettrodi e circuito elettrico equivalente	14
3.5. Microelettrodi	15
3.5.1. Microelettrodi metallici	15
3.5.1.1. Proprietà elettriche dei microelettrodi metallici	16
3.5.2. Micropipette	18
3.5.2.1. Proprietà elettriche delle micropipette	18
4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale	21
4.1. Introduzione	21

Indice

4.2. Sistema di misura	21
4.2.1. Misure in alta frequenza	22
4.2.2. Il sensore	24
4.2.2.1. Scelta dell'elettrodo	24
4.2.2.2. Caratterizzazione dell'elettrodo	29
4.2.2.3. Funzione di trasferimento	40
4.3. Risultati delle misure effettuate sul ratto	46
5. Conclusioni	56
Bibliografia	59
A. Appendice	61

Elenco delle figure

2.1. Sorgente di segnali e sistema di misura: schema a blocchi	2
2.2. Architettura di un sistema di misura: schema a blocchi	3
2.3. Descrizione funzionale di un sistema di misura: schema a blocchi . . .	5
3.1. Struttura di un elettrodo in argento/cloruro d'argento	12
3.2. Circuito elettrico equivalente dell'elettrodo per potenziali biologici a contatto con l'elettrolita	14
3.3. Struttura di un microelettrodo metallico	15
3.4. Microelettrodo metallico con la punta inserita all'interno della cellula, che mostra l'origine della capacità distribuita.	16
3.5. Microelettrodo metallico: circuito elettrico equivalente	17
3.6. Micropipetta di vetro con la punta inserita all'interno della cellula, che mostra l'origine della capacità distribuita	19
3.7. Micropipetta di vetro: circuito elettrico equivalente	19
4.1. Architettura del sistema di misura per le misure di potenziale nel tessuto cerebrale	22
4.2. Schema per sonde compensate	23
4.3. Misure mediante impedenziometro per diversi tipi di elettrodi	25
4.4. Misure eseguite con l'impedenziometro: Resistenza (a) e Capacità (b) .	26
4.5. Misure eseguite con l'impedenziometro: Modulo (a) e Fase (b) dell'im- pedenza	27
4.6. Misure eseguite mediante impedenziometro: Impedenza capacitiva . . .	28
4.7. Schema del sistema di misura utilizzato per la caratterizzazione della micropipetta	29
4.8. Circuito elettrico equivalente del sistema di misura utilizzato per la caratterizzazione della micropipetta	31
4.9. Impedenza di una micropipetta in vetro: parte reale (a) e parte immaginaria (b)	32

Elenco delle figure

4.10. Impedenza di una micropipetta in vetro: modulo (a) e fase (b)	33
4.11. Impedenza di una micropipetta in vetro: impedenza resistiva (a) e impedenza capacitiva (b)	33
4.12. Impedenza di una micropipetta in vetro: capacità	34
4.13. Impedenza alla frequenza di 4MHz di una micropipetta con o senza Sylgard® in diverse configurazioni: modulo (a) e fase (b)	35
4.14. Impedenza alla frequenza di 4MHz di una micropipetta con o senza Sylgard® in diverse configurazioni: rapporto tra tensione d'uscita e tensione d'ingresso	35
4.15. Rapporto tra tensione d'uscita e tensione d'ingresso per micropipette senza Sylgard®: valor medio e dispersione	37
4.16. Rapporto tra tensione d'uscita e tensione d'ingresso per micropipette con Sylgard®: valor medio e dispersione	38
4.17. Modulo dell'impedenza per micropipette senza (a) e con Sylgard® (b): valor medio e dispersione	39
4.18. Fase dell'impedenza per micropipette senza (a) e con Sylgard® (b): valor medio e dispersione	39
4.19. Schema del sistema di misura per la simulazione della prova su tessuto cerebrale	40
4.20. Schema elettrico equivalente della prova di simulazione	41
4.21. Valori della tensione d'ingresso ottenuti tramite l'utilizzo della funzione di trasferimento ricavata tramite valor medio e di quella ricavata dalla micropipetta stessa	42
4.22. Schema elettrico equivalente per il calcolo delle impedenze degli elet- trodi metallici e dell'agar	43
4.23. Circuito elettrico equivalente del sistema di misura per la prova di simulazione	44
4.24. Valori della tensione d'ingresso misurata in funzione della profondità per elettrodi metallici di sezioni differenti	45
4.25. Tensione misurata V_{out}^* e tensione ricostruita V_{in}^* nel punto 1	47
4.26. Tensione misurata V_{out}^* e tensione ricostruita V_{in}^* nel punto 2	48
4.27. Tensione misurata V_{out}^* e tensione ricostruita V_{in}^* nel punto 3	49
4.28. Tensione misurata V_{out}^* e tensione ricostruita V_{in}^* nel punto 1	50
4.29. Tensione misurata V_{out}^* e tensione ricostruita V_{in}^* nel punto 2	51
4.30. Tensione misurata V_{out}^* e tensione ricostruita V_{in}^* nel punto 3	52
4.31. Ratto posizionato nel sistema stereotassico	54

Elenco delle figure

4.32. Modello di calcolo a elementi finiti del cranio di ratto: veduta anteriore completa con tutti i tessuti (a) e veduta posteriore solamente dell'osso (b) 55

Elenco delle tabelle

4.1. Dati raccolti sul ratto n°1 nel punto 1	47
4.2. Dati raccolti sul ratto n°1 nel punto 2	48
4.3. Dati raccolti sul ratto n°1 nel punto 3	49
4.4. Dati raccolti sul ratto n°2 nel punto 1	50
4.5. Dati raccolti sul ratto n°2 nel punto 2	51
4.6. Dati raccolti sul ratto n°2 nel punto 3	52
4.7. Tensioni ricostruite V_{in}^* nel ratto n°1 nei diversi punti	53
4.8. Tensioni ricostruite V_{in}^* nel ratto n°2 nei diversi punti	53
A.1. Misure eseguite con l'impedenziometro per l'elettrodo metallico bipolare e unipolare: Resistenza e Capacità	61
A.2. Misure eseguite tramite l'impedenziometro per micropipetta di vetro senza e con Sylgard®: Resistenza e Capacità	62
A.3. Misure eseguite tramite l'impedenziometro per microelettrodo metallico bipolare: Modulo e Fase	63
A.4. Misure eseguite tramite l'impedenziometro per microelettrodo metallico unipolare: Modulo e Fase	63
A.5. Misure eseguite tramite l'impedenziometro per micropipetta di vetro senza Sylgard®: Modulo e Fase	64
A.6. Misure eseguite tramite l'impedenziometro per micropipetta di vetro con Sylgard®: Modulo e Fase	64
A.7. Prove di caratterizzazione di una micropipetta di vetro senza Sylgard® senza piano di massa	65
A.8. Prove di caratterizzazione di una micropipetta di vetro senza Sylgard® con piano di massa	66
A.9. Prove di caratterizzazione di una micropipetta di vetro con Sylgard® senza piano di massa	67
A.10. Prove di caratterizzazione di una micropipetta di vetro con Sylgard® con piano di massa	68

Elenco delle tabelle

A.11. Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta senza Sylgard® n°1	69
A.12. Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta senza Sylgard® n°2	70
A.13. Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta senza Sylgard® n°3	71
A.14. Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta senza Sylgard® n°4	72
A.15. Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta senza Sylgard® n°5	73
A.16. Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta senza Sylgard® n°6	74
A.17. Prove di ripetibilità: V_{out} / V_{in} per micropipette senza Sylgard®	75
A.18. Prove di ripetibilità per la caratterizzazione della micropipetta senza Sylgard®: valor medio dell'impedenza	76
A.19. Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta con Sylgard® n°1	77
A.20. Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta con Sylgard® n°2	78
A.21. Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta con Sylgard® n°3	79
A.22. Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta con Sylgard® n°4	80
A.23. Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta con Sylgard® n°5	81
A.24. Prove di ripetibilità: V_{out} / V_{in} per micropipette con Sylgard®	82
A.25. Prove di ripetibilità per la caratterizzazione della micropipetta con Sylgard®: valor medio dell'impedenza	83
A.26. Prova di caratterizzazione per micropipetta senza Sylgard®	84
A.27. Prova di simulazione per micropipetta senza Sylgard®	85
A.28. Variazione della tensione d'ingresso V_{in} per elettrodo metallico fino	86
A.29. Variazione della tensione d'ingresso V_{in} per elettrodo metallico spesso	87

1. Introduzione

Lo scopo di questo lavoro è validare un modello a elementi finiti che simula i campi elettrici presenti all'interno del tessuto cerebrale di ratto quando è applicata una tensione sinusoidale a 4 MHz alla scatola cranica tramite degli elettrodi. Per fare questo è necessario confrontare i risultati ottenuti con questo modello con quelli trovati mediante misura diretta *in vivo* su ratto.

L'obiettivo che si propone di raggiungere, quindi, è quello di progettare un sistema di misura per misurare la tensione presente all'interno del tessuto cerebrale di un ratto quando viene applicata una differenza di potenziale sinusoidale al cranio.

La frequenza a cui si vogliono effettuare le misure, ovvero 4 MHz, è maggiore della frequenza di funzionamento dei sistemi di acquisizione solitamente utilizzati per questa tipologia di prove e perciò sarà necessario caratterizzare la strumentazione utilizzata durante l'esperimento.

Il fatto di effettuare misure in alta frequenza introduce delle problematiche connesse alla scelta della strumentazione e, in particolare, allo studio dell'elemento di trasduzione impiegato per misurare le tensioni elettriche presenti in questo tessuto biologico.

Gran parte del lavoro è centrato sull'analisi del comportamento elettrico del sensore che si utilizzerà nella prova poichè la conoscenza del suo funzionamento sarà essenziale per la corretta interpretazione dei dati raccolti.

Dopo aver scelto la strumentazione più adatta alla tipologia di esperimento che si vuole effettuare ed aver valutato l'efficienza del metodo di misura adottato, saranno eseguite le misure *in vivo* sul ratto.

Le tensioni elettriche presenti nel tessuto cerebrale di ratto saranno ricostruite utilizzando le tensioni misurate per mezzo del sensore scelto e potranno, in seguito, essere confrontate con le tensioni ricavate mediante il modello a elementi finiti .

2. Sorgente di segnali e sistema di misura: concetti base

2.1. Introduzione

In generale, un sistema per misure di segnali biomedici [1] è formato da:

- **Sorgente di segnali (S)** che può identificarsi in una macchina, un impianto o in un organismo vivente capace di generare segnali (y) di diversa natura fisica come, ad esempio, potenziali elettrici, pressioni, temperature, concentrazioni etc. in grado, generalmente, di sollecitare un sistema M;
- **Sistema di misura (M)** tramite il quale è possibile determinare istante per istante il valore y osservando il valore assunto dalla corrispondente uscita z

come mostrato in figura 2.1.



Figura 2.1.: Sorgente di segnali e sistema di misura: schema a blocchi

Gli obiettivi di una misura di questo tipo possono essere molteplici. Uno dei principali utilizzi riguarda il *monitoraggio*, ovvero, la semplice visualizzazione dei valori assunti dai segnali (es. frequenza cardiaca su monitor) generalmente eseguita con lo scopo di seguire lo stato del sistema a livello qualitativo.

2. Sorgente di segnali e sistema di misura: concetti base

Altro obiettivo può essere quello di eseguire una *classificazione* sui dati raccolti, cioè l'individuazione della classe cui associare il segnale misurato (es. elettrocardiografo).

Ruolo importante gioca il *controllo* di un sistema retroazionato in cui un dispositivo, detto appunto, di controllo (o semplicemente controllore), in base alla misura del segnale y , è in grado di modificare gli ingressi al fine di ottenere una evoluzione desiderata delle uscite (es. pacemaker, pancreas artificiale).

Infine, lo scopo di una misura può essere quello di fornire una *analisi sperimentale* mediante la quale, misurando gli ingressi e le uscite del sistema S si è in grado di fornire una determinata relazione, o modello matematico, capace di descrivere in modo adeguato il legame ingresso-uscita.

2.2. Architettura di un sistema per misure biomediche

Esaminando più dettagliatamente un sistema per misure biomediche [1, 2] è possibile individuare diverse componenti funzionali, come mostrato in figura 2.2 .

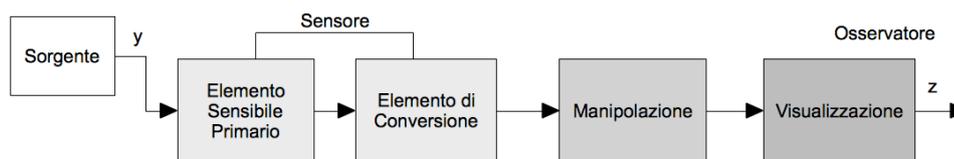


Figura 2.2.: Architettura di un sistema di misura: schema a blocchi

2.2.1. La sorgente

Innanzitutto, deve essere presente la sorgente in grado di generare il segnale da misurare, ovvero, il *misurando*. Un fattore di estrema importanza è l'accessibilità del misurando che può essere interno (es. pressione sanguigna), può essere presente sulla superficie del corpo (es. potenziale elettrocardiografico), può essere emanato dall'organismo (es. radiazione infrarossa) oppure può essere ottenuto da un campione di tessuto (es. analisi chimico-cliniche del sangue o biopsia). Nel caso della strumentazione biomedica, tipicamente il misurando rientra in una delle seguenti categorie: biopotenziali, pressioni, flussi, dimensioni (immagini), spostamenti (velocità, accelerazioni, forze), impedenze, temperature e concentrazioni chimiche.

2.2.2. Il sensore

Di seguito alla sorgente di segnale è presente un sensore in grado di trasformare il misurando in una forma (il più delle volte elettrica) utilizzabile dai blocchi successivi della catena di misura che sono solitamente di tipo elettrico-elettronico. In generale, si utilizza il termine *trasduttore* per indicare un dispositivo in grado di convertire una forma di energia in un'altra, mentre con il termine *sensore* indica prettamente la conversione di una grandezza fisica da misurare in un segnale elettrico. Quest'ultimo è generalmente costituito da un *elemento sensibile primario*, posto a contatto diretto con la grandezza a cui è sensibile e per mezzo della quale subisce una modifica delle sue proprietà fisiche, e l'*elemento di conversione*, che si occupa strettamente della conversione del segnale. I requisiti fondamentali di un buon sensore sono quelli di rispondere esclusivamente alla forma di energia presente nel misurando, essere in grado di interfacciarsi con il sistema vivente minimizzando l'energia assorbita e, possibilmente, essere minimamente invasivo.

2.2.3. La manipolazione del segnale

L'uscita del sensore è inviata ad un blocco di condizionamento (o manipolazione o elaborazione del segnale) che può includere l'amplificazione e il filtraggio del segnale, o anche un semplice adattamento dell'impedenza del sensore al dispositivo di visualizzazione. Il blocco di condizionamento può essere costituito anche da un convertitore analogico-digitale (ADC) che converte l'uscita del sensore in forma digitale ed elabora il segnale così ottenuto effettuando operazioni di filtraggio del segnale per eliminare componenti indesiderate, calcolando la media di segnali ripetuti per ridurre il rumore oppure trasformando le informazioni dal dominio del tempo al dominio delle frequenze.

2.2.4. La visualizzazione

E' presente, infine, un dispositivo di visualizzazione mediante il quale è possibile presentare il risultato del processo di misura in una forma percepibile dall'operatore umano. Nella maggior parte degli strumenti di misura viene utilizzato un dispositivo di visualizzazione, che presenta i risultati in forma numerica o grafica, discreta o continua, permanente o temporanea.

2.2.5. I dispositivi ausiliari

Sono spesso presenti, inoltre, degli elementi ausiliari quali, ad esempio, dispositivi di calibrazione che generano un segnale, detto appunto, di calibrazione con proprietà simili a quelle del misurando e lo applica in ingresso al sensore o ai primi stadi della catena di manipolazione del segnale.

Possono essere presenti degli elementi di controllo e retroazione, talora necessari per stimolare la sorgente e produrre il misurando, per regolare il sensore e il blocco di condizionamento del segnale, per dirigere il flusso di informazioni ai dispositivi di visualizzazione, memorizzazione e trasmissione.

Spesso è necessaria la presenza di elementi di memorizzazione per permettere all'operatore di esaminare i dati che precedono lo stadio di condizionamento e per applicare diverse procedure di elaborazione, e infine, di elementi di trasmissione, che utilizzando protocolli di comunicazione standard, permettono di inviare i dati acquisiti a dispositivi remoti.

2.3. Descrizione funzionale di un sistema di misura

In un sistema di misura [1, 2] si possono distinguere tre diversi tipi di ingressi, come mostrato in figura 2.3 :

- ingressi desiderati;
- ingressi indesiderati;
- ingressi modificanti.

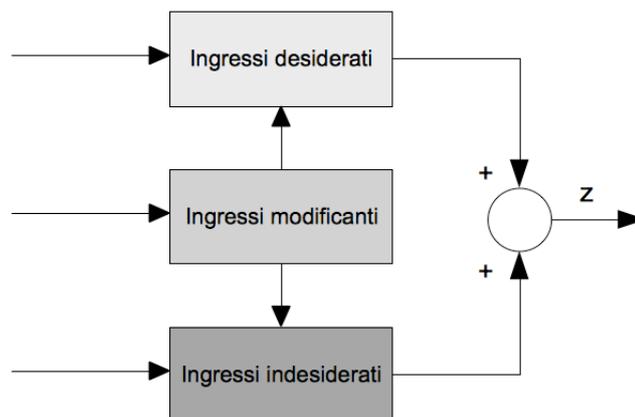


Figura 2.3.: Descrizione funzionale di un sistema di misura: schema a blocchi

2. Sorgente di segnali e sistema di misura: concetti base

Gli *ingressi desiderati* o misurandi sono le grandezze che lo strumento è specificamente progettato a misurare, ovvero il reale obiettivo della misura.

Gli *ingressi indesiderati* rappresentano altre quantità a cui lo strumento risulta accidentalmente sensibile (es. temperatura), in conseguenza al principio usato per acquisire ed elaborare gli ingressi desiderati.

Gli *ingressi modificanti*, infine, sono grandezze che influenzano indirettamente l'uscita alterando le prestazioni stesse dello strumento. Questi ultimi possono agire variando sia la relazione ingresso desiderato-uscita sia la relazione ingresso indesiderato-uscita causando spesso un effetto di deriva di sensibilità dello strumento di misura.

2.3.1. Le tecniche di compensazione

Gli effetti degli ingressi indesiderati e modificanti [1, 2] possono essere ridotti o eliminati cambiando il progetto dei componenti essenziali dello strumento di misura, oppure aggiungendo nuovi componenti preposti alla compensazione di tali effetti non graditi.

La prima soluzione è di solito quella preferibile poichè in grado di mantenere il sistema di misura, in molti casi, meno complesso ma è di fatto quella più complicata da realizzare poichè difficilmente è possibile realizzare strumenti di misura in grado di eliminare la sorgente di ingressi diversi da quelli desiderati. Pertanto il metodo di compensazione è quello più frequentemente adottato.

Insensibilità intrinseca

Se tutti i componenti che costituiscono il sistema di misura fossero intrinsecamente sensibili solamente agli ingressi desiderati, gli ingressi indesiderati e modificanti non esplicherebbero il loro effetto sulla misura che si desidera effettuare. Questo è ciò che accade con l'utilizzo, per esempio, di un involucro adiabatico in grado di rendere il sistema insensibile alla temperatura.

Retroazione negativa

Quando non è possibile evitare la presenza di ingressi modificanti, una strategia per migliorare le prestazioni del sistema di misura consiste nel rendere l'uscita meno dipendente dalla funzione di trasferimento, sostituendo al sistema a catena aperta un sistema retroazionato. La retroazione negativa preleva ad ogni istante una porzione dell'uscita e la riporta all'ingresso dello strumento. Questo segnale viene sottratto al segnale di ingresso, e la differenza tra i due segnali diventa l'effettivo ingresso del

2. Sorgente di segnali e sistema di misura: concetti base

sistema. Ovviamente questa strategia non è efficace se anche la funzione di trasferimento del blocco in retroazione è influenzata dagli ingressi modificanti. In genere, il dispositivo a retroazione trasporta meno potenza, e perciò è più accurato e lineare; inoltre lo schema in retroazione richiede minor potenza in ingresso, e pertanto si verifica minor effetto di carico. Il principale svantaggio legato all'utilizzo di questa tecnica è la possibilità che si verifichino condizioni di instabilità con conseguente generazione di oscillazioni.

Filtraggio dei segnali

Il metodo del filtraggio utilizza specifici elementi, detti filtri, in grado di separare i segnali in base al loro contenuto armonico. Nella maggior parte dei filtri, questo viene realizzato attenuando le componenti del segnale in una o più bande di frequenza. I filtri possono essere applicati all'ingresso, all'uscita o in punti intermedi dello strumento.

Tecnica degli ingressi in opposizione

Il metodo degli ingressi in opposizione consiste nell'introdurre intenzionalmente nel sistema di misura un secondo ingresso indesiderato in grado di ridurre l'influenza del primo sull'uscita. Gli input introdotti intenzionalmente possono coincidere con gli stessi segnali da cancellare. In generale, gli ingressi indesiderati inevitabili e gli ingressi aggiuntivi in opposizione possono essere diversi, purchè siano uguali le due componenti di uscita in modo tale da realizzare suddetta cancellazione.

2.3.2. L'errore di interconnessione

L'errore di interconnessione [1, 2] si realizza per mezzo del collegamento del sistema di misura M alla sorgente di segnali S, verificandosi tra questi due sistemi uno scambio di energia. Di conseguenza, il valore dell'ingresso desiderato si altera rispetto al suo stato non perturbato. Per analizzare l'entità di tale variazione causata da questo scambio di energia, è utile descrivere i sistemi di misura mediante bipoli ipotizzandoli, per semplicità, lineari. Collegando i due sistemi, la tensione tra i morsetti di uscita della sorgente S passa dal valore a vuoto y_0 al valore

$$y = \frac{R_i^M}{(R_i^M + R_u^S)} y_0 \quad (2.1)$$

2. Sorgente di segnali e sistema di misura: concetti base

in cui con R_i^M è indicata la resistenza d'ingresso del sistema di misura M e con R_u^S la resistenza d'uscita della sorgente S.

L'errore di interconnessione è dato, nel caso più generale, da:

$$\frac{y_0 - y}{y_0} = \frac{R_u^S}{R_u^S + R_i^M} = \frac{1}{1 + \frac{R_i^M}{R_u^S}} \quad (2.2)$$

da cui si deduce che l'impedenza di ingresso di M deve essere molto superiore a quella di uscita di S.

Nel caso dinamico, questo errore dipende dalla frequenza. Nel definire il massimo errore tollerabile occorre, quindi, specificare il campo di frequenze in cui tale valore limite non deve essere superato.

3. Elettrodi per biopotenziali

3.1. Introduzione

Per poter misurare e registrare potenziali [3, 2, 4], e quindi correnti, che hanno origine all'interno del corpo di un essere vivente, si rende necessaria un'interfaccia tra l'apparecchiatura elettrica di misura e il corpo stesso. Questa funzione è svolta dagli elettrodi per biopotenziali. Potrebbe sembrare, a prima vista, che si tratti di una funzione elementare da realizzare e che pertanto gli elettrodi per biopotenziali siano dispositivi relativamente semplici. In realtà, se si considera il problema più in dettaglio, è possibile rendersi conto di come l'elettrodo svolga una funzione di trasduzione vera e propria: nel corpo, infatti, la corrente è trasportata da ioni, mentre nell'elettrodo e nel filo conduttore la corrente è trasportata da elettroni. Pertanto, l'elettrodo si comporta come un trasduttore che converte una corrente ionica in una corrente elettronica.

Per effettuare misure di biopotenziali è buona norma utilizzare elettrodi quanto più stabili nel tempo (no fenomeni di "avvelenamento"), riproducibili, non interessati da fenomeni d'isteresi, facili da costruire e, se possibile, economici.

3.2. L'interfaccia elettrodo-elettrolita

Come detto precedentemente, una corrente netta che attraversa l'interfaccia, passando dall'elettrodo alla soluzione elettrolitica, con cui è possibile identificare i fluidi corporei che contengono ioni, è costituita da: elettroni nell'elettrodo che si muovono in direzione opposta rispetto a quella della corrente; cationi (C^+) nella soluzione elettrolitica che si muovono nella stessa direzione della corrente; anioni (A^-) nella soluzione

3. Elettrodi per biopotenziali

elettrolitica che si muovono in direzione opposta rispetto a quella della corrente. All'interfaccia elettrodo-elettrolita si verificano le reazioni chimiche che possono essere in generale descritte mediante le seguenti equazioni:



dove n è la valenza di C e m è la valenza di A . Si noti che nello scrivere la reazione 3.1 si sta assumendo che l'elettrodo contenga atomi dello stesso materiale dei cationi e che questo materiale nell'elettrodo (all'interfaccia con la soluzione elettrolitica) possa ossidarsi, formando un catione e uno o più elettroni liberi. Il catione viene liberato nella soluzione elettrolitica, mentre l'elettrone rimane nell'elettrodo come portatore di carica. La reazione che coinvolge gli anioni è descritta dall'equazione 3.2. In questo caso, quando un anione raggiunge l'interfaccia elettrodo-elettrolita può ossidarsi ad atomo neutro, rilasciando uno o più elettroni liberi nell'elettrodo.

Entrambe le reazioni sono reversibili. Quando la velocità delle reazioni di ossidazione uguaglia la velocità delle reazioni di riduzione, il trasferimento netto di carica è nullo e non si ha passaggio di corrente attraverso l'interfaccia elettrodo-elettrolita. Quando dominano le reazioni di ossidazione, la corrente è diretta dall'elettrodo all'elettrolita; viceversa, quando dominano le reazioni di riduzione, la corrente è in direzione opposta.

Esaminando ulteriormente nel dettaglio, si osservi ciò che accade quando un elemento metallico viene immerso in una soluzione contenente i suoi stessi ioni. Questi ioni sono cationi e la soluzione, per mantenere al suo interno la neutralità di carica, deve contenere un ugual numero di anioni. Non appena il metallo entra in contatto con la soluzione, ha immediatamente inizio la reazione descritta dall'equazione 3.1; inizialmente predominerà o la reazione di riduzione o la reazione di ossidazione a seconda della concentrazione di cationi in soluzione e delle condizioni di equilibrio per quella particolare reazione. La concentrazione locale di cationi nella soluzione in prossimità dell'interfaccia cambia e, di conseguenza, si modifica anche la concentrazione di anioni. Come risultato finale, nelle vicinanze dell'interfaccia non è più mantenuta la neutralità di carica; perciò, l'elettrolita che circonda il metallo si trova a un potenziale elettrico differente rispetto al resto della soluzione. Questa differenza di potenziale prende il nome di *potenziale di semicella* (o d'elettrodo). Il suo valore dipende dal metallo utilizzato, dalla concentrazione dei suoi ioni in soluzione, dalla temperatura

3. Elettrodi per biopotenziali

e da altri fattori secondari. In pratica, all'interfaccia metallo-elettrolita si verifica una separazione di cariche, che porta alla formazione di un doppio strato elettrico che crea suddetto potenziale elettrico tra elettrodo e soluzione. Le quantità che entrano in gioco nel doppio strato dinamico sono molto piccole e una volta raggiunto l'equilibrio il potenziale d'elettrodo, costante, si può esprimere tramite l'equazione di Nerst:

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{M^{z+}}}{a_M} \quad (3.3)$$

in cui E_0 è il potenziale standard d'elettrodo (per $a_{M^{z+}}=1$), R è la costante dei gas ($8.31 \cdot 10^7$ erg °C mole), F è la costante di Faraday (96540 C), T la temperatura, z la valenza dello ione e a l'attività ionica. Per l'attività ionica a s'intende la disponibilità dello ione ad entrare nella reazione e può essere espressa dalla seguente equazione:

$$a = \gamma c \quad (3.4)$$

con γ *coefficiente di attività* e c la concentrazione. Per soluzioni infinitamente diluite si assume $\gamma = 1$ e $a = c$; per metalli puri $a = 1$ ($a_M = 1$).

Non è possibile misurare il valore del potenziale standard di semicella E_0 di un singolo elettrodo, in quanto la connessione tra la soluzione elettrolitica e il terminale dell'apparato di misura richiede necessariamente l'uso di un secondo elettrodo, il quale, a sua volta, è caratterizzato da un proprio potenziale di semicella. Pertanto è possibile misurare soltanto la differenza tra il potenziale di semicella del metallo e quello di un secondo elettrodo. Si utilizza, quindi, una convenzione standard secondo la quale si assume nullo il potenziale di semicella di un particolare elettrodo, ovvero, l'elettrodo a idrogeno. E' quindi possibile misurare il potenziale di semicella di qualsiasi altro elettrodo rispetto questo elettrodo di riferimento.

3.3. Elettrodi polarizzabili e non polarizzabili

Esistono teoricamente due tipi di elettrodi [2, 4]: quelli che sono perfettamente polarizzabili e quelli che sono perfettamente non polarizzabili. Questo tipo di classificazione è dovuta a ciò che accade quando una corrente passa tra l'elettrodo e l'elettrolita.

Sono definiti *elettrodi perfettamente polarizzabili* quegli elettrodi in cui nessuna carica reale attraversa l'interfaccia elettrodo-elettrolita quando viene applicata una corrente. Ovviamente, ci deve essere corrente attraverso l'interfaccia, ma questa è una

3. Elettrodi per biopotenziali

corrente di spostamento e l'elettrodo si comporta come un condensatore. Sono invece definiti *elettrodi perfettamente non polarizzabili* quegli elettrodi in cui la corrente attraversa liberamente l'interfaccia elettrodo-elettrolita, senza richiedere dispendio di energia perchè il passaggio avvenga.

3.3.1. L'elettrodo ad argento/cloruro d'argento

L'elettrodo ad argento/cloruro d'argento ($Ag/AgCl$) è un elettrodo reale che approssima le caratteristiche di un elettrodo perfettamente non polarizzabile e può essere facilmente realizzato in laboratorio. Esso appartiene a una classe di elettrodi costituiti da un metallo rivestito da uno strato di un composto ionico (caratterizzato da scarsa solubilità) dello stesso metallo con un anione idoneo. L'intera struttura è immersa in un elettrolita che contiene l'anione in concentrazioni piuttosto elevate. La struttura è mostrata in figura 3.1.

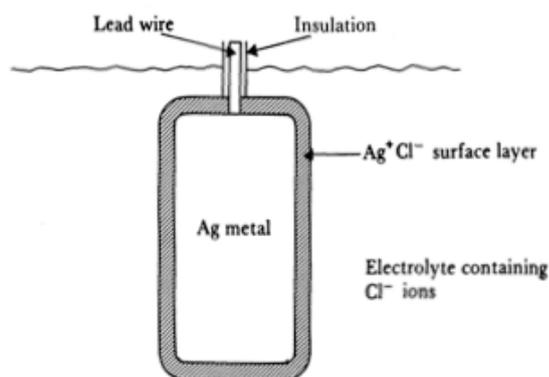


Figura 3.1.: Struttura di un elettrodo in argento/cloruro d'argento

Un supporto di argento, connesso a un cavo conduttore isolato, è ricoperto da uno strato del composto ionico $AgCl$ (scarsamente solubile in acqua e, quindi, stabile). L'elettrodo viene poi immerso in un bagno elettrolitico nel quale l'anione principale dell'elettrolita è Cl^- , come accade spesso per i fluidi biologici. Il comportamento dell'elettrodo ad $Ag/AgCl$ è regolato da due reazioni chimiche:



3. Elettrodi per biopotenziali

La reazione espressa dall'equazione 3.5 implica l'ossidazione degli atomi di argento sulla superficie dell'elettrodo a ioni argento nella soluzione a livello dell'interfaccia. La reazione espressa dall'equazione 3.14 avviene immediatamente dopo la formazione degli ioni Ag^+ . Tali ioni si combinano con gli ioni Cl^- già in soluzione per formare il composto ionico $AgCl$ che, essendo scarsamente solubile in acqua, precipita dalla soluzione sull'elettrodo di argento e contribuisce al deposito di cloruro d'argento. La velocità con cui il cloruro d'argento precipita e torna in soluzione è una costante, K_s ($1.78 \cdot 10^{-10}$ a $25^\circ C$), *prodotto di solubilità*, che può essere espresso anche mediante la seguente equazione:

$$a_{Ag^+} \times a_{Cl^-} = K_s \quad (3.7)$$

in cui a_{Ag^+} e a_{Cl^-} sono, rispettivamente, le attività ioniche degli ioni Ag^+ e Cl^- .

Nei fluidi biologici la concentrazione degli ioni Cl^- è piuttosto alta che implica una corrispondente attività ionica appena minore dell'unità. Tenendo conto che il prodotto di solubilità di $AgCl$ è dell'ordine di 10^{-10} , quando un elettrodo $Ag/AgCl$ è posto in contatto con fluidi biologici, l'attività dello ione Ag^+ dovrà essere molto bassa e dello stesso ordine di grandezza del prodotto di solubilità.

E' possibile determinare il potenziale di semicella per l'elettrodo $Ag/AgCl$ riscrivendo l'equazione 3.3:

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln a_{M^{z+}} = E_0^{Ag} + \frac{RT}{F} \ln a_{Ag^+} \quad (3.8)$$

$$E = E_0^{Ag} + \frac{RT}{F} \ln \frac{K_s}{a_{Cl^-}} \quad (3.9)$$

$$E = E_0^{Ag} + \frac{RT}{F} \ln K_s - \frac{RT}{F} \ln a_{Cl^-} = k_1 + k_2 \ln a_{Cl^-} = 0.2224 - 0.02569 \ln a_{Cl^-} \quad (3.10)$$

Come già detto, nei fluidi biologici si trova lo ione Cl^- in elevata concentrazione, quindi è lecito assumere $a_{Cl^-} \approx 1$. Di conseguenza, il potenziale d'elettrodo si riduce a

$$E \cong k_1 \quad (3.11)$$

da cui è possibile dedurre che l'elettrodo $Ag/AgCl$ risulta essere piuttosto stabile

e riproducibile.

3.4. Comportamento elettrico degli elettrodi e circuito elettrico equivalente

La caratteristica tensione-corrente dell'interfaccia elettrodo-elettrolita è solitamente non lineare e di conseguenza il comportamento degli elettrodi deve essere rappresentato con un modello con elementi non lineari [2, 3]. Nel dettaglio, le caratteristiche di un elettrodo sono dipendenti dalla corrente che lo attraversa, ovvero dalla sua densità, dalla sua forma d'onda e, nel caso di correnti sinusoidali, anche dalla frequenza.

Per ingressi sinusoidali, la relazione ingresso-uscita dell'elettrodo mostra sia un termine resistivo sia un termine reattivo. Il comportamento può essere rappresentato attraverso un circuito composto da un termine resistivo in serie al parallelo di un ulteriore termine resistivo e di uno capacitivo. La presenza di quest'ultimo è giustificata dal fatto che il potenziale di semicella descritto in precedenza è generato dalla distribuzione a doppio strato delle cariche ioniche all'interfaccia elettrodo-elettrolita.

Il circuito equivalente è mostrato in figura 3.2. Il comportamento di suddetti termini resistivi e reattivi dipende dalla frequenza e dalla densità di carica. La capacità C_d rappresenta la capacità dovuta al doppio strato di carica all'interfaccia elettrodo-elettrolita. La resistenza R_d , in parallelo alla capacità C_d , rappresenta la resistenza di leakage attraverso questo doppio strato di carica. I valori di resistenza e capacità nel circuito equivalente sono determinati dalle proprietà dell'elettrodo (materiali e geometria) e, in grado minore, dalle proprietà dell'elettrolita.

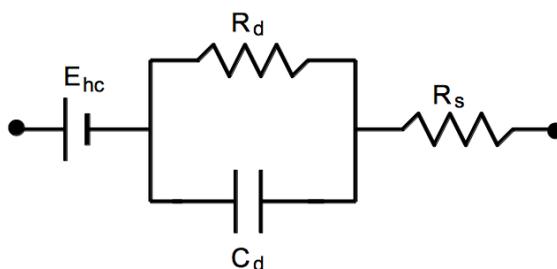


Figura 3.2.: Circuito elettrico equivalente dell'elettrodo per potenziali biologici a contatto con l'elettrolita

3. Elettrodi per biopotenziali

L'impedenza del circuito equivalente dell'elettrodo mostrato in figura 3.2 è dipendente dalla frequenza. A basse frequenze, $\frac{1}{\omega C_d} \gg R_d$ e l'impedenza tende ad un valore costante pari a $R_s + R_d$; per frequenze elevate, $\frac{1}{\omega C_d} \ll R_d$ e l'impedenza tende al valore costante R_s . Per frequenze intermedie tra questi due estremi, l'impedenza è funzione della frequenza. E_{hc} , infine, è il potenziale di semicella già a lungo discusso.

3.5. Microelettrodi

Per poter misurare differenze di potenziale attraverso tessuti composti da cellule eccitabili, si devono utilizzare elettrodi di dimensioni molto ridotte. Gli elettrodi che soddisfano queste esigenze sono detti *microelettrodi* [5, 6, 2]. Hanno un diametro della punta che va da 0.05 a 10 μm circa e possono essere di vario tipo; gli elettrodi usati più comunemente sono microelettrodi realizzati con aghi di metallo e micropipette di vetro il cui interno è riempito di soluzione elettrolitica. E' da notare che le caratteristiche elettriche dei microelettrodi metallici e delle micropipette non sono del tutto simili e, per tale ragione, sono spesso usati per scopi differenti. Entrambi sono caratterizzati da un'impedenza molto elevata. Il microelettrodo metallico, simile a un condensatore a perdita elettrolitica, possiede un'impedenza alle basse frequenze molto elevata e un'impedenza alle alte frequenze molto piccola. La micropipetta, invece, possiede un'alta impedenza di carattere resistivo.

3.5.1. Microelettrodi metallici

Un microelettrodo metallico, come mostrato in figura 3.3, è essenzialmente un sottile e robusto ago metallico, isolato elettricamente fino alla punta da un supporto materiale isolante.

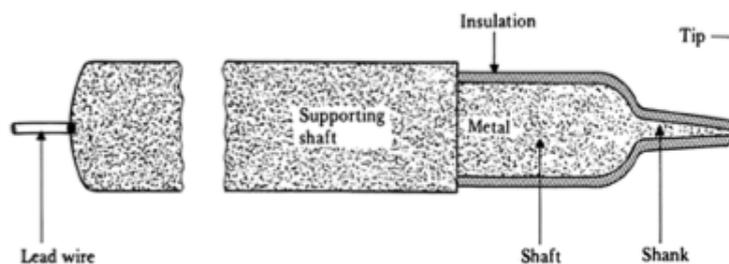


Figura 3.3.: Struttura di un microelettrodo metallico

3. Elettrodi per biopotenziali

L'ago metallico viene realizzato tramite un'incisione elettrolitica, usando una cella elettrochimica in cui l'ago metallico è l'anodo. La corrente elettrica incide l'ago mentre viene lentamente rimosso dalla soluzione elettrolitica. Si possono formare in questo modo punte molto sottili, ma bisogna avere molta pazienza e pratica per costruirli. Per la sua notevole robustezza, per la costruzione di questo tipo di elettrodi viene spesso impiegato un composto di carburo di tungsteno.

3.5.1.1. Proprietà elettriche dei microelettrodi metallici

Per comprendere il comportamento elettrico dei microelettrodi metallici, è necessario ricavare un circuito elettrico equivalente partendo da considerazioni fisiche.

E' possibile assimilare il microelettrodo metallico ad un elemento resistivo R_s dovuto alla resistenza del metallo stesso. Il principale contributo a questa resistenza deriva dalla sezione della punta metallica del microelettrodo, poichè il rapporto tra la lunghezza e l'area della sezione è molto maggiore in questa parte che non nel tronco.

Il metallo viene interamente ricoperto con un materiale isolante, eccetto che sulla punta distale, in modo che si generi una capacità tra il metallo e il fluido presente esternamente. Questa è una capacità distribuita C_d , mostrata in figura 3.4, che è possibile rappresentare a parametri concentrati separando il contributo della parte finale e quello del tronco.

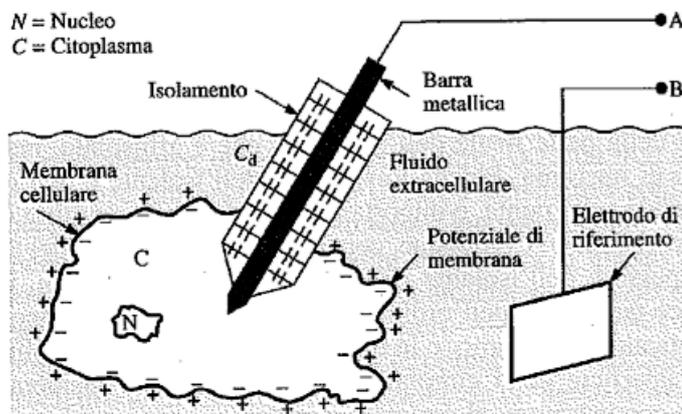


Figura 3.4.: Microelettrodo metallico con la punta inserita all'interno della cellula, che mostra l'origine della capacità distribuita.

Nella sua parte finale, possiamo considerare il microelettrodo come un condensatore cilindrico coassiale; la capacità per unità di lunghezza ($\frac{F}{m}$) C_{d1} è data da:

3. Elettrodi per biopotenziali

$$\frac{C_{d1}}{L} = \frac{2\pi\epsilon_r\epsilon_0}{\ln D/d} \quad (3.12)$$

dove ϵ_0 è la costante dielettrica dello spazio libero, ϵ_r è la costante dielettrica relativa al materiale isolante, D è il diametro del cilindro costituito dall'elettrodo più lo strato isolante, d il diametro dell'elettrodo e L la lunghezza della parte finale. Considerando la porzione del tronco dell'elettrodo metallico, sapendo che lo spessore dell'isolante risulta solitamente costante ed è nell'ordine di circa $1 \mu\text{m}$ e che il diametro del tronco può essere nell'ordine di alcuni mm, è possibile assumere che il rapporto tra questi due diametri sia unitario. In questo modo possiamo semplificare il calcolo scartando la superficie della circonferenza del tronco e considerando il sistema come fosse un condensatore ad armature parallele di area uguale a quella della superficie della circonferenza e distanza t , uguale allo spessore dello strato isolante. La capacità per unità di lunghezza ($\frac{F}{m}$) C_{d2} è data da

$$\frac{C_{d2}}{L} = \frac{\epsilon_r\epsilon_0\pi d}{t}. \quad (3.13)$$

Si noti che questa capacità deriva solo da quella parte del tronco dell'elettrodo immersa nel mezzo conduttivo. Spesso solamente la punta finale è immersa così che C_{d2} risulta nulla.

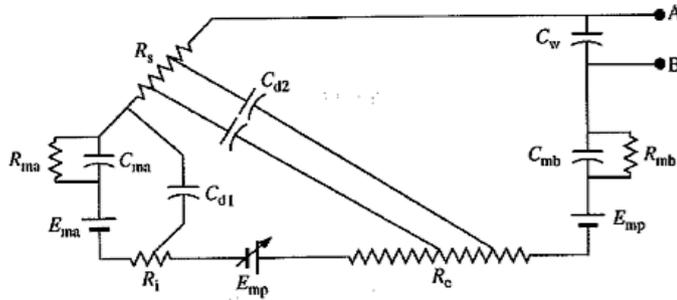


Figura 3.5.: Microelettrodo metallico: circuito elettrico equivalente

Gli altri contributi significativi al circuito equivalente del microelettrodo metallico, presentato in figura 3.5, sono costituiti dagli elementi dell'interfaccia metallo-elettrolita, R_{ma} , C_{ma} ed E_{ma} . Un insieme simile di componenti, C_{mb} , R_{mb} ed E_{mb} è associato all'elettrodo di riferimento. A causa del valore molto maggiore dell'area della superficie dell'elettrodo di riferimento rispetto alla punta del microelettrodo, l'impedenza dovuta a questi elementi risulta molto più bassa. Naturalmente il poten-

3. Elettrodi per biopotenziali

ziale di semicella non è influenzato dall'area della superficie. Vi è inoltre una capacità associata ai cavi C_w che connettono il microelettrodo e l'elettrodo di riferimento; questa è posta in parallelo ai due terminali e il cui valore dipende dalla lunghezza e dallo spazio presente tra cavi usati per connettere gli elettrodi agli strumenti di misura. R_{exc} indica la resistenza dovuta al mezzo conduttivo tra il microelettrodo metallico e l'elettrodo di riferimento.

3.5.2. Micropipette

Gli elettrodi a micropipetta vengono costruiti da tubi capillari di vetro. La porzione centrale di un pezzo di tubo capillare, viene riscaldata fino al punto di rammollimento e viene poi rapidamente stirata per produrre il restringimento. Sono disponibili sul mercato speciali dispositivi, detti *stiratori di micropipette*, che riscaldano e stirano il tubo capillare in modo uniforme e riproducibile per costruire micropipette. Le due metà della struttura capillare stirata vengono staccate a livello del restringimento per produrre la pipetta, che ha un diametro in punta dell'ordine di $1\ \mu\text{m}$. La pipetta viene poi riempita con una soluzione elettrolitica adatta allo scopo in cui viene immerso un elettrodo di Ag/AgCl che funge da terminale elettrico.

3.5.2.1. Proprietà elettriche delle micropipette

Il circuito equivalente dell'elettrodo a micropipetta, mostrato in figura 3.7, è leggermente più complicato di quello del microelettrodo metallico.

L'elettrodo interno alla micropipetta produce gli elementi dell'interfaccia metallo-elettrolita R_{ma} , C_{ma} ed E_{ma} . In serie a questi vi è un elemento resistivo R_t che corrisponde alla resistenza dell'elettrolita nella parte finale e nella punta del microelettrodo. In collegamento con questo vi è la capacità distribuita C_d , mostrata in figura 3.6, che corrisponde alla capacità attraverso il vetro in questa regione. È stata trascurata la capacità distribuita sul tronco, poiché la parete di vetro dell'elettrodo risulta molto più spessa in questo punto e il suo contributo capacitivo è molto piccolo.

Ci sono due potenziali associati alla punta del microelettrodo a micropipetta. Il *potenziale di giunzione-liquida* E_j corrisponde alla struttura della giunzione liquida tra l'elettrolita contenuto nella micropipetta e il mezzo conduttivo esterno in cui essa è inserita. Inoltre, si genera il potenziale detto *potenziale di punta* E_t , poiché la parete sottile del vetro che circonda la regione della punta della micropipetta si comporta come una membrana di vetro e ha un potenziale di membrana associato.

3. Elettrodi per biopotenziali

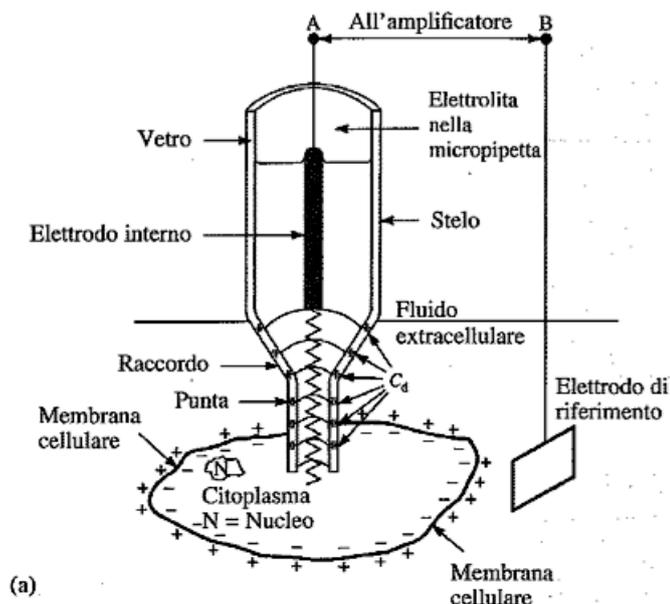


Figura 3.6.: Micropipetta di vetro con la punta inserita all'interno della cellula, che mostra l'origine della capacità distribuita

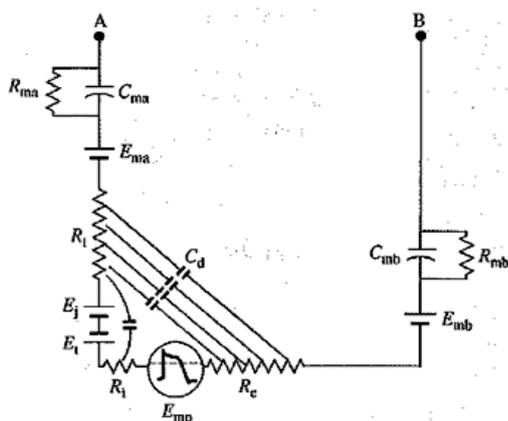


Figura 3.7.: Micropipetta di vetro: circuito elettrico equivalente

Resistenza di punta Poiché la punta della micropipetta è riempita con una soluzione elettrolitica, essa costituisce un conduttore elettrolitico caratterizzato da una sezione trasversale di area molto piccola. E' questa proprietà che dona alla micropipetta la sua elevata resistenza e non l'interfaccia elettrodo-elettrolita del tronco (che possiede una piccola impedenza se paragonato alla resistenza di punta). Inoltre, la resistenza dell'elettrolita nella porzione affusolata della micropipetta da un contributo molto

3. Elettrodi per biopotenziali

piccolo a questa resistenza. In realtà, la punta della micropipetta può essere assimilata a un conduttore di forma tronco conica caratterizzato da diametro interno della punta d , angolo ϕ (in radianti) delle pareti e resistività ρ del liquido usato per il riempimento. La resistenza di punta è quindi data da

$$R_t = \frac{4\rho}{\pi\phi d} \quad (3.14)$$

Esaminando la 3.14, si deduce che usare un elettrolita con bassa resistività e un angolo molto ripido alla punta favorisce nel mantenere bassa la resistenza, dato un certo diametro d .

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

4.1. Introduzione

In questo capitolo si presenta il sistema di misura utilizzato per effettuare misure di tensione in un tessuto biologico, analizzando nel dettaglio gli strumenti di misura impiegati e ponendo particolare attenzione alla caratterizzazione dei sensori. L'obiettivo di queste misure è quello di verificare il potenziale elettrico del cervello di un ratto in alcuni punti nel caso in cui si applichi una differenza di potenziale alla scatola cranica. La caratterizzazione della strumentazione è resa necessaria dal fatto che il segnale di tensione sinusoidale applicato alla testa del ratto ha frequenza di 4 MHz e i sensori hanno un sistema di acquisizione che funziona a frequenze inferiori. E' stato quindi necessario preparare un set-up di acquisizione con strumenti diversi adatti alla frequenza in esame. I risultati ricavati da tale indagine sperimentale saranno confrontati con quelli ottenuti tramite un modello di calcolo a elementi finiti.

4.2. Sistema di misura

Come già accennato, lo scopo è quello di effettuare delle misure su un tessuto biologico, in questo caso il tessuto cerebrale, in modo tale da verificare i potenziali elettrici in esso presenti quando è applicato un segnale di tensione sinusoidale ad alta frequenza. A tale proposito è utile elencare gli strumenti necessari per l'apparato di misura:

- *Generatore di segnale*, consente di generare forme d'onda di vario tipo di cui è possibile impostare ampiezza e frequenza;

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

- *Elettrodi per la trasmissione del segnale*, sono gli elementi che trasducono il segnale elettrico messo a disposizione dal generatore al tessuto biologico in esame;
- *Elettrodo per il prelievo del segnale*, è il sensore utilizzato per verificare i potenziali presenti all'interno del tessuto biologico;
- *Oscilloscopio*, è in grado di visualizzare l'andamento temporale del segnale elettrico e di misurarne i vari parametri.

L'architettura del sistema di misura tramite il quale si propone di effettuare questa tipologia di esperimenti è quello riportato in figura 4.1 in cui è possibile individuare la disposizione degli elementi fondamentali sopra citati.

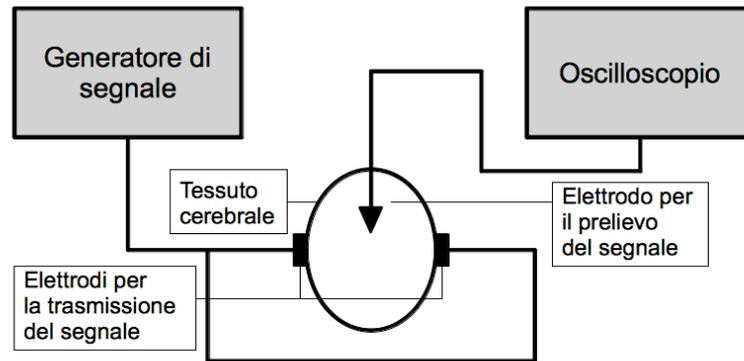


Figura 4.1.: Architettura del sistema di misura per le misure di potenziale nel tessuto cerebrale

4.2.1. Misure in alta frequenza

Questa configurazione elettrodi, generatore, oscilloscopio risulta essere abbastanza robusta nel caso in cui le misure siano effettuate a frequenze relativamente basse (nell'ordine del kHz) mentre a frequenze elevate (nell'ordine del MHz) appaiono effetti parassiti di vario genere. Le possibili cause che intervengono nella generazione di rumore e artefatti all'interno delle misure [8, 7] che si stanno effettuando riguardano l'accoppiamento capacitivo, induttivo e di campo magnetico che si generano tra due conduttori. Per tale ragione risulta necessario avvalersi di alcuni accorgimenti, in

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

particolare dell'utilizzo di cavi coassiali e di sonde compensate, ove possibile, e ridurre i tratti in cui i conduttori di massa e segnale formano loop.

Cavi coassiali

I cavi coassiali [7] sono costituiti da un singolo conduttore di rame centrale (detto *anima*), uno schermo di metallo intrecciato (detto *maglia*) e da un dielettrico, generalmente in polietilene, che garantisce l'isolamento tra i due conduttori. Il segnale si propaga sottoforma di campo elettromagnetico tra l'anima e la maglia. Questa caratteristica conferisce un'ottima immunità al rumore ed alle distorsioni bloccando le interferenze elettromagnetiche in una banda molto ampia di frequenze.

Sonde compensate

Le sonde compensate [7, 9] costituiscono un corredo indispensabile dell'oscilloscopio. Il segnale da visualizzare viene, di norma, applicato allo strumento tramite sonde, realizzate da un cavo coassiale e da un terminale BNC, che in parte risolvono i problemi causati dall'utilizzo di due conduttori distinti che, se avvolti a trecciola introducono una capacità parassita e, se tenuti lontani tra loro, costituiscono una maglia che può accoppiarsi induttivamente per ricevere o trasmettere disturbi ed interferenze. Ad alte frequenze, purtroppo, questo tipo di collegamento concorre ad abbassare l'impedenza d'ingresso. Per ovviare a questo problema si adoperano sonde attenuatrici compensate, tipicamente in modalità 10x, rappresentate in figura 4.2.

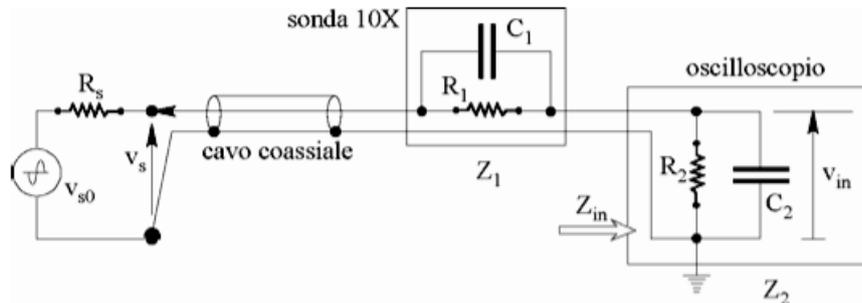


Figura 4.2.: Schema per sonde compensate

Le sonde compensate fisicamente si presentano come un cavo coassiale nel cui puntuale è presente una resistenza d'ingresso R_1 in parallelo a una C_1 , con C_1 di tipo

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

regolabile. R_1 e C_1 costituiscono con il circuito d'ingresso dell'oscilloscopio R_2C_2 un partitore in alternata che risulta compensato se $R_1C_1 = R_2C_2$. Regolando opportunamente C_1 si può ottenere questa compensazione per cui la risposta in frequenza di tutto il complesso è uniforme in un ampio range di frequenze garantendo così l'assenza di distorsioni sul segnale che si deve visualizzare. Inoltre la presenza di R_1 serie eleva l'impedenza di ingresso in totale. Utilizzando la modalità 10x, il rapporto dovuto ad R_1 ed R_2 è 10, perciò occorre moltiplicare per 10 tutte le letture relative all'asse delle ordinate dell'oscilloscopio con il notevole vantaggio di disporre di una impedenza di ingresso 10 volte più elevata.

4.2.2. Il sensore

Il sensore utilizzato per la verifica dei potenziali presenti all'interno del tessuto cerebrale rappresenta l'elemento critico di tutto l'apparato di misura e la conoscenza delle sue caratteristiche elettriche è essenziale per la comprensione e la giusta interpretazione dei dati raccolti.

4.2.2.1. Scelta dell'elettrodo

Per le misure di tensione si hanno a disposizione tre possibili tipologie di elettrodi da utilizzare all'interno del sistema di misura:

- Microelettrodo metallico bipolare,
- Microelettrodo metallico unipolare, trattato nella sottosezione 3.5.1,
- Micropipette in vetro con e senza copertura in Sylgard®, trattato nella sottosezione 3.5.2.

Di questi sensori è utile valutare come varino le impedenze, nella loro parte resistiva e capacitiva, nel modulo e nella fase, in funzione della frequenza con l'obiettivo di comprendere quale sia l'elettrodo più adatto alla tipologia di esperimenti da effettuare.

Come già esposto in precedenza, ci si propone di ottenere delle misure di potenziale ad alta frequenza. Per tale motivo è auspicabile l'utilizzo di un elettrodo caratterizzato da un'alta impedenza nel range delle frequenze di interesse in modo tale da introdurre una perturbazione di minor entità possibile all'interno del sistema in cui si effettua la misura.

Per tale verifica è possibile utilizzare un *impedenzometro*, che è un dispositivo che consente di valutare i valori di R, L e C di una qualunque impedenza o ammettenza.

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

Per mappare le caratteristiche d'impedenza di questi microelettrodi in un range esteso di frequenze risulta necessario usare due tipi di impedenzometro, per le misure alle basse ed alle alte frequenze:

- *Instek LCR Meter (0Hz - 100kHz)*,
- *Agilent 4285A Precision LCR Meter (75kHz - 30MHz)*.

I due strumenti presentano caratteristiche differenti atte a effettuare misurazioni in tali bande di frequenza.

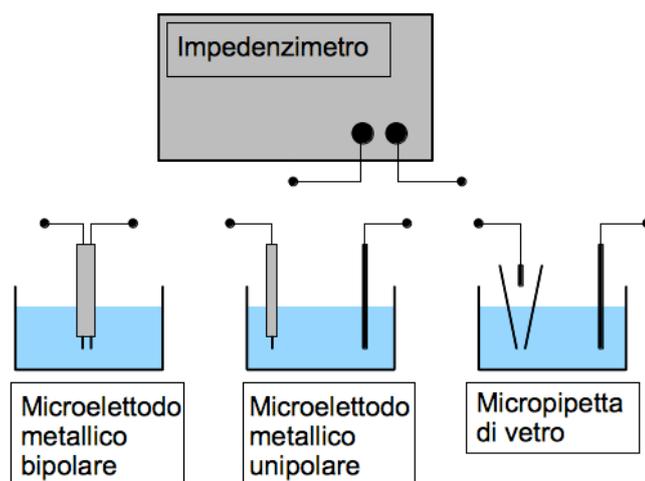


Figura 4.3.: Misure mediante impedenzometro per diversi tipi di elettrodi

La misura di impedenza si effettua immergendo le parti terminali degli elettrodi in una soluzione fisiologica e collegando i terminali dei diversi elettrodi agli ingressi dell'impedenzometro, come mostrato in figura 4.3. Nel pannello frontale dello strumento è possibile selezionare le frequenze a cui effettuare le misure e scegliere il modello di impedenza di cui si vogliono stimare i parametri tra quelli presenti (es. R e C serie o parallelo, ecc.). Nel caso degli elettrodi si è impostato il modello R_p e C_p , che fornisce in uscita i valori di resistenza e capacità dell'impedenza modellizzata come un circuito RC parallelo. Per la pipetta e l'elettrodo unipolare si è utilizzato un elettrodo di riferimento per la chiusura del circuito verso massa mentre per l'elettrodo metallico bipolare non è stato necessario fornire un elettrodo di riferimento poichè è già costituito da due puntali, uno dei quali funge da massa.

I grafici in figura 4.4 riportano, rispettivamente, l'andamento della resistenza, in figura 4.4.a, e della capacità, in figura 4.4.b, ricavate ad alcune frequenze nel range

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

tra 1 kHz e 4 MHz tramite l'utilizzo dell'impedenziometro in modalità RC parallelo per i diversi tipi di elettrodi.

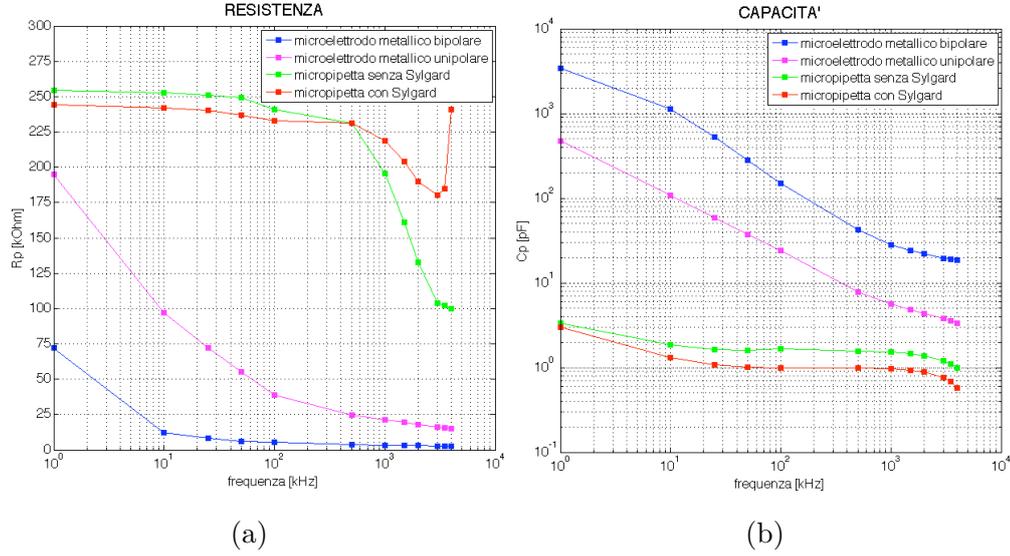


Figura 4.4.: Misure eseguite con l'impedenziometro: Resistenza (a) e Capacità (b)

E' possibile notare che l'andamento della resistenza e della capacità stimate per i microelettrodi metallici differiscono notevolmente da quelli ricavati per le micro-pipette. Si nota che per microelettrodi metallici la resistenza diminuisce in maniera graduale in funzione della frequenza mentre per le micro-pipette si mantiene pressoché costante fino a 100 kHz e poi decrescere velocemente. Per quanto riguarda, invece, la capacità, i valori alle basse frequenze presentano notevoli differenze per i diversi elettrodi. In particolare, per i microelettrodi metallici la capacità parte da valori molto elevati e diminuisce in maniera graduale in funzione della frequenza, mentre per le micro-pipette questa presenta valore quasi costante per tutte le frequenze in esame.

I grafici in figura 4.5 rappresentano, rispettivamente, modulo $|Z|$ e fase $arg(Z)$ delle impedenze calcolate e sono stati ricavati da quelli in figura 4.4 tramite le seguenti relazioni:

$$Z = \left(\frac{1}{R_p} + j\omega C_p \right)^{-1} = Re(Z) + jIm(Z) \quad \omega = 2\pi f \quad (4.1)$$

$$|Z| = \sqrt{Re(Z)^2 + Im(Z)^2} \quad arg(Z) = arctg \frac{Im(Z)}{Re(Z)}. \quad (4.2)$$

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

Il modulo dell'impedenza diminuisce in funzione della frequenza per tutte le tipologie di elettrodi. Risulta interessante notare come le micropipette in vetro presentino un'impedenza in modulo maggiore rispetto ai microelettrodi metallici e, in particolare, come la componente resistiva predomina su quella capacitiva per frequenze da 1 kHz fino a qualche decina di kHz (la fase è prossima a 0°), mentre per frequenze superiori è la parte capacitiva che prevale su quella resistiva, come si nota dalla fase che si riduce tra i -60° e -75° ¹.

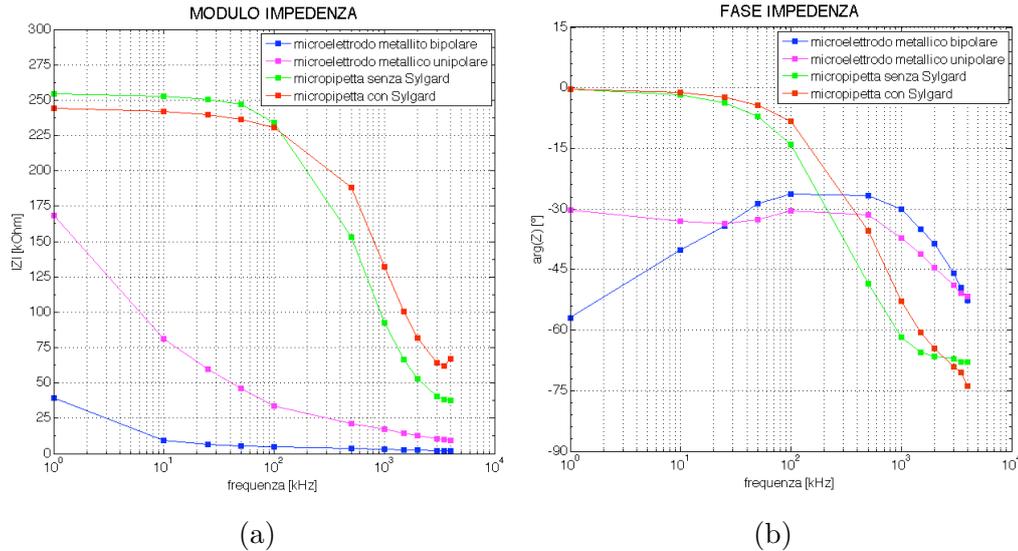


Figura 4.5.: Misure eseguite con l'impedenziometro: Modulo (a) e Fase (b) dell'impedenza

Dato l'andamento delle impedenze dei diversi elettrodi e come queste varino nei loro parametri fondamentali, si è preferito utilizzare le micropipette in vetro piuttosto che i microelettrodi metallici bipolare ed unipolare. Il principale motivo di questa scelta è legato al fatto che questi ultimi presentano un'impedenza minore alle alte frequenze. Le micropipette in vetro, inoltre, hanno il grande vantaggio di poter essere costruite *ad hoc*. E' possibile, infatti, costruire micropipette in vetro con punte di sezione desiderata ed aumentare lo spessore delle pareti isolanti a piacimento tramite la stesura di un materiale dielettrico, tipicamente Sylgard®. Il primo accorgimento è utile per variare la componente resistiva allocata nella punta che è un contributo

¹Il modello è un circuito RC parallelo e per questa ragione è opportuno ragionare utilizzando il concetto di ammettenza. La fase, quindi, descrive come cambiano i rispettivi contributi dell'ammettenza resistiva e di quella capacitiva.

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

determinante all'interno dell'impedenza di questo tipo di elettrodi. Il secondo accorgimento, invece, permette di ridurre la capacità poichè, se consideriamo la parte finale dell'elettrodo come un condensatore in cui la parete vetrosa gioca il ruolo del dielettrico tra le due armature formate dalla soluzione elettrolitica contenuta all'interno della pipetta e dal mezzo conduttivo che costituisce l'ambiente circostante, depositare un ulteriore strato isolante equivale esattamente ad allontanare le stesse armature ottenendo l'effetto desiderato, com'è possibile notare in figura 4.4.b. Quest'ultimo accorgimento permette di diminuire la capacità distribuita lungo le pareti vetrose, cioè di aumentare il contributo dell'impedenza di carattere capacitivo, presentata in figura 4.6, che normalmente andrebbe diminuendo con le alte frequenze, assicurando il passaggio della maggior parte della corrente attraverso la sua parte resistiva, cioè attraverso la punta.

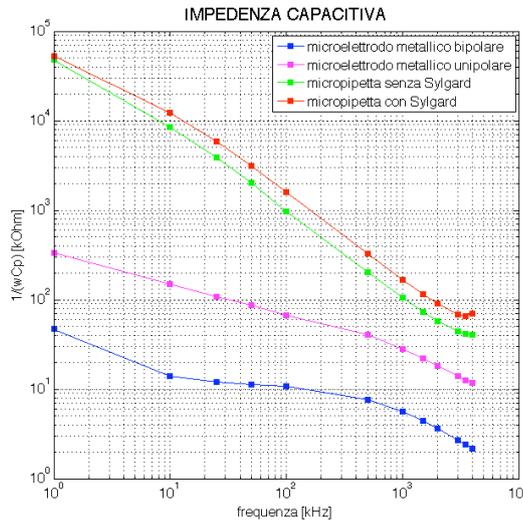


Figura 4.6.: Misure eseguite mediante impedenziometro: Impedenza capacitiva

Ridurre da un lato, l'impedenza resistiva e aumentare, dall'altro, l'impedenza capacitiva equivale a dire che la resistenza assume il contributo predominante nell'impedenza equivalente del circuito RC parallelo². Per questa ragione l'impedenza ha una dipendenza minore dall'impedenza capacitiva e, quindi, anche dalla capacità che varia in funzione della profondità. Il fatto di avere una capacità non trascurabile delle

²In questo caso è utile ancora una volta utilizzare il concetto di ammettenza. In un circuito RC parallelo l'ammettenza equivalente è la somma delle ammettenze resistiva e capacitiva. Se l'impedenza resistiva si riduce la sua ammettenza cresce. Se l'ammettenza resistiva è maggiore di quella capacitiva è assicurato il maggior passaggio di corrente attraverso la resistenza.

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

pareti della pipetta comporta, infatti, il cambiamento del valore dell'impedenza della micropipetta in funzione della profondità a cui si effettuano le misure.

Da quanto osservato, la caratterizzazione dell'elettrodo che si utilizzerà nelle prove da effettuare sul tessuto cerebrale di ratto è resa necessaria per individuare l'impedenza della pipetta alla frequenza di lavoro.

4.2.2.2. Caratterizzazione dell'elettrodo

Dalle considerazioni precedenti si è scelto di utilizzare nell'esperimento la micropipetta di vetro perchè presenta un'impedenza maggiore degli altri elettrodi e quindi perturba meno il segnale da misurare. E' ora necessario capire con maggiore dettaglio quale sia il suo comportamento in frequenza e quanto sia importante l'effetto d'integrazione sul tessuto nel quale si effettuano le verifiche. L'effetto della profondità della punta delle pipetta dalla superficie del tessuto analizzato è stato studiato mediante il set-up di misura in figura 4.7.

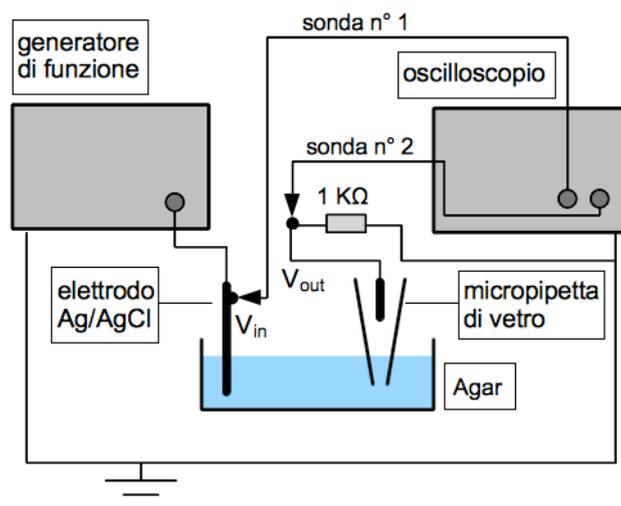


Figura 4.7.: Schema del sistema di misura utilizzato per la caratterizzazione della micropipetta

Si è presa una petri (diametro di 34 mm) con dell'agar che simuli il tessuto biologico. Si è applicata in un punto una tensione sinusoidale immergendo nella petri un elettrodo di Ag/AgCl collegato a un generatore di funzione. In questo modo si è reso l'agar equipotenziale. Utilizzando la micropipetta si è prelevato il segnale dalla petri. La tensione misurata dalla micropipetta è effettuata collegandola all'ingresso

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

di un oscilloscopio. Per valutare la corrente che attraversa la micropipetta si è posta in parallelo all'ingresso dell'oscilloscopio una resistenza da $1\text{ k}\Omega$.

Gli strumenti utilizzati in questo set-up di misura sono:

- Generatore di funzione *Agilent 33220A Function Arbitrary Waveform Generator 20MHz*;
- Oscilloscopio *Agilent 54641A Oscilloscope 350MHz 265 a/s*;
- Sonde compensate *Tektronix P222A Voltage Probe 10x / 1x, 200MHz / 6MHz, 10M Ω / 1M Ω , 16pF / 95pF*.

Per ridurre l'effetto capacitivo dell'ingresso dell'oscilloscopio quando si lavora a frequenze elevate si utilizzano le due sonde compensate: la prima viene collegata all'elettrodo di *Ag/AgCl* e la sua massa alla massa del cavo coassiale che è collegato al generatore di funzione (e quindi alla sua massa); la seconda è collegata in parallelo alla resistenza da $1\text{ k}\Omega$. Queste due sonde sono collegate, rispettivamente, al primo ed al secondo ingresso dell'oscilloscopio.

Il circuito di misura utilizzato è rappresentato in figura 4.8.

Avendo a disposizione il segnale in valore rms di tensione all'ingresso e all'uscita della micropipetta e, rispettivamente, V_{in} e V_{out} , il valore dello sfasamento tra i due segnali e considerando che la quasi totalità della corrente percorrerà la resistenza a $1\text{ k}\Omega$ ³ è possibile ricavare il valore dell'impedenza incognita, calcolarne il modulo e la fase, la parte reale e immaginaria. Per ricavare il valore del modulo dell'impedenza, Z , della micropipetta utilizzata è stata usata la seguente relazione⁴:

$$Z = \frac{V_{in} - V_{out}}{I} = \frac{V_{in} - V_{out}}{V_{out}} \cdot 1\text{ k}\Omega \quad (4.3)$$

mentre la fase dell'impedenza è ricavata tramite la lettura diretta dello sfasamento φ tra le tensioni ai due ingressi dell'oscilloscopio.

L'impedenza equivalente \dot{Z} è quindi:

$$\dot{Z} = Z e^{j\varphi} = \text{Re}(\dot{Z}) + j\text{Im}(\dot{Z}) \quad (4.4)$$

di cui è possibile calcolare parte reale $\text{Re}(\dot{Z})$ e parte immaginaria $\text{Im}(\dot{Z})$.

³La resistenza da $1\text{ k}\Omega$ è posta in parallelo all'ingresso dell'oscilloscopio che, con l'utilizzo della sonda compensata 10x, presenta un'impedenza di $10\text{ M}\Omega$.

⁴E' possibile utilizzare l'equazione 4.3 trascurando la fase poichè le tensioni sono misurate in V_{rms} e sono, dunque, valori efficaci.

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

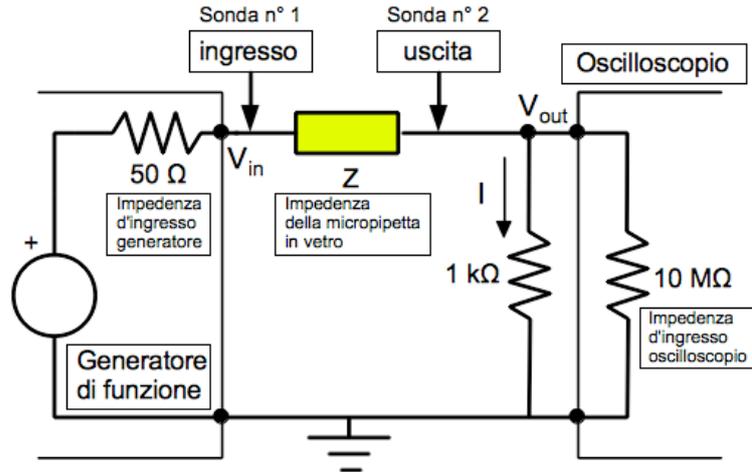


Figura 4.8.: Circuito elettrico equivalente del sistema di misura utilizzato per la caratterizzazione della micropipetta

La micropipetta è posta su un supporto collegato ad un manipolatore in grado di consentirne lo spostamento in tutte e tre le direzioni dello spazio con una risoluzione nell'ordine dei μm . Una volta posizionata la pipetta nel punto, viene fatta abbassare agendo sul regolatore del manipolatore e viene, dunque, posta sulla superficie della soluzione elettrolitica, agar in questo caso, in modo da chiudere il circuito. Con questo set-up è possibile esaminare i valori letti dalla micropipetta tramite l'oscilloscopio a diverse frequenze e osservare il cambiamento dell'impedenza della pipetta in funzione della profondità a cui si effettua la misura.

La micropipetta [10] può essere considerata un convertitore I-V che fornisce una tensione proporzionale alla corrente che la attraversa. La differenza tra le due tensioni prelevate mediante l'oscilloscopio è la caduta di tensione ai capi dell'impedenza della pipetta. Si noti che un valore alto di questa impedenza permette di non perturbare in maniera significativa il sistema di misura in cui viene introdotta.

In figura 4.9 sono riportate la parte reale $Re(\dot{Z})$ e immaginaria $Im(\dot{Z})$ dell'impedenza della pipetta in funzione della profondità della punta della pipetta dalla superficie dell'agar per i tre diversi valori di frequenza, mentre in figura 4.10 sono riportati i rispettivi andamenti del modulo Z e della fase φ dell'impedenza della pipetta. In figura 4.11 e 4.12 sono riportate rispettivamente l'impedenza resistiva R_p , l'impedenza capacitiva X_c e la capacità C_p della micropipetta che sono state calcolate tramite le seguenti relazioni:

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

$$\dot{Z} = \left(\frac{1}{R_p} + j\omega C_p \right)^{-1} = Z e^{j\varphi} \quad (4.5)$$

$$R_p = \frac{Z}{\cos(\varphi)} \quad X_c = \frac{Z}{\sin(\varphi)} \quad C_p = -\frac{1}{\omega X_c} \quad \omega = 2\pi f . \quad (4.6)$$

Si vede a 1 kHz l'impedenza misurata rimane pressochè costante mentre a 1 MHz e 4 MHz diminuisce all'aumentare della profondità perchè diminuiscono in modulo sia la componente capacitiva sia quella resistiva. Inoltre dal grafico in 4.10.b si vede che l'impedenza della pipetta ha comportamento resistivo a 1 kHz (fase nulla), mentre a 1 MHz e a 4 MHz l'effetto della parte capacitiva si evidenzia dalla fase non nulla. Si vede anche tra 1 MHz e 4 MHz la fase dell'impedenza varia in funzione della profondità con andamento opposto. Nel primo caso cresce mentre nel secondo caso diminuisce.

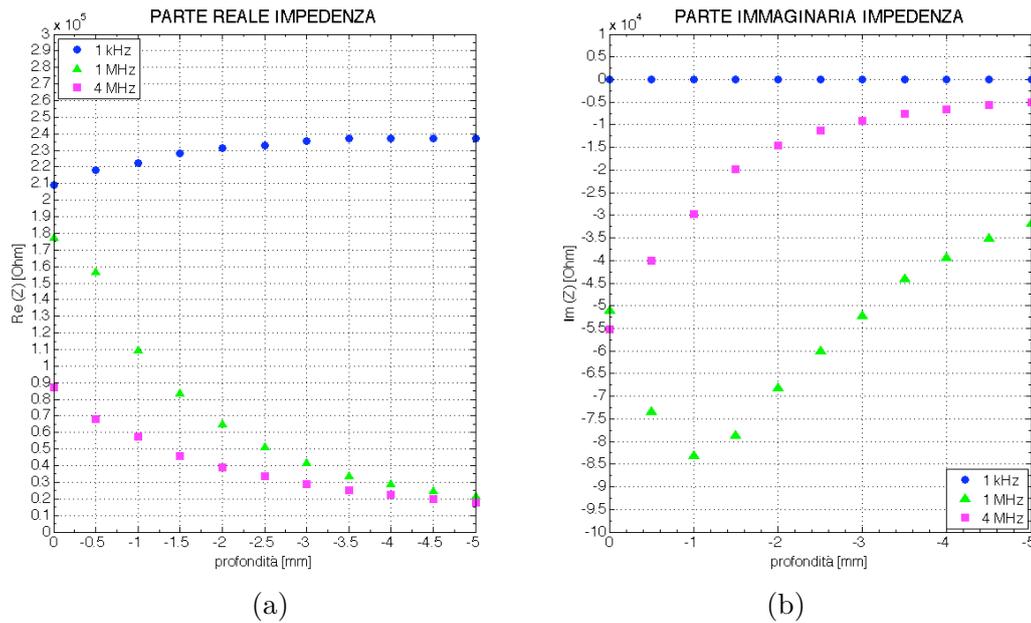


Figura 4.9.: Impedenza di una micropipetta in vitro: parte reale (a) e parte immaginaria (b)

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

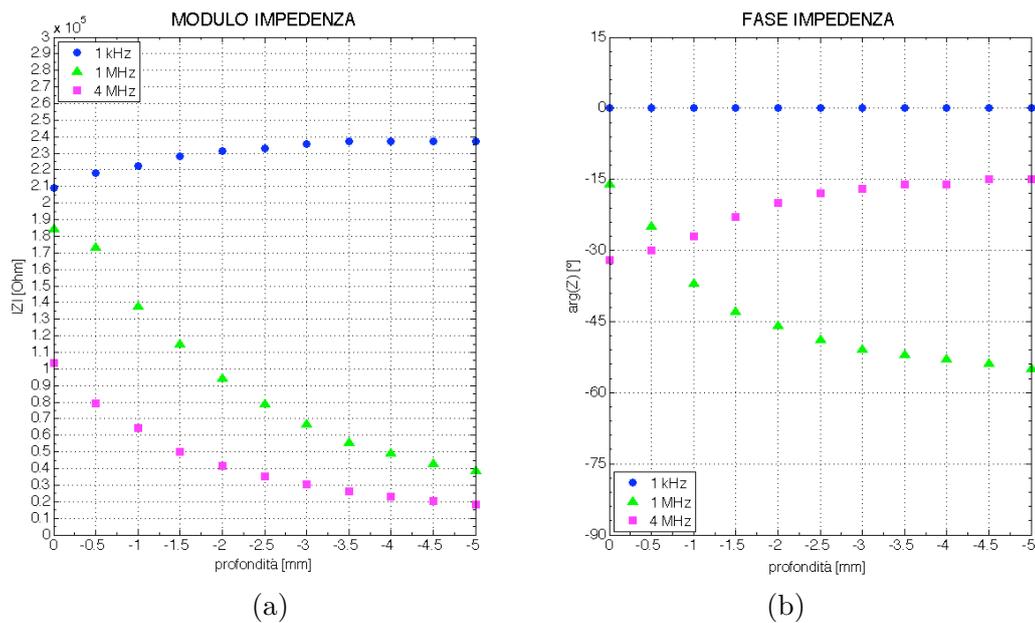


Figura 4.10.: Impedenza di una micropipetta in vetro: modulo (a) e fase (b)

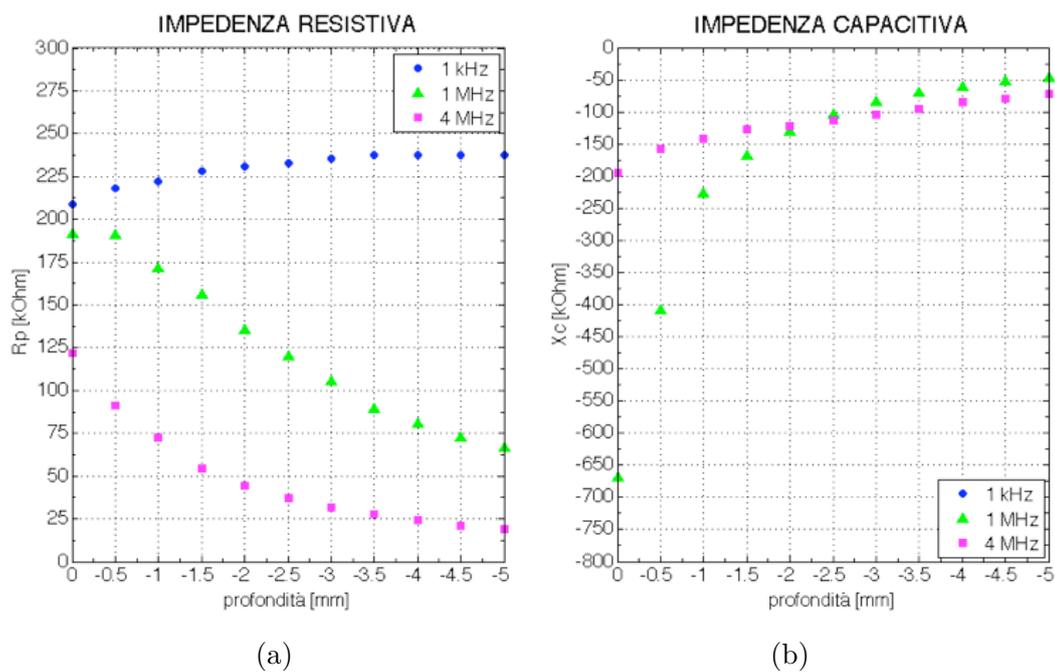


Figura 4.11.: Impedenza di una micropipetta in vetro: impedenza resistiva (a) e impedenza capacitiva (b)

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

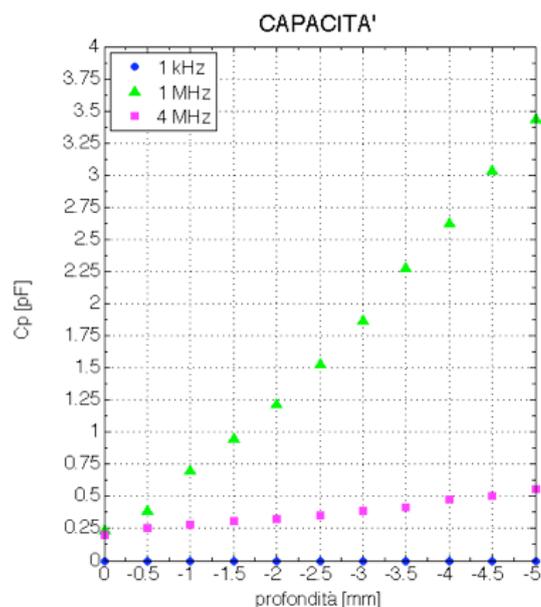


Figura 4.12.: Impedenza di una micropipetta in vetro: capacità

Per effettuare le misure si sono provate, inoltre, due diverse configurazioni per portare a massa il circuito. La prima sonda che legge il segnale d'ingresso ha la massa collegata direttamente alla massa del cavo coassiale che porta il segnale al primo elettrodo; nella seconda, la massa della sonda è collegata ad un piattino di metallo che viene posto al di sotto di uno strato di dielettrico su cui poggia la petri contenente agar. Il conduttore, a sua volta, viene collegato mediante un cavo corto (alle cui estremità sono posti due coccodrilli) alla massa del cavo coassiale che porta il segnale all'elettrodo e in questo modo lo si collega alla massa del generatore. Quest'ultima soluzione è stata provata nel tentativo di ridurre l'area di eventuali loop formati dai campi presenti nel circuito, in parte responsabili dell'immissione di rumore all'interno della misura. Si ricordi che sia la massa del generatore sia quella dell'oscilloscopio sono collegate ad un punto di massa comune, accorgimento indispensabile per evitare effetti di diafonia tra gli strumenti [8]. In figura 4.13 sono riportate il modulo e la fase delle impedenze calcolate utilizzando le misure di tensione e sfasamento eseguite con micropipette con e senza l'aggiunta dello strato di Sylgard® e con e senza l'utilizzo del piano di massa.

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

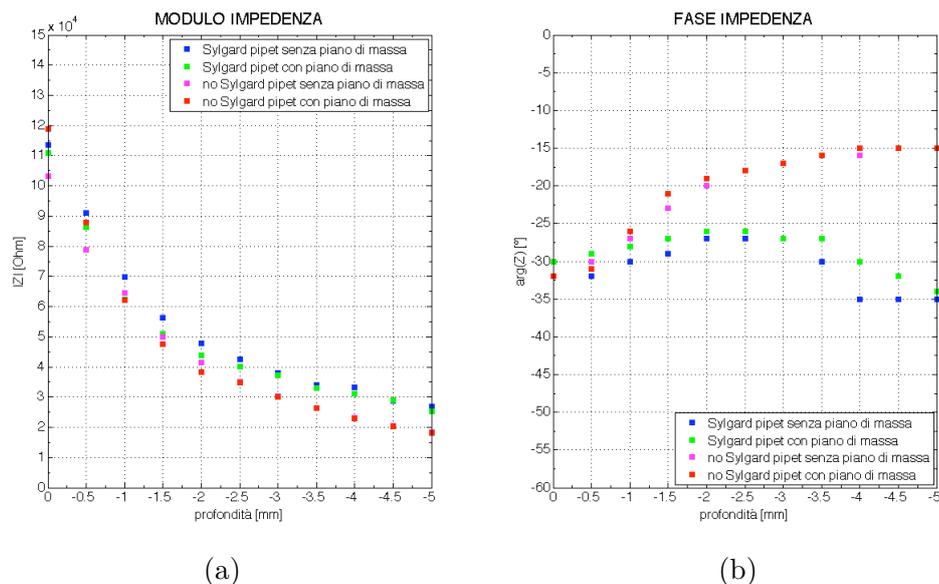


Figura 4.13.: Impedenza alla frequenza di 4MHz di una micropipetta con o senza Sylgard® in diverse configurazioni: modulo (a) e fase (b)

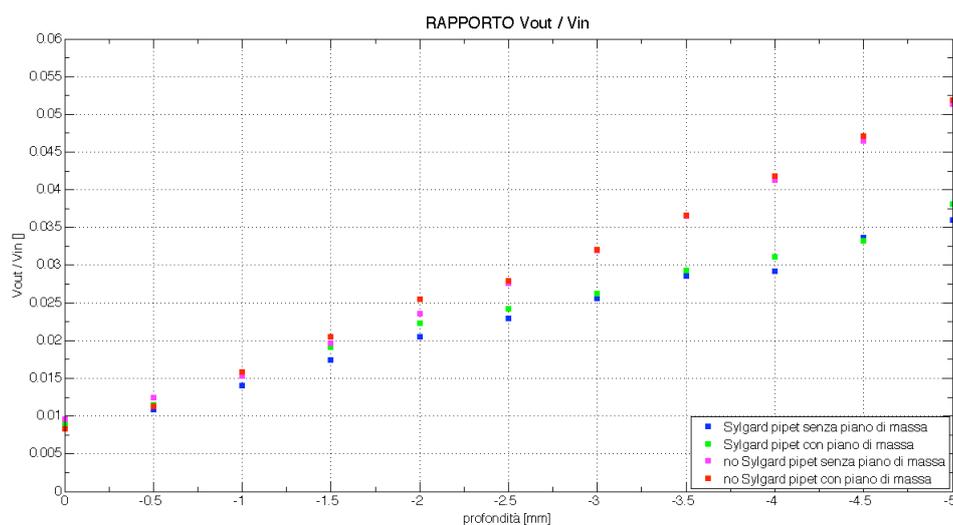


Figura 4.14.: Impedenza alla frequenza di 4MHz di una micropipetta con o senza Sylgard® in diverse configurazioni: rapporto tra tensione d'uscita e tensione d'ingresso

Dai risultati riportati è possibile vedere che la presenza o meno del piano di massa modifica in maniera trascurabile la misura. La presenza o meno dello strato di

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

Sylgard®, invece, aumenta il valore dell'impedenza della micropipetta al variare della profondità della punta dalla superficie dell'agar. E' possibile notare dal grafico in figura 4.13.b che con l'aggiunta di Sylgard® la fase cambia il suo andamento in funzione della profondità.

Il grafico in figura 4.14 riporta il rapporto fra tensione d'uscita V_{out} e tensione d'ingresso V_{in} per pipette con e senza Sylgard® valutato a diverse profondità. V_{out} è la tensione misurata all'uscita della pipetta, mentre V_{in} è quella misurata ai capi del generatore e che si ipotizza sia presente all'ingresso della punta della micropipetta.

Dal grafico in figura 4.14 si nota che all'aumentare della profondità il rapporto $\frac{V_{out}}{V_{in}}$ aumenta. Sebbene la dipendenza del rapporto dalla profondità si riduca nel caso si utilizzi la micropipetta ricoperta dallo strato di Sylgard® rispetto a quella non ricoperta, l'effetto sulla misura della capacità distribuita sulla parete vetrosa non viene eliminato e perciò la scelta riguardo quale pipetta utilizzare per l'esperimento non è più ovvia.

Per scegliere se utilizzare la micropipetta con o senza copertura mediante Sylgard® si è provata a valutare la riproducibilità della misura dell'impedenza utilizzando micropipette differenti. E' possibile che durante la prova la punta della micropipetta si rompa rendendo quindi necessaria la sua sostituzione, oppure è possibile che le prove siano eseguite su un arco di periodo comprensivo di più giorni per cui occorre cambiare la micropipetta a causa della possibile formazione di strutture cristalline al suo interno. Per questa ragione è indispensabile verificare quanto le micropipette siano uguali tra loro e quanto la stesura del Sylgard® influenzi tale differenza. Sono state, quindi, eseguite prove con diverse micropipette.

Per quantificare la dispersione si possono valutare media e varianza delle tensioni e sfasamenti misurati. La *media* \bar{q} dei dati raccolti è calcolata mediante:

$$\bar{q} = \frac{\sum_{k=1}^N q_k}{N} \quad (4.7)$$

in cui si indica con q_k la prova k-esima ed con N è il numero di prove eseguite.

La *varianza sperimentale* delle osservazioni, che stima la varianza s^2 della distribuzione di probabilità di q , si calcola con la seguente relazione:

$$s^2(q_k) = \frac{1}{N-1} \sum_{k=1}^N (q_k - \bar{q})^2 \quad (4.8)$$

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

Nel caso esaminato, avendo a disposizione un'unica prova, è possibile identificare la *varianza della media* $s^2(\bar{q})$ con la varianza sperimentale $s^2(q_k)$:

$$s^2(\bar{q}) = s^2(q_k) \quad (4.9)$$

e calcolare la dispersione delle misure intorno al valore di media tramite lo *scarto quadratico della media*, u :

$$u = \sqrt{s^2(\bar{q})}. \quad (4.10)$$

Si assume che l'intervallo di dispersione dalla media sia $[\bar{q} - 2u; \bar{q} + 2u]$ in modo tale da poter comprendere al suo interno il 95% dei valori trovati.

La media e la dispersione sono state valutate anche per il rapporto $\frac{V_{out}}{V_{in}}$. E' possibile considerare queste quantità come grandezze a sè stanti per via del fatto che queste misure sono ricavate utilizzando campioni differenti [11, 12]. I valori di media, di varianza sperimentale e di dispersione sono calcolati come in precedenza e i grafici relativi di $\frac{V_{out}}{V_{in}}$ in funzione della profondità sono riportati in figura 4.15 per pipette senza Sylgard® e in figura 4.16 per pipette con Sylgard®.

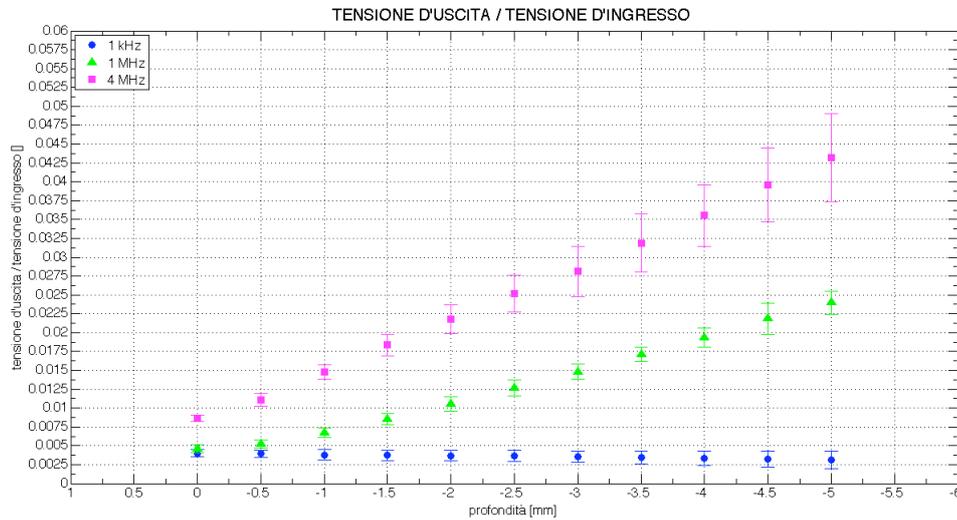


Figura 4.15.: Rapporto tra tensione d'uscita e tensione d'ingresso per micropipette senza Sylgard®: valor medio e dispersione

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

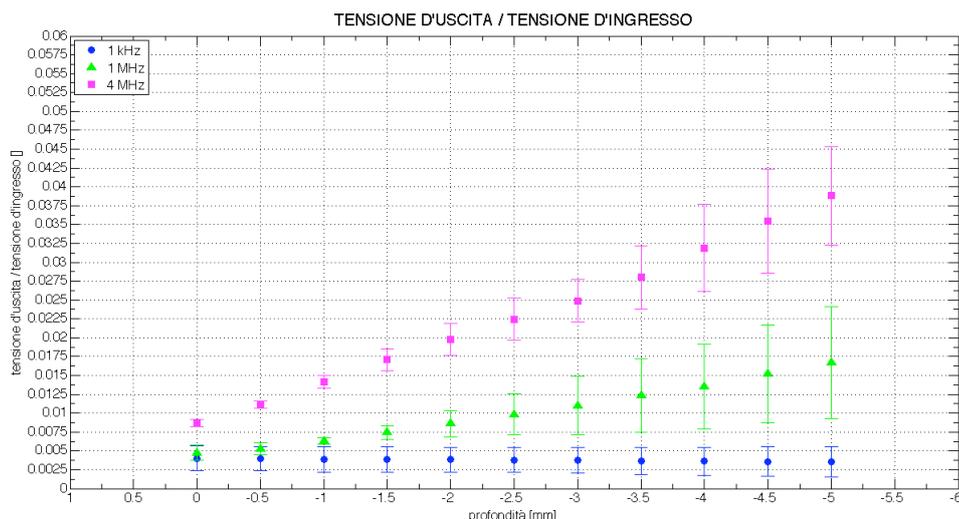


Figura 4.16.: Rapporto tra tensione d'uscita e tensione d'ingresso per micropipette con Sylgard®: valor medio e dispersione

Le figure 4.17 e 4.18 riportano i valori di modulo e fase dell'impedenza delle diverse micropipette in funzione della profondità. Si sono utilizzate pipette con e senza Sylgard®. I valori di media e dispersione del modulo dell'impedenza in funzione della profondità sono calcolati come in precedenza poichè, come accade per il rapporto di tensioni $\frac{V_{out}}{V_{in}}$, sono considerate anch'esse quantità a se stanti. Gli sfasamenti sono, invece, misure dirette e quindi media e dispersione sono calcolate come esposto in precedenza.

Dai grafici riportati è possibile notare che lo strato di Sylgard® posto sulle pareti della micropipetta, oltre a non eliminare la dipendenza della misura dalla profondità, introduce un ulteriore effetto di variabilità dovuto all'utilizzo di pipette differenti. In particolare è possibile notare che la dispersione dei valori misurati è maggiore per le pipette con Sylgard® rispetto a quello che si ha utilizzando pipette senza Sylgard®. Da queste considerazioni risulta evidente che è meglio utilizzare la pipetta senza lo strato isolante per ridurre le differenze tra le misure effettuate con pipette diverse.

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

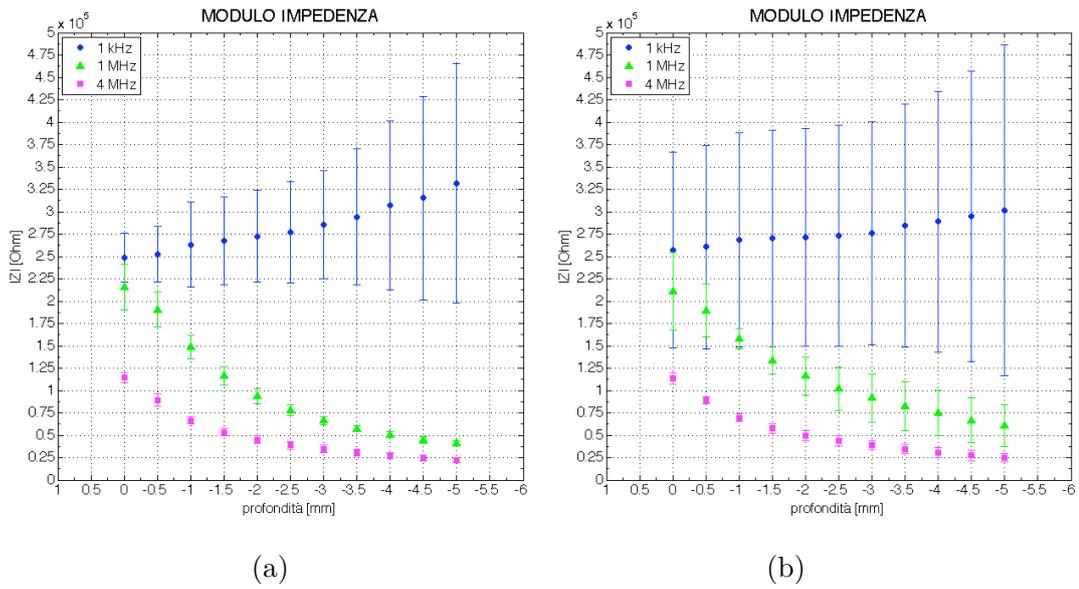


Figura 4.17.: Modulo dell'impedenza per micropipette senza (a) e con Sylgard® (b): valor medio e dispersione

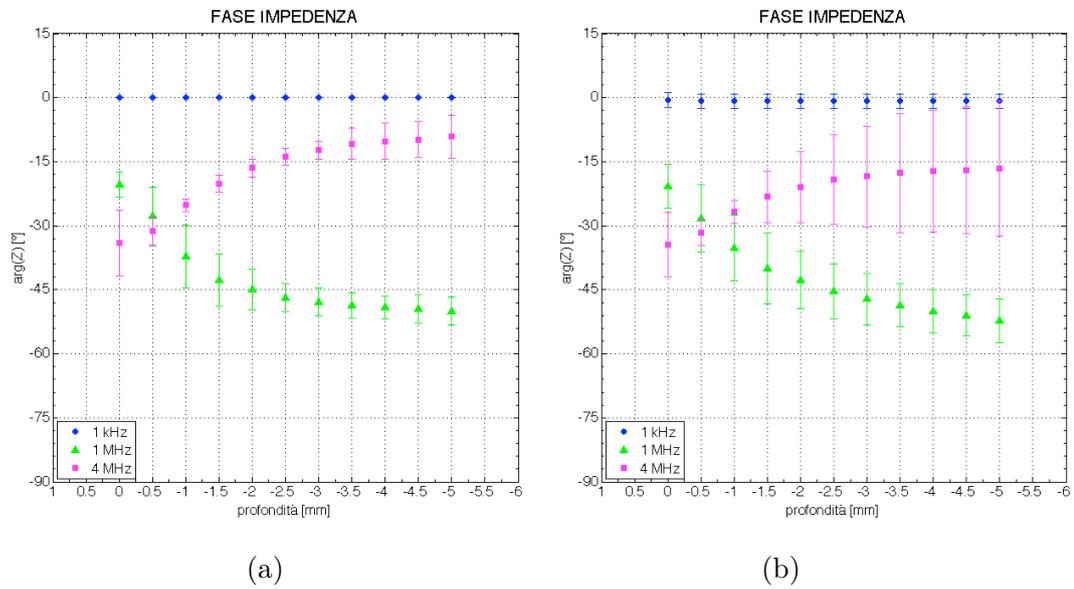


Figura 4.18.: Fase dell'impedenza per micropipette senza (a) e con Sylgard® (b): valor medio e dispersione

4.2.2.3. Funzione di trasferimento

Le misure precedenti hanno permesso di caratterizzare l'impedenza della micropipetta. Dalla conoscenza dell'impedenza della pipetta è possibile, nota la corrente che la percorre e la tensione al suo estremo connesso all'oscilloscopio, ricavare la tensione all'estremo immerso nel tessuto mediante la seguente relazione:

$$V_{in}^* = ZI + V_{out}^* \quad I = \frac{V_{out}^*}{1 \text{ k}\Omega}. \quad (4.11)$$

Per valutare l'efficienza del metodo di stima si è provata a ricostruire la tensione alla punta della pipetta in una condizione nota.

L'architettura del sistema di misura utilizzato per la prova di simulazione e lo schema elettrico equivalente sono mostrati in figura 4.19 e 4.20. Al generatore di funzione vengono collegati due elettrodi, uno dei quali funge da massa, che vengono posti all'interno di una petri contenente dell'agar. In questo modo si ha un gradiente di potenziale elettrico che assume valori tra 3.53 V_{rms} , V_1 , e 0 V , V_0 . La misura per mezzo della micropipetta viene effettuata nel punto a metà tra i due elettrodi, dove è presente un potenziale pari a circa la metà di quello applicato all'elettrodo V_1 .

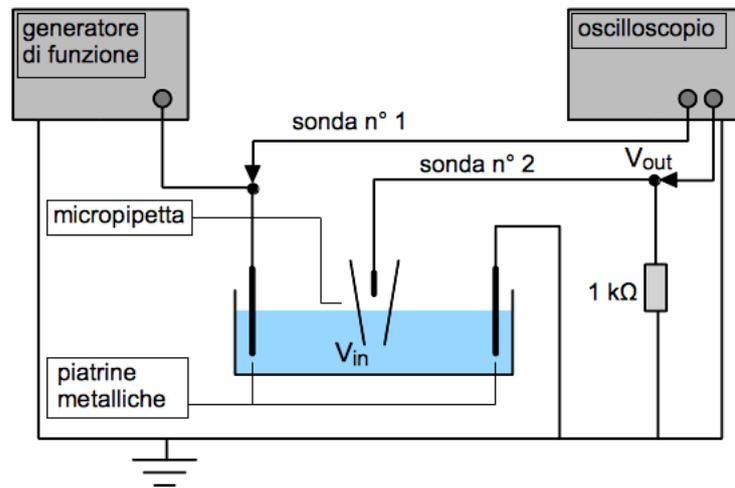


Figura 4.19.: Schema del sistema di misura per la simulazione della prova su tessuto cerebrale

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

Le misure V_{out}^* ricavate in questa configurazione vengono trasdotte utilizzando la funzione di trasferimento $\frac{V_{out}}{V_{in}}$, precedentemente calcolata, utilizzando la seguente relazione⁵:

$$V_{in}^* = \frac{V_{out}^*}{\frac{V_{out}}{V_{in}}} \quad (4.12)$$

I valori di tensione V_{in}^* ottenuti tramite la 4.12 sono confrontati con i valori reali presenti nella petri.

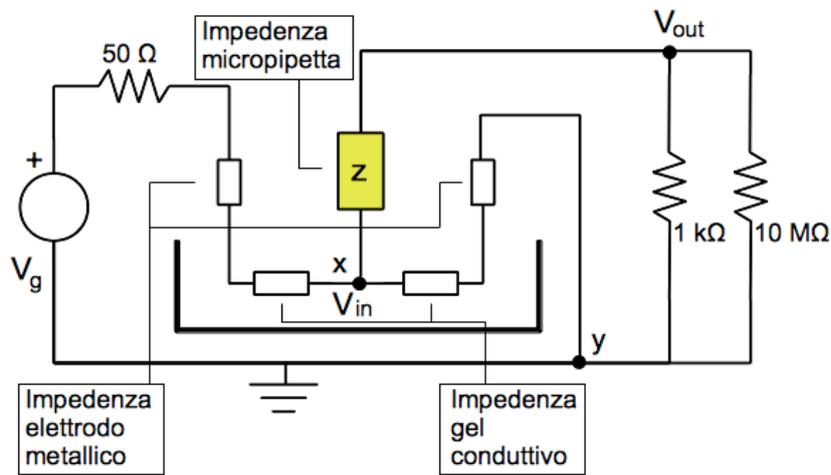


Figura 4.20.: Schema elettrico equivalente della prova di simulazione

Il grafico in figura 4.21 riporta i valori della tensione d'ingresso V_{in}^* trovati utilizzando, in un caso, la funzione di trasferimento valutata come media su un certo numero di prove con pipette diverse e, nell'altro, la funzione di trasferimento ricavata con misure sulla stessa micropipetta in esame.

⁵E' possibile utilizzare il rapporto $\frac{V_{out}}{V_{in}}$ per ricostruire il valore della tensione in ingresso V_{in}^* per via della seguente relazione:

$$V_{in} = ZI + V_{out} = \left(\frac{Z}{1 \text{ k}\Omega} + 1\right)V_{out}$$

e essendo $\frac{Z}{1 \text{ k}\Omega} \gg 1$ è possibile affermare che $\frac{V_{out}}{V_{in}} \simeq \frac{Z}{1 \text{ k}\Omega}$ assumendo che V_{out} e V_{in} siano legati da una proporzionalità diretta.

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

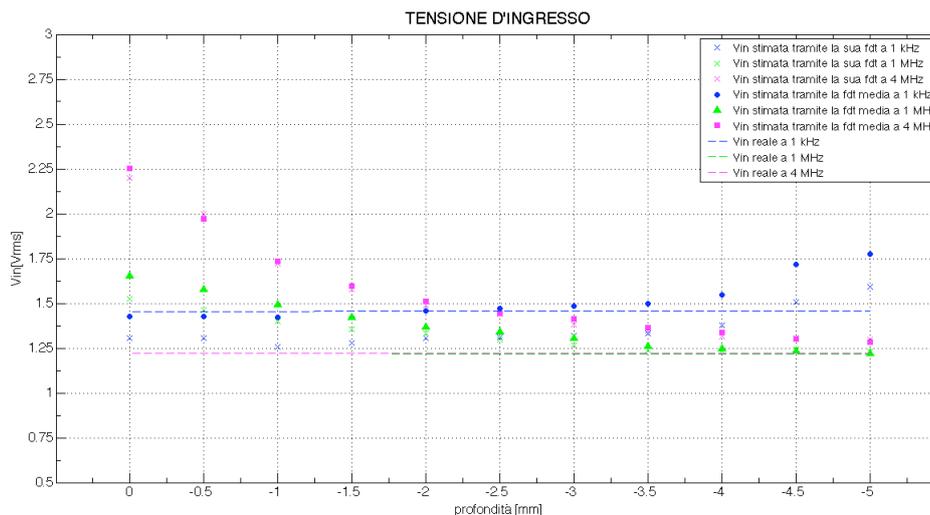


Figura 4.21.: Valori della tensione d'ingresso ottenuti tramite l'utilizzo della funzione di trasferimento ricavata tramite valor medio e di quella ricavata dalla micropipetta stessa

E' possibile notare come l'utilizzo delle due funzioni di trasferimento non cambia in maniera significativa il risultato. Dai risultati della ricostruzione è possibile notare che i valori ricavati alla frequenza di 1 kHz hanno un andamento molto vicino a quello teoricamente presente nel punto di misura. Per quanto riguarda, invece, le frequenze di 1 MHz e 4 MHz, il valore della tensione d'ingresso si discosta in maniera non trascurabile dal valore reale nei tratti più superficiali della misura per poi convergere al valore corretto all'aumentare della profondità.

Vengono prese in considerazioni le probabili cause di questo fenomeno riguardo le quali si è condotta un'indagine più dettagliata.

La prima possibile causa di un tale andamento può essere dovuta ad una caduta di potenziale non trascurabile sull'elettrodo di $Ag/AgCl$ e sul mezzo conduttivo, cioè l'agar. Per stimare l'entità di tale differenza di potenziale è necessaria una verifica dell'impedenza di entrambi i mezzi. Per fare ciò si immergono due elettrodi di $Ag/AgCl$ all'interno dell'agar, il più distanti possibili tra loro in modo tale da ottenere una stima di queste impedenze nel caso peggiore. Tramite il primo dei due elettrodi viene immesso il segnale sinusoidale generato dal generatore di funzione all'interno della petri contenente agar che viene prelevato per mezzo del secondo elettrodo al quale è collegata una resistenza di 1 k Ω . Le due sonde che portano i segnali d'ingresso e

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

uscita all'oscilloscopio sono collegate, la prima al primo elettrodo e la sua massa alla massa del cavo coassiale che porta il segnale, la seconda, invece, al terminale del BNC che porta il segnale e la sua massa al terminale di massa. In questo modo otteniamo la misura dei potenziali al primo ed al secondo elettrodo. Quest'ultima tensione corrisponde alla differenza di potenziale ai capi della resistenza da $1\text{ k}\Omega$ tramite la quale è possibile ottenere una misura della corrente che interessa gli elettrodi e l'agar. Il circuito elettrico equivalente è in figura 4.22. Conoscendo la corrente è ora possibile stimare l'impedenza tra i due elettrodi mediante la relazione:

$$\frac{V_A - V_B}{I}. \quad (4.13)$$

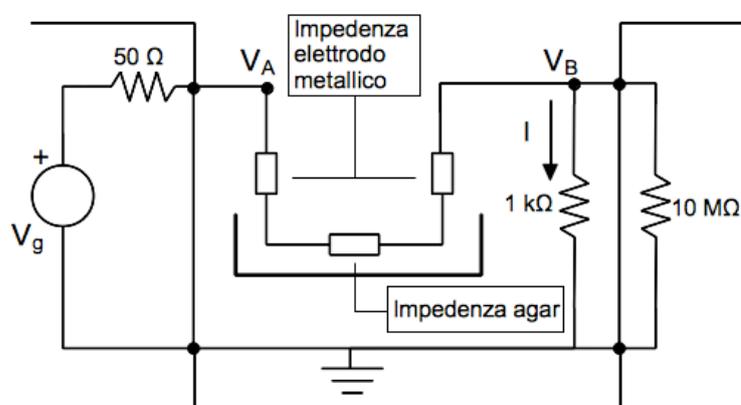


Figura 4.22.: Schema elettrico equivalente per il calcolo delle impedenze degli elettrodi metallici e dell'agar

I valori indicativamente trovati per le tre frequenze in esame sono:

- a $1\text{ kHz} \approx 700\Omega$;
- a $1\text{ MHz} \approx 340\Omega$;
- a $4\text{ MHz} \approx 260\Omega$;

Si tratta di valori d'impedenza relativamente piccoli rispetto all'impedenza della pipetta in cui il maggior contributo è dovuto al gel conduttivo⁶. Questi sono valori effettivamente trascurabili rispetto all'impedenza propria della micropipetta. Tener

⁶Gli elettrodi metallici possiedono un'impedenza molto piccola.

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

conto della caduta di potenziale attraverso l'elettrodo e l'agar nei dati raccolti durante la prova di caratterizzazione del sensore non cambia l'impedenza della micropipetta che è stata calcolata.

Queste considerazioni sull'impedenza degli elettrodi e del gel conduttivo sono utili per quanto concerne la prova di simulazione. E' possibile ipotizzare, infatti, che la micropipetta crei nel punto in cui è inserita (nodo y) un partitore di corrente posto in parallelo al ramo che porta a massa il segnale e che è pari, se la pipetta è posta al centro tra i due elettrodi di segnale, a metà dell'impedenza del mezzo conduttivo e dall'elettrodo.

In figura 4.23 è riportato il circuito elettrico del sistema di misura che tiene conto dell'impedenza del mezzo.

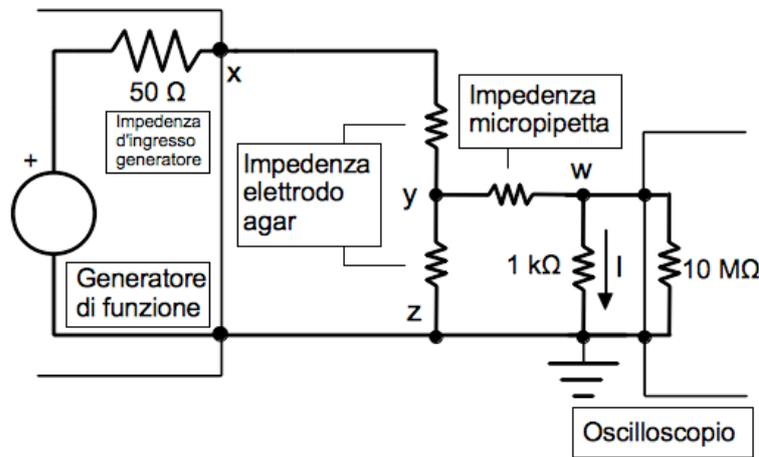


Figura 4.23.: Circuito elettrico equivalente del sistema di misura per la prova di simulazione

Si nota che il ramo che comprende la pipetta ha impedenza molto maggiore di quello che rappresenta il mezzo conduttivo. Quindi l'impedenza ai morsetti y e z, tende a essere pari a quella ai morsetti x e y e si può affermare che l'inserimento della micropipetta non perturba, sotto questo punto di vista, il circuito di misura in cui è inserita.

Tuttavia si è verificato che l'inserimento dell'elettrodo nel mezzo conduttivo può provocare delle variazioni nella tensione realmente presente in ingresso in maniera dipendente dalla profondità. Questo effetto può determinare un errore sia nella valutazione dell'impedenza del microelettrodo (poichè risulta violata l'ipotesi di equi-

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

potenzialità del gel conduttivo contenuto nella petri) sia nella ricostruzione dei valori d'ingresso nella prova di simulazione (poichè non è più possibile ipotizzare che nel punto medio tra i due elettrodi il potenziale sia circa la metà). Per constatare l'esistenza di tale effetto è possibile effettuare una prova immergendo un semplice conduttore al posto della micropipetta nel mezzo conduttivo. Il circuito elettrico equivalente è simile a quello in figura 4.22 con la differenza che la resistenza da $1\text{ k}\Omega$ è stata sostituita con una da $100\text{ k}\Omega$ che simula la parte resistiva dell'impedenza della pipetta. Si è scelto di effettuare questa prova utilizzando due conduttori dello stesso materiale ma con due sezioni differenti. I risultati sono quelli riportati in figura 4.24.

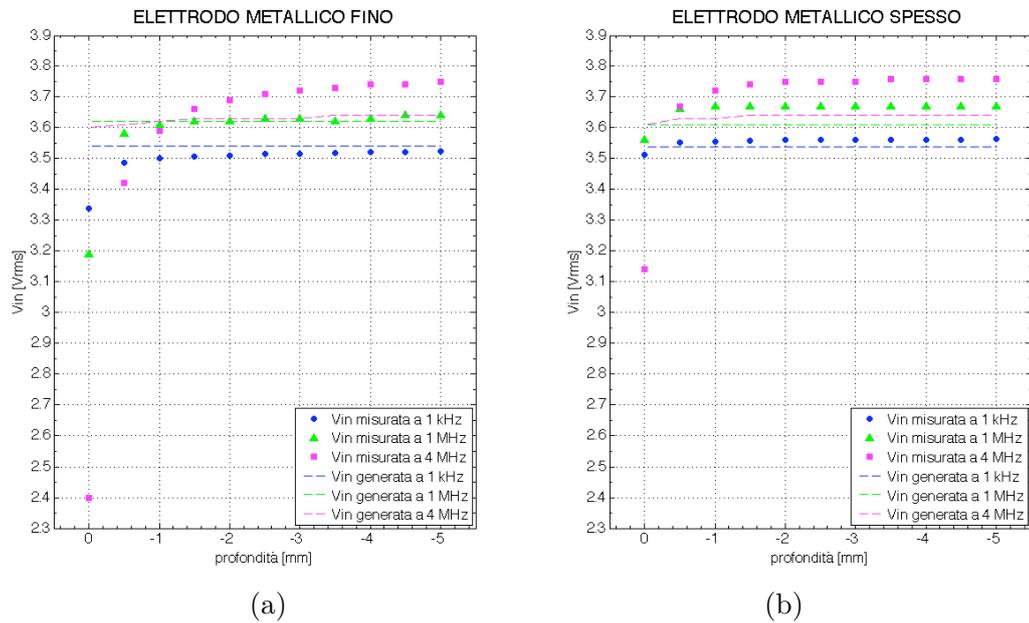


Figura 4.24.: Valori della tensione d'ingresso misurata in funzione della profondità per elettrodi metallici di sezioni differenti

Nei grafici è presentato un confronto fra le tensioni presenti al primo elettrodo che genera il segnale e al secondo impiegato per il prelievo. Le differenze tra i valori generato e misurato sono ampie soprattutto nei punti a profondità prossima alla superficie dell'agar. Questo effetto risulta maggiormente accentuato all'aumentare della frequenza a cui si opera e di entità superiore nel caso si usi un elettrodo con sezione minore. E' perciò plausibile ritenere che sia un effetto di questo tipo a determinare lo scostamento nei tratti iniziali della misura dei valori calcolati tramite la funzione di trasferimento precedentemente ricavata.

4.3. Risultati delle misure effettuate sul ratto

Dopo aver scelto la strumentazione più adatta alla tipologia di esperimento che si vuole di effettuare e aver condotto un'analisi approfondita dell'elemento di trasduzione del sistema di misura, caratterizzandolo e prendendo atto dei suoi vantaggi e dei suoi limiti, si esegue la misura sul ratto.

Come prima cosa il ratto viene anestetizzato e posto su una piastra riscaldata che è in grado di termostatare la temperatura corporea dell'animale. La temperatura è monitorata tramite una sonda anale che permette di visualizzare il suo valore tramite la lettura su un display ad essa collegato. Il ratto è posizionato in un sistema stereotassico, mostrato in figura 4.31, che permette di bloccare l'animale e di fornire delle coordinate spaziali precise su di esso. Il bloccaggio del ratto avviene per mezzo di due *ear bars* a livello delle orecchie e di una *teeth bar* posta sul muso. Prima di effettuare la pratica chirurgica il cranio del ratto viene rasato. Dopo di che si effettua un'incisione che permette di scoprire il cranio dell'animale. L'obiettivo è effettuare delle misure in alcuni punti del tessuto cerebrale del ratto e per tale ragione vengono effettuati dei fori nel cranio che permettano l'inserimento dell'elettrodo usato per il prelievo del segnale. Si è scelta questa soluzione rispetto all'apertura completa del cranio per il fatto che in questo modo il tessuto mantiene meglio le sue proprietà fisiologiche. Prima di effettuare la misura in un foro si pratica un'incisione per asportare la parte di meninge che non permetterebbe alla pipetta di entrare per via della sua elasticità. L'esperimento viene condotto utilizzando la stessa strumentazione utilizzata per la prova di simulazione con l'unica differenza che la pipetta è sostituita con il cranio dell'animale e che le misure sono effettuate con la micropipetta campionando il tessuto in vari punti e a diverse profondità. Le coordinate dei punti sono riferite rispetto al *bregma* (punto anatomico del cranio in cui la sutura coronale è intersecata perpendicolarmente dalla sutura sagittale). Gli elettrodi sono posti sotto la cute a contatto diretto con il cranio. Durante la pratica chirurgica e la sezione di raccolta dei dati, il cervello è bagnato da Krebs, la stessa soluzione che riempie la micropipetta.

Nelle tabelle sono riportati i dati raccolti durante gli esperimenti effettuati su due ratti appartenenti al ceppo Wistar e nei grafici le tensioni misurate in uscita alla micropipetta V_{out}^* e le tensioni ricostruite all'ingresso V_{in}^* :

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

- Ratto n°1, femmina di 45 giorni, 120 grammi

PUNTO 1 coordinate: -6.5 antero-posteriore +3.2 latero-mediale			
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	phase (°)
1 kHz			
0.0	3.41	18.6	-8 -10
-1.0	3.41	18.7	-7 -9
-2.0	3.41	18.5	-8 -10
-3.0	3.40	18.4	-8 -10
-4.0	3.40	18.4	-6 -10
-5.0	3.40	18.4	-6 -10
1 MHz			
0.0	3.39	17.9	-40 -30
-1.0	3.39	18.1	-40 -30
-2.0	3.39	18.4	-40 -30
-3.0	3.39	18.6	-40 -50
-4.0	3.39	19.1	-50 -60
-5.0	3.39	20.0	-46 -44
4 MHz			
0.0	3.39	18.5	-87 -91
-1.0	3.39	20.7	-72 -76
-2.0	3.39	21.7	-68 -70
-3.0	3.39	22.9	-63 -64
-4.0	3.39	24.4	-60 -61
-5.0	3.39	26.3	-57 -58

Tabella 4.1.: Dati raccolti sul ratto n°1 nel punto 1

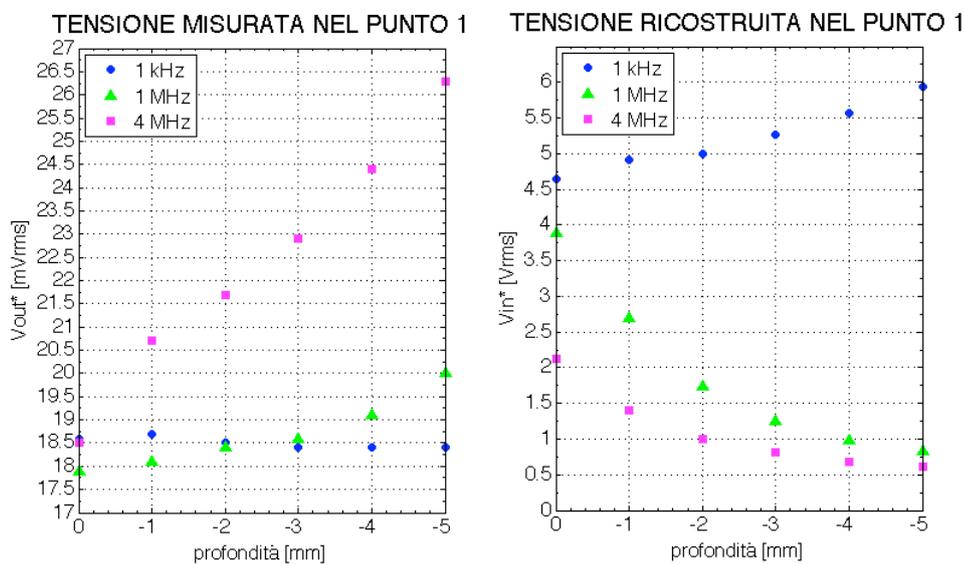


Figura 4.25.: Tensione misurata V_{out}^* e tensione ricostruita V_{in}^* nel punto 1

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

PUNTO 2 coordinate: +3.0 antero-posteriore -2.5 latero-mediale			
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	phase (°)
1 kHz			
0.0	3.345	18.3	0 -2
-1.0	3.344	18.6	0 -1
-2.0	3.344	19.0	0 -2
-3.0	3.344	18.9	0 -2
-4.0	3.343	19.1	0 -3
-5.0	3.343	18.9	0 -3
1 MHz			
0.0	3.00	16.6	-91 -95
-1.0	3.00	20.0	-46 -48
-2.0	3.00	23.6	-46 -48
-3.0	3.00	27.3	-49 -50
-4.0	3.00	32.8	-49 -50
-5.0	3.00	41.3	-48 -49
4 MHz			
0.0	2.863	27.9	-92
-1.0	2.863	30.5	-66 -65
-2.0	2.862	34.6	-50 -51
-3.0	2.861	40.8	-40
-4.0	2.861	49.5	-34 -35
-5.0	2.860	63.7	-28 -29

Tabella 4.2.: Dati raccolti sul ratto n°1 nel punto 2

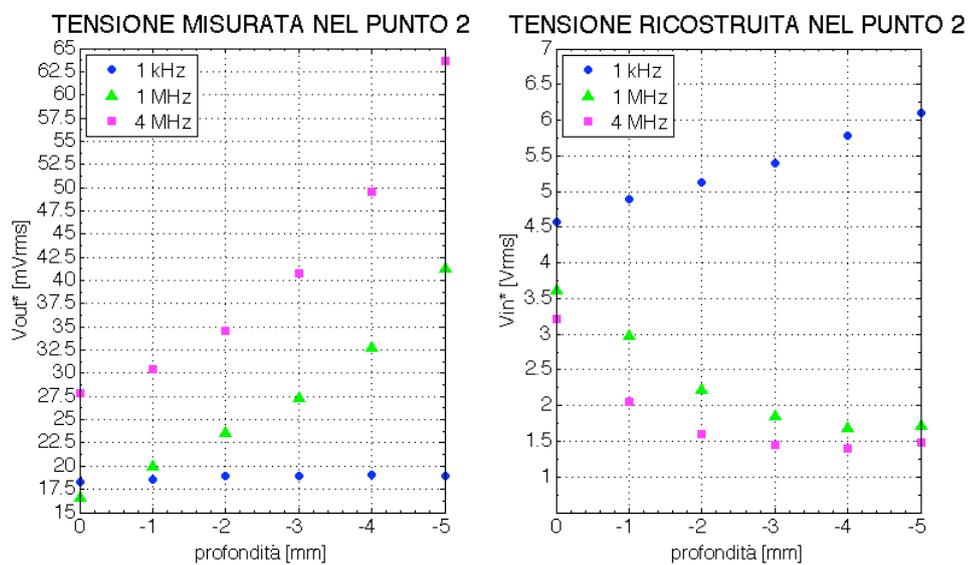


Figura 4.26.: Tensione misurata V_{out}^* e tensione ricostruita V_{in}^* nel punto 2

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

PUNTO 3 coordinate: +0.5 antero-posteriore -0.5 latero-mediale			
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	phase (°)
1 kHz			
0.0	3.334	18.0	0 -2
-1.0	3.334	18.1	0 -2
-2.0	3.334	18.8	-2 -4
-3.0	3.334	19.1	-2 -4
-4.0	3.334	19.3	-2 -5
-5.0	3.333	19.3	-1 -4
1 MHz			
0.0	2.98	16.5	-86 -96
-1.0	2.98	20.6	-46 -49
-2.0	2.98	24.8	-49 -50
-3.0	2.98	29.7	-50 -51
-4.0	2.98	35.4	-50 -51
-5.0	2.98	44.5	-50 -51
4 MHz			
0.0	2.84	28.1	-93
-1.0	2.84	30.9	-60 -61
-2.0	2.84	36.8	-44
-3.0	2.84	44.3	-36
-4.0	2.84	56.7	-30
-5.0	2.84	69.2	-25 -26

Tabella 4.3.: Dati raccolti sul ratto n°1 nel punto 3

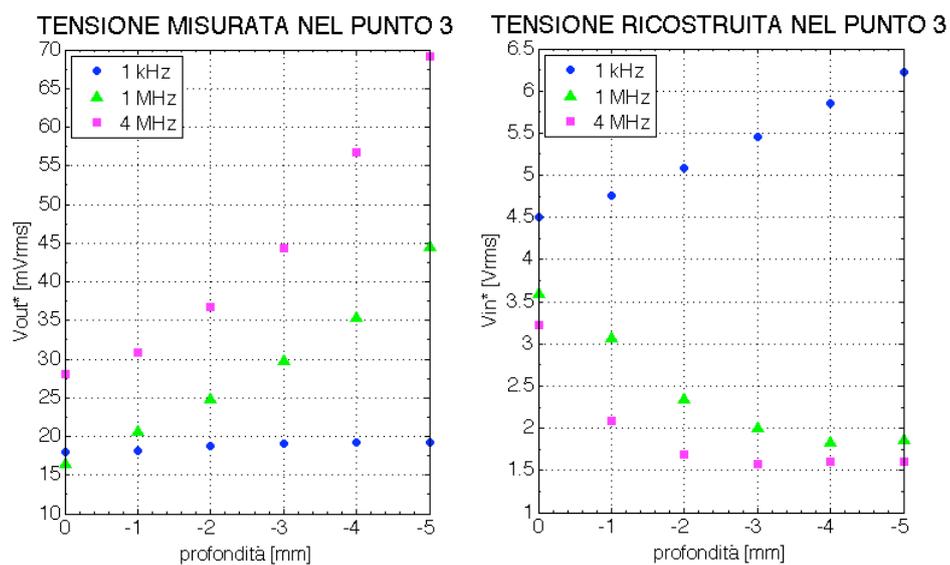


Figura 4.27.: Tensione misurata V_{out}^* e tensione ricostruita V_{in}^* nel punto 3

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

- Ratto n°2, maschio di 30 giorni, 120 grammi

PUNTO 1 coordinate: -2.5 antero-posteriore -4.0 latero-mediale			
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	phase (°)
1 MHz			
0.0	1.43	5.3	-33 -41
-0.5	1.43	5.9	-32 -37
-1.0	1.43	6.5	-32 -36
-1.5	1.43	6.8	-31 -36
-2.0	1.43	7.5	-30 -36
-2.5	1.43	8.2	-32 -37
-3.0	1.43	8.9	-32 -37
-3.5	1.43	9.2	-34 -39
-4.0	1.43	9.9	-34 -39
-4.5	1.43	10.6	-36 -40
-5.0	1.43	11.3	-36 -39
4 MHz			
0.0	1.359	7.9	-57 -59
-0.5	1.359	8.1	-53 -54
-1.0	1.359	8.4	-46 -49
-1.5	1.359	8.8	-43 -44
-2.0	1.359	9.3	-39 -40
-2.5	1.359	9.9	-32 -36
-3.0	1.359	10.8	-30 -31
-3.5	1.359	11.7	-28 -30
-4.0	1.359	12.7	-24 -26
-4.5	1.359	13.8	-23 -24
-5.0	1.359	14.6	-23 -24

Tabella 4.4.: Dati raccolti sul ratto n°2 nel punto 1

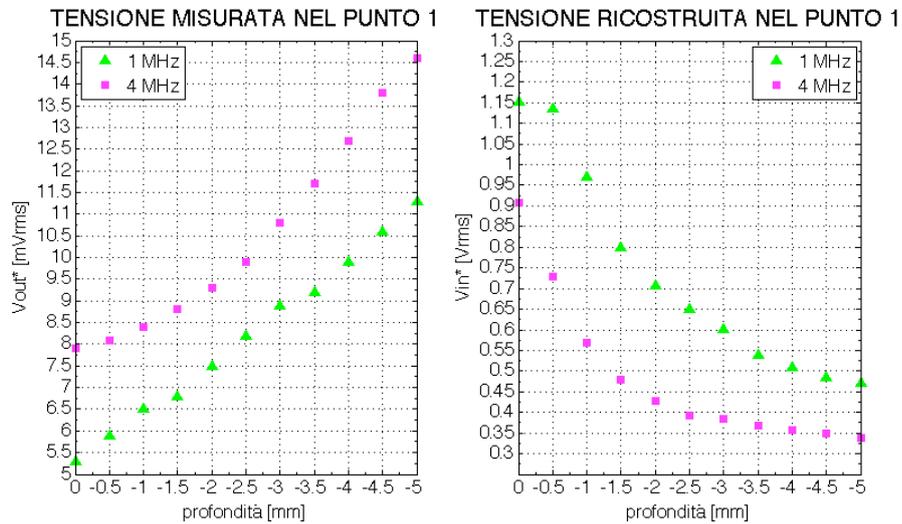


Figura 4.28.: Tensione misurata V_{out}^* e tensione ricostruita V_{in}^* nel punto 1

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

PUNTO 2 coordinate: +2.2 antero-posteriore -1.0 latero-mediale			
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	phase (°)
1 MHz			
0.0	1.43	2.6	-36 -45
-0.5	1.43	3.4	-37 -44
-1.0	1.43	4.3	-39 -45
-1.5	1.43	5.7	-38 -44
-2.0	1.43	7.0	-39 -43
-2.5	1.43	8.4	-38 -41
-3.0	1.43	9.7	-38 -43
-3.5	1.43	11.5	-40 -43
-4.0	1.43	12.9	-41 -44
-4.5	1.43	14.1	-44 -46
-5.0	1.43	16.0	-45 -49
4 MHz			
0.0	1.344	8.1	-51 -53
-0.5	1.344	8.8	-42 -45
-1.0	1.344	9.5	-37 -40
-1.5	1.344	10.4	-32 -35
-2.0	1.344	11.5	-30 -31
-2.5	1.344	12.9	-27 -30
-3.0	1.344	14.8	-24 -26
-3.5	1.344	17.3	-22 -25
-4.0	1.344	20.5	-22 -24
-4.5	1.344	24.6	-22 -23
-5.0	1.344	26.2	-24 -23

Tabella 4.5.: Dati raccolti sul ratto n°2 nel punto 2

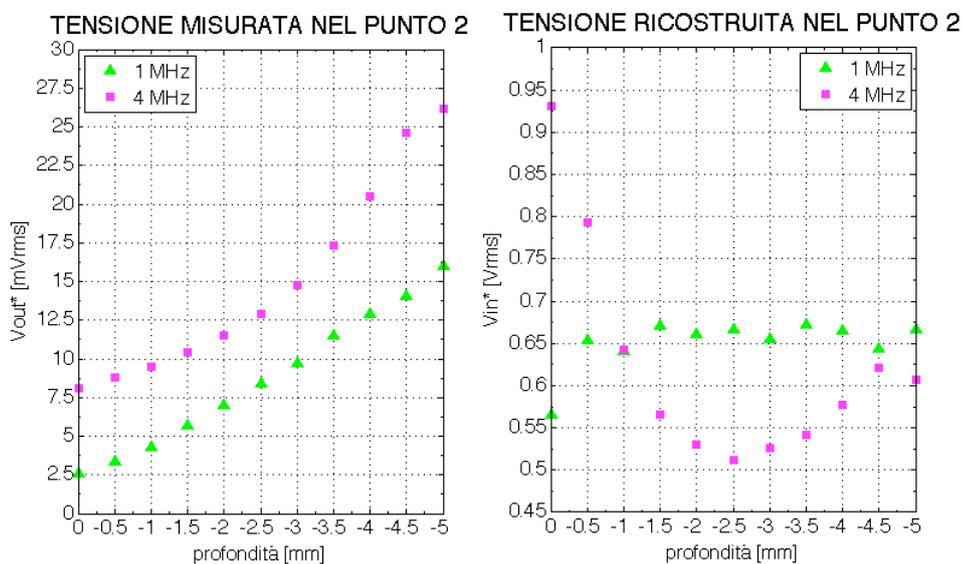


Figura 4.29.: Tensione misurata V_{out}^* e tensione ricostruita V_{in}^* nel punto 2

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

PUNTO 3 coordinate: +2.0 antero-posteriore -2.7 latero-mediale			
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	phase (°)
1 MHz			
0.0	1.428	2.0	-36 -42
-0.5	1.428	2.9	-41 -46
-1.0	1.428	3.6	-40 -47
-1.5	1.428	4.5	-39 -45
-2.0	1.428	5.2	-38 -42
-2.5	1.428	5.9	-36 -42
-3.0	1.428	6.7	-36 -42
-3.5	1.428	7.5	-36 -42
-4.0	1.428	8.6	-37 -42
-4.5	1.428	9.5	-40 -45
-5.0	1.428	10.3	-40 -45
4 MHz			
0.0	1.339	7.3	-77 -79
-0.5	1.339	7.3	-71
-1.0	1.339	7.3	-64 -65
-1.5	1.339	7.5	-58 -57
-2.0	1.339	7.8	-51 -53
-2.5	1.339	8.2	-46 -48
-3.0	1.339	8.7	-40 -44
-3.5	1.339	9.6	-37 -39
-4.0	1.339	10.7	-32 -34
-4.5	1.339	12.3	-30 -31
-5.0	1.339	14.1	-28 -29

Tabella 4.6.: Dati raccolti sul ratto n°2 nel punto 3

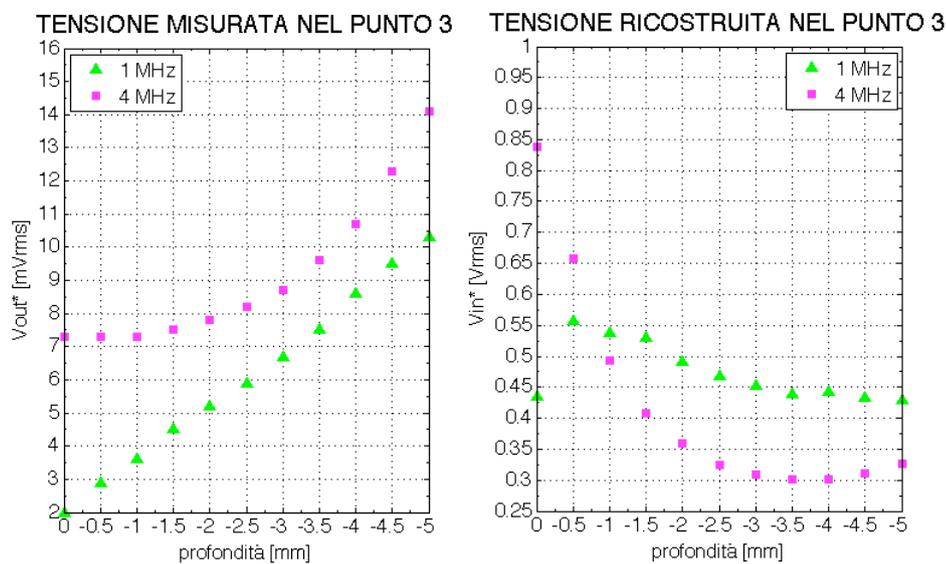


Figura 4.30.: Tensione misurata V_{out}^* e tensione ricostruita V_{in}^* nel punto 3

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

Tensioni ricostruite V_{in}^* nel ratto n°1			
profondità (mm)	PUNTO 1 (Vrms)	PUNTO 2 (Vrms)	PUNTO 3 (Vrms)
1 KHz			
0.0	4.6500	4.5750	4.5000
-1.0	4.9211	4.8947	4.7632
-2.0	5.0000	5.1351	5.0811
-3.0	5.2571	5.4000	5.4571
-4.0	5.5758	5.7879	5.8485
-5.0	5.9355	6.0968	6.2258
1 MHz			
0.0	3.8913	3.6087	3.5870
-1.0	2.7015	2.9851	3.0746
-2.0	1.7358	2.2264	2.3396
-3.0	1.2568	1.8446	2.0068
-4.0	0.9845	1.6907	1.8247
-5.0	0.8333	1.7208	1.8542
4 MHz			
0.0	2.1264	3.2069	3.2299
-1.0	1.3986	2.0608	2.0878
-2.0	1.0000	1.5945	1.6959
-3.0	0.8149	1.4520	1.5765
-4.0	0.6873	1.3944	1.5972
-5.0	0.6088	1.4745	1.6019

Tabella 4.7.: Tensioni ricostruite V_{in}^* nel ratto n°1 nei diversi punti

Tensioni ricostruite V_{in}^* nel ratto n°2			
profondità (mm)	PUNTO 1 (Vrms)	PUNTO 2 (Vrms)	PUNTO 3 (Vrms)
1 MHz			
0.0	1.1522	0.5652	0.4348
-0.5	1.1346	0.6538	0.5577
-1.0	0.9701	0.6418	0.5373
-1.5	0.8000	0.6706	0.5294
-2.0	0.7075	0.6604	0.4906
-2.5	0.6508	0.6667	0.4683
-3.0	0.6014	0.6554	0.4527
-3.5	0.5380	0.6725	0.4386
-4.0	0.5103	0.6649	0.4433
-4.5	0.4840	0.6438	0.4338
-5.0	0.4708	0.6667	0.4292
4 MHz			
0.0	0.9080	0.9310	0.8391
-0.5	0.7297	0.7928	0.6577
-1.0	0.5676	0.6419	0.4932
-1.5	0.4783	0.5652	0.4076
-2.0	0.4286	0.5300	0.3594
-2.5	0.3929	0.5119	0.3254
-3.0	0.3843	0.5267	0.3096
-3.5	0.3668	0.5423	0.3009
-4.0	0.3577	0.5775	0.3014
-5.0	0.3380	0.6065	0.3264

Tabella 4.8.: Tensioni ricostruite V_{in}^* nel ratto n°2 nei diversi punti

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

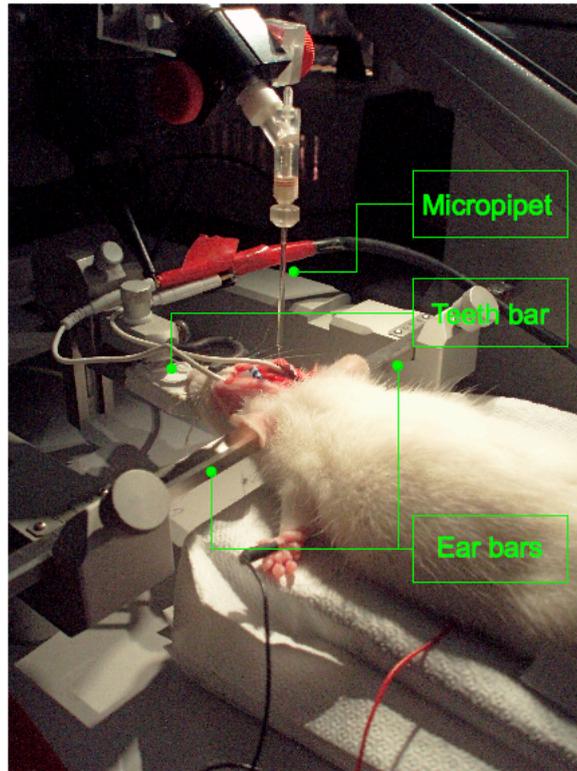


Figura 4.31.: Ratto posizionato nel sistema stereotassico

Le tensioni ricostruite all'ingresso V_{in}^* potranno essere confrontate con le tensioni ottenute dal modello di calcolo a elementi finiti, mostrato in figura 4.32. Dalle considerazioni fatte in precedenza riguardo l'efficienza del metodo di stima, il confronto tra le tensioni ottenute sperimentalmente sul ratto e quelle ottenute dal modello di calcolo dovrà essere effettuato escludendo i punti più superficiali della misura considerando questo maggiormente affidabile a profondità maggiori di 2 mm. Sarà necessario investigare ulteriormente riguardo le cause che determinano l'errore commesso dal metodo di stima nei tratti più superficiali della misura e, se possibile, provare a quantificare questo effetto affinché possa essere eliminato oppure compensato.

4. Misure sperimentali su tessuto cerebrale

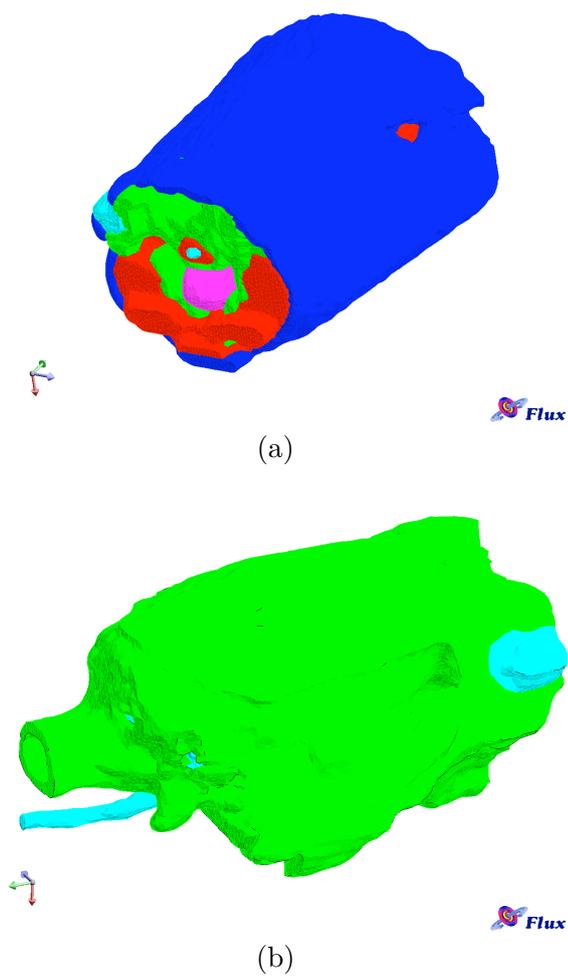


Figura 4.32.: Modello di calcolo a elementi finiti del cranio di ratto: veduta anteriore completa con tutti i tessuti (a) e veduta posteriore solamente dell'osso (b)

5. Conclusioni

Lo scopo di questa tesi è studiare un sistema di misura per valutare la tensione in tessuti biologici per segnali a 4 MHz. I risultati di questa sperimentazione saranno utilizzati per validare un modello di calcolo a elementi finiti.

Nel capitolo 2 è stato affrontato un breve *excursus* riguardante le sorgenti di segnali e i sistemi di misura utilizzati in ambito biomedico. Sono state esaminate le diverse componenti funzionali che costituiscono un sistema per misure biomediche ponendo particolare attenzione alla sorgente di segnale e al sensore che si utilizza.

Nel capitolo 3 sono stati trattati la struttura ed il funzionamento degli elettrodi per biopotenziali che sono indispensabili per poter misurare e registrare i potenziali elettrici che hanno origine all'interno del corpo di un essere vivente. Questi elettrodi costituiscono l'interfaccia tra l'apparecchiatura elettrica di misura e il corpo stesso svolgendo una funzione di trasduzione tra la corrente ionica, presente nel corpo, e la corrente elettronica, nel filo conduttore. È stato analizzato il comportamento elettrico dei microelettrodi metallici e delle micropipette in vetro.

Nel capitolo 4 è stato presentato il sistema di misura utilizzato per effettuare misure di tensione in un tessuto biologico, analizzando nel dettaglio gli strumenti di misura impiegati e ponendo particolare attenzione alla caratterizzazione del sensore. L'obiettivo di queste misure è quello di verificare il potenziale elettrico presente nel cervello di un ratto in alcuni punti nel caso in cui è applicata una differenza di potenziale alla scatola cranica. È stato necessario caratterizzare la strumentazione poiché la frequenza del segnale di tensione sinusoidale applicato alla testa del ratto, ovvero 4 MHz, è maggiore della frequenza di funzionamento dei sistemi d'acquisizione solitamente utilizzati. È stata presentata l'architettura del sistema di misura proposto per effettuare questa tipologia di esperimenti ponendo particolare attenzione alle problematiche connesse alle misure a radio frequenza che hanno reso necessario l'utilizzo di una strumentazione adatta allo scopo.

5. Conclusioni

Il sensore utilizzato per la verifica dei potenziali elettrici presenti all'interno del tessuto cerebrale ha rappresentato l'elemento critico di tutto l'apparato di misura e lo studio delle sue caratteristiche elettriche è risultato essenziale per la corretta interpretazione dei dati raccolti.

L'analisi di diverse tipologie di elettrodi da usare nel sistema di misura ha portato a scegliere la micropipetta in vetro perchè presenta, alle frequenze esaminate, impedenza maggiore degli altri elettrodi.

Poichè a frequenze oltre i 100 kHz l'effetto della capacità della pipetta è più marcato, è stato necessario studiare il comportamento della micropipetta a diverse frequenze e a diverse profondità di immersione nel tessuto biologico. La caratterizzazione dell'elettrodo ha evidenziato l'andamento con cui varia la sua impedenza in funzione della profondità per le frequenze di 1 kHz, 1 MHz e 4 MHz.

Per ridurre l'effetto di dipendenza della misura dalla profondità si è provato ad utilizzare una pipetta ricoperta da uno strato dielettrico (Sylgard®). Il confronto fra il comportamento di una pipetta semplice e quello di una pipetta ricoperta con Sylgard® ha evidenziato una sensibile diminuzione della dipendenza della misura dalla profondità a cui la si effettuata ma che, tuttavia, non è eliminata.

Si è provata a valutare la riproducibilità della misura dell'impedenza utilizzando micropipette differenti per verificare quanto le pipette fossero uguali tra loro e quanto la stesura del Sylgard® influenzasse una eventuale differenza. I risultati hanno evidenziato che lo strato di Sylgard® posto sulle pareti della micropipetta, oltre a non eliminare la dipendenza della misura dalla profondità, introduce un ulteriore effetto di variabilità dovuto all'utilizzo di pipette differenti. Per tale ragione si è deciso di utilizzare la pipetta senza lo strato isolante.

In seguito, è stata valutata l'efficienza del metodo di stima ricostruendo la tensione alla punta della pipetta in una condizione nota. I risultati di questa prova hanno evidenziato come la funzione di trasferimento utilizzata per trasdurre le tensioni all'ingresso della pipetta nelle tensioni d'uscita non sia affidabile nei punti più vicini alla superficie del tessuto. Per valutare le possibili cause è stata condotta un'indagine più dettagliata per capire l'origine di questo fenomeno. Si è escluso che tale andamento possa essere dovuto ad una caduta di potenziale non trascurabile sull'elettrodo di Ag/AgCl e sull'agar mediante la stima dell'impedenza di entrambi i mezzi. I risultati di questa prova hanno permesso di escludere anche l'effetto di partitore di corrente dovuto all'inserimento della micropipetta nel circuito di misura. Tuttavia si è verificato che l'inserimento dell'elettrodo nel mezzo conduttivo può provocare delle variazioni nella tensione realmente presente all'ingresso in maniera dipendente dalla

5. Conclusioni

profondità. Questo effetto può determinare un errore sia nella valutazione dell'impedenza del microelettrodo sia nella ricostruzione dei valori delle tensioni d'ingresso nella prova di simulazione. E' plausibile ritenere che sia un effetto di questo tipo a determinare lo scostamento nei tratti iniziali della misura dei valori calcolati tramite la funzione di trasferimento precedentemente calcolata.

Dopo aver scelto la strumentazione più adatta alla tipologia di esperimento che si vuole effettuare e aver condotto un'analisi approfondita dell'elemento di trasduzione del sistema di misura, si sono eseguite le misure sul ratto. E' stata descritta la pratica chirurgica effettuata sul ratto e il sistema di riferimento su cui è posto l'animale. Le tensioni d'uscita della pipetta misurate durante gli esperimenti effettuati sono state trasdotte mediante la funzione di trasferimento precedentemente calcolata nelle tensioni al suo ingresso. Le tensioni d'ingresso ricostruite saranno confrontate con i risultati ottenuti con un modello a elementi finiti che simula i campi elettrici presenti all'interno del modello elettrico del cranio di un ratto fornendo una prova per convalidare la sua esattezza.

Bibliografia

- [1] Alfredo Ruggeri, Appunti del corso di Strumentazione Biomedica - Concetti base, Università degli Studi di Padova
- [2] John G. Webster, “*Strumentazione Biomedica. Progetto ed applicazioni*”, EdiSES, 2010
- [3] Alfredo Ruggeri, Appunti del corso di Strumentazione Biomedica - Elettrodi per biopotenziali, Università degli Studi di Padova
- [4] Alfredo Ruggeri, Appunti del corso di Strumentazione Biomedica - Sensori elettrochimici, Università degli Studi di Padova
- [5] L. A. Geddes, “*Electrodes and the Measurement of Bioelectric Events*”, New York: John Wiley & Sons, 1989
- [6] L. A. Geddes, L. E. Baker, “*Principles of Applied Biomedical Instrumentation*”, 3rd ed., New York: John Wiley & Sons, 1989
- [7] Douglas C. Smith, “*High Frequency Measurements and Noise in Electronic Circuits*”, New York: Van Nostrand Reinhold, 1993
- [8] C. Offeli, “*Diafonia - Trasformatore - Impedenza di trasferimento*”, Libreria Progetto
- [9] Luigino Benetazzo, “*Misure Elettroniche - Strumentazione Analogica*”, Cleup, 1986
- [10] Bert Sakmann, Erwin Neher, “*Single-channel recording*”, 2nd ed., New York : Plenum Press, 1995
- [11] UNI ISO 5725-1: 2004 “*Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione - Parte 1: Principi generali e definizioni*”

Bibliografia

- [12] UNI ISO 5725-2: 2004 *“Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione - Parte 2: Metodo base per determinare la ripetibilità e la riproducibilità di un metodo di misurazione normalizzato”*

A. Appendice

Si riportano in appendice tutti i dati che sono stati raccolti durante gli esperimenti.

Elettrodo metallico bipolare		
Frequenza (kHz)	Resistenza ($k\Omega$)	Capacità (pF)
1	72.0	3400.0
10	11.9	1130.0
25	8.2	530.0
50	6.2	280.0
100	5.3	149.0
500	3.8	42.0
1000	3.3	28.0
1500	3.1	24.0
2000	2.9	21.9
3000	2.8	19.6
3500	2.8	19.0
4000	2.8	18.6

Elettrodo metallico unipolare		
Frequenza (kHz)	Resistenza ($k\Omega$)	Capacità (pF)
1	195.0	475.00
10	97.0	107.00
25	72.0	59.00
50	55.0	37.00
100	39.0	24.00
500	24.8	7.83
1000	21.5	5.63
1500	19.3	4.82
2000	18.0	4.36
3000	16.0	3.81
3500	15.5	3.60
4000	14.9	3.37

Tabella A.1.: Misure eseguite con l'impedenziometro per l'elettrodo metallico bipolare e unipolare: Resistenza e Capacità

A. Appendice

Micropipetta di vetro senza Sylgard®		
Frequenza (kHz)	Resistenza (k Ω)	Capacità (pF)
1	254.3	3.31
10	252.7	1.87
25	251.2	1.64
50	249.2	1.58
100	241.0	1.65
500	231.0	1.56
1000	195.8	1.52
1500	161.0	1.45
2000	133.0	1.38
3000	103.9	1.21
3500	102.0	1.09
4000	100.1	0.98

Micropipetta di vetro con Sylgard®		
Frequenza (kHz)	Resistenza (k Ω)	Capacità (pF)
1	244	3.00
10	242	1.30
25	240	1.08
50	237	1.01
100	233	1.00
500	231	0.98
1000	219	0.96
1500	204	0.92
2000	190	0.88
3000	180	0.77
3500	185	0.69
4000	241	0.57

Tabella A.2.: Misure eseguite tramite l'impedenziometro per micropipetta di vetro senza e con Sylgard®: Resistenza e Capacità

A. Appendice

Microelettrodo metallico bipolare			
Frequenza (kHz)	Impedenza (k Ω)	Modulo (k Ω)	Fase ($^{\circ}$)
1	21.3915 - 32.9028i	39.2452	-56.9704
10	6.9434 - 5.8665i	9.0899	-40.1945
25	5.5933 - 3.8184i	6.7724	-34.3201
50	4.7786 - 2.6062i	5.4431	-28.6072
100	4.2529 - 2.1102i	4.7477	-26.3898
500	3.0366 - 1.5225i	3.3969	-26.6291
1000	2.4681 - 1.4329i	2.8539	-30.1380
1500	2.0782 - 1.4572i	2.5382	-35.0383
2000	1.7716 - 1.4139i	2.2666	-38.5930
3000	1.3526 - 1.3992i	1.9461	-45.9705
3500	1.1821 - 1.3829i	1.8193	-49.4777
4000	1.0320 - 1.3508i	1.6999	-52.6204

Tabella A.3.: Misure eseguite tramite l'impedenziometro per microelettrodo metallico bipolare: Modulo e Fase

Microelettrodo metallico unipolare			
Frequenza (kHz)	Impedenza (k $\Omega \cdot 10^2$)	Modulo (k Ω)	Fase ($^{\circ}$)
1	1.4566 - 0.8477i	168.5361	-30.1986
10	0.6806 - 0.4438i	81.2498	-33.1096
25	0.4982 - 0.3324i	59.8908	-33.7142
50	0.3904 - 0.2496i	46.3394	-32.5914
100	0.2898 - 0.1704i	33.6173	-30.4600
500	0.1807 - 0.1103i	21.1714	-31.3852
1000	0.1362 - 0.1036i	17.1130	-37.2547
1500	0.1091 - 0.0957i	14.5121	-41.2426
2000	0.0912 - 0.0900i	12.8160	-44.6022
3000	0.0690 - 0.0792i	10.5037	-48.9679
3500	0.0619 - 0.0759i	9.7892	-50.8044
4000	0.0575 - 0.0725i	9.2537	-51.6067

Tabella A.4.: Misure eseguite tramite l'impedenziometro per microelettrodo metallico unipolare: Modulo e Fase

A. Appendice

Micropipetta di vetro senza Sylgard®			
Frequenza (kHz)	Impedenza ($k\Omega \cdot 10^2$)	Modulo ($k\Omega$)	Fase ($^\circ$)
1	2.5429 - 0.0134i	254.2964	-0.3030
10	2.5248 - 0.0750i	252.5887	-1.7007
25	2.5015 - 0.1619i	250.6757	-3.7025
50	2.4544 - 0.3036i	247.3151	-7.0514
100	2.2684 - 0.5668i	233.8125	-14.0282
500	1.0124 - 1.1462i	152.9278	-48.5455
1000	0.4354 - 0.8142i	92.3337	-61.8636
1500	0.2756 - 0.6065i	66.6169	-65.5581
2000	0.2105 - 0.4854i	52.9061	-66.5599
3000	0.1571 - 0.3722i	40.3950	-67.1209
3500	0.1450 - 0.3562i	38.4622	-67.8471
4000	0.1414 - 0.3487i	37.6237	-67.9224

Tabella A.5.: Misure eseguite tramite l'impedenziometro per micropipetta di vetro senza Sylgard®: Modulo e Fase

Micropipetta di vetro con Sylgard®			
Frequenza (kHz)	Impedenza ($k\Omega \cdot 10^2$)	Modulo ($k\Omega$)	Fase ($^\circ$)
1	2.4399 - 0.0112i	243.9974	-0.2635
10	2.4191 - 0.0478i	241.9527	-1.1324
25	2.3960 - 0.0976i	239.8013	-2.3315
50	2.3567 - 0.1772i	236.3327	-4.3006
100	2.2811 - 0.3340i	230.5426	-8.3288
500	1.5341 - 1.0910i	188.2473	-35.4202
1000	0.7978 - 1.0539i	132.1827	-52.8737
1500	0.4941 - 0.8740i	100.3964	-60.5187
2000	0.3509 - 0.7373i	81.6526	-64.5483
3000	0.2300 - 0.6009i	64.3456	-69.0548
3500	0.2083 - 0.5848i	62.0812	-70.3925
4000	0.1865 - 0.6440i	67.0489	-73.8465

Tabella A.6.: Misure eseguite tramite l'impedenziometro per micropipetta di vetro con Sylgard®: Modulo e Fase

A. Appendice

Micropipetta in vetro senza Sylgard® senza piano di massa			
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	Sfasamento (°)
1 kHz			
0.0	3.530	16.8	0
-0.5	3.530	16.1	0
-1.0	3.529	15.8	0
-1.5	3.529	15.4	0
-2.0	3.529	15.2	0
-2.5	3.529	15.1	0
-3.0	3.529	14.9	0
-3.5	3.529	14.8	0
-4.0	3.529	14.8	0
-4.5	3.529	14.8	0
-5.0	3.529	14.8	0
1 MHz			
0.0	3.632	19.6	-16
-0.5	3.632	20.9	-25
-1.0	3.632	26.3	-37
-1.5	3.632	31.5	-43
-2.0	3.632	38.3	-46
-2.5	3.632	45.7	-49
-3.0	3.632	53.9	-51
-3.5	3.632	64.8	-52
-4.0	3.632	73.5	-53
-4.5	3.632	83.6	-54
-5.0	3.632	93.2	-55
4 MHz			
0.0	3.670	35.2	-32
-0.5	3.670	45.9	-30
-1.0	3.668	56.0	-27
-1.5	3.667	72.0	-23
-2.0	3.667	86.4	-20
-2.5	3.666	101.2	-18
-3.0	3.665	117.2	-17
-3.5	3.664	134.0	-16
-4.0	3.664	151.4	-16
-4.5	3.663	170.2	-15
-5.0	3.662	188.2	-15

Tabella A.7.: Prove di caratterizzazione di una micropipetta di vetro senza Sylgard® senza piano di massa

A. Appendice

Micropipetta in vetro senza Sylgard® con piano di massa			
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	Sfasamento (°)
1 kHz			
0.0	3.532	14.3	1
-0.5	3.532	14.3	1
-1.0	3.532	14.3	1
-1.5	3.532	14.3	1
-2.0	3.532	13.9	1
-2.5	3.532	13.9	1
-3.0	3.532	13.8	1
-3.5	3.532	13.8	1
-4.0	3.532	13.8	1
-4.5	3.532	13.6	1
-5.0	3.532	13.6	1
1 MHz			
0.0	3.633	16.8	-19
-0.5	3.633	18.9	-27
-1.0	3.633	24.6	-39
-1.5	3.632	32.7	-45
-2.0	3.632	41.7	-49
-2.5	3.632	50.3	-51
-3.0	3.632	55.5	-52
-3.5	3.632	64.6	-53
-4.0	3.632	75.0	-54
-4.5	3.632	86.4	-55
-5.0	3.632	96.5	-55
4 MHz			
0.0	3.693	30.8	-32
-0.5	3.692	41.6	-31
-1.0	3.691	58.4	-26
-1.5	3.691	75.9	-21
-2.0	3.690	93.9	-19
-2.5	3.690	103.2	-18
-3.0	3.689	118.4	-17
-3.5	3.688	135.2	-16
-4.0	3.688	154.1	-15
-4.5	3.687	173.9	-15
-5.0	3.687	191.5	-15

Tabella A.8.: Prove di caratterizzazione di una micropipetta di vetro senza Sylgard® con piano di massa

A. Appendice

Micropipetta in vetro con Sylgard® senza piano di massa			
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	Sfasamento (°)
1 kHz			
0.0	3.522	6.4	0
-0.5	3.522	16.9	0
-1.0	3.522	16.9	0
-1.5	3.522	16.5	0
-2.0	3.522	16.2	0
-2.5	3.522	16.3	0
-3.0	3.522	16.4	0
-3.5	3.522	16.6	0
-4.0	3.522	16.6	0
-4.5	3.522	16.3	0
-5.0	3.522	15.9	0
1 MHz			
0.0	3.629	19.4	-19
-0.5	3.629	21.3	-25
-1.0	3.629	24.9	-33
-1.5	3.629	29.0	-40
-2.0	3.629	32.9	-43
-2.5	3.629	36.0	-45
-3.0	3.629	39.0	-48
-3.5	3.629	43.0	-50
-4.0	3.629	46.9	-54
-4.5	3.629	51.0	-56
-5.0	3.629	52.8	-58
4 MHz			
0.0	3.668	32.0	-32
-0.5	3.668	39.9	-32
-1.0	3.667	51.7	-30
-1.5	3.667	64.1	-29
-2.0	3.666	75.2	-27
-2.5	3.666	84.0	-27
-3.0	3.665	93.8	-27
-3.5	3.665	104.6	-30
-4.0	3.665	107.2	-35
-4.5	3.665	123.2	-35
-5.0	3.665	131.9	-35

Tabella A.9.: Prove di caratterizzazione di una micropipetta di vetro con Sylgard® senza piano di massa

A. Appendice

Micropipetta in vetro con Sylgard® con piano di massa			
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	Sfasamento (°)
1 kHz			
0.0	3.524	17.1	0
-0.5	3.524	16.5	0
-1.0	3.524	16.1	0
-1.5	3.524	15.6	0
-2.0	3.524	15.5	0
-2.5	3.524	15.4	0
-3.0	3.524	14.9	0
-3.5	3.524	14.6	0
-4.0	3.524	14.5	0
-4.5	3.524	15.1	0
-5.0	3.524	15.3	0
1 MHz			
0.0	3.632	19.3	-18
-0.5	3.632	21.1	-22
-1.0	3.632	24.1	-31
-1.5	3.632	28.5	-39
-2.0	3.632	32.2	-43
-2.5	3.632	35.5	-46
-3.0	3.632	38.4	-49
-3.5	3.632	42.5	-49
-4.0	3.632	48.5	-52
-4.5	3.632	54.4	-55
-5.0	3.632	59.5	-57
4 MHz			
0.0	3.691	33.0	-30
-0.5	3.691	42.3	-29
-1.0	3.691	58.1	-28
-1.5	3.690	70.8	-27
-2.0	3.690	82.3	-26
-2.5	3.689	89.4	-26
-3.0	3.689	96.8	-27
-3.5	3.689	108.2	-27
-4.0	3.689	114.8	-30
-4.5	3.689	122.5	-32
-5.0	3.689	140.4	-34

Tabella A.10.: Prove di caratterizzazione di una micropipetta di vetro con Sylgard® con piano di massa

A. Appendice

Micropipetta in vetro senza Sylgard® n° 1				
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	Sfasamento (°)	Impedenza ($\Omega \cdot 10^5$)
1 kHz				
0.0	3.5450	14.6	0.0	2.4181
-0.5	3.5450	14.5	0.0	2.4348
-1.0	3.5457	14.6	0.0	2.4186
-1.5	3.5457	14.2	0.0	2.4870
-2.0	3.5445	13.8	0.0	2.5585
-2.5	3.5445	13.6	0.0	2.5962
-3.0	3.5445	13.0	0.0	2.7165
-3.5	3.5444	13.0	0.0	2.7165
-4.0	3.5444	12.6	0.0	2.8030
-4.5	3.5443	12.5	0.0	2.8254
-5.0	3.5443	12.1	0.0	2.9192
1 MHz				
0.0	3.599	17.7	-19	1.9126 - 0.6620i
-0.5	3.599	19.1	-23	1.7245 - 0.7363i
-1.0	3.599	23.5	-33	1.2744 - 0.8341i
-1.5	3.599	29.5	-40	0.9246 - 0.7842i
-2.0	3.598	36.6	-44	0.6972 - 0.6829i
-2.5	3.598	44.2	-47	0.5452 - 0.5953i
-3.0	3.598	51.6	-49	0.4475 - 0.5262i
-3.5	3.597	59.6	-50	0.3779 - 0.4623i
-4.0	3.597	67.9	-51	0.3234 - 0.4117i
-4.5	3.597	76.5	-52	0.2795 - 0.3705i
-5.0	3.597	85.2	-53	0.2441 - 0.3372i
4 MHz				
0.0	3.636	31.0	-28	1.0256 - 0.5506i
-0.5	3.636	39.8	-28	0.7966 - 0.4289i
-1.0	3.635	54.5	-25	0.5945 - 0.2819i
-1.5	3.634	68.7	-21	0.4838 - 0.1896i
-2.0	3.633	82.7	-18	0.4078 - 0.1358i
-2.5	3.633	96.5	-15	0.3536 - 0.0974i
-3.0	3.632	110.0	-14	0.3104 - 0.0799i
-3.5	3.631	126.0	-14	0.2696 - 0.0697i
-4.0	3.630	141.2	-14	0.2394 - 0.0622i
-4.5	3.629	159.2	-14	0.2112 - 0.0551i
-5.0	3.629	176.7	-14	0.1893 - 0.0497i

Tabella A.11.: Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta senza Sylgard® n°1

A. Appendice

Micropipetta in vetro senza Sylgard® n° 2				
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	Sfasamento (°)	Impedenza ($\Omega \cdot 10^5$)
1 kHz				
0.0	3.5429	13.9	0.0	2.5388
-0.5	3.5429	13.5	0.0	2.6144
-1.0	3.5429	12.3	0.0	2.8704
-1.5	3.5428	11.8	0.0	2.9924
-2.0	3.5426	11.5	0.0	3.0705
-2.5	3.5426	11.1	0.0	3.1815
-3.0	3.5426	10.7	0.0	3.3008
-3.5	3.5426	10.5	0.0	3.3639
-4.0	3.5426	9.8	0.0	3.6049
-4.5	3.5426	9.5	0.0	3.7191
-5.0	3.5426	9.0	0.0	3.9262
1 MHz				
0.0	3.599	16.5	-22	2.0124 - 0.8171i
-0.5	3.599	19.2	-32	1.5796 - 0.9933i
-1.0	3.599	25.2	-42	1.0513 - 0.9556i
-1.5	3.598	32.7	-47	0.7404 - 0.8047i
-2.0	3.598	40.8	-48	0.5801 - 0.6554i
-2.5	3.597	48.7	-48	0.4842 - 0.5489i
-3.0	3.596	55.6	-48	0.4228 - 0.4806i
-3.5	3.596	62.9	-49	0.3651 - 0.4315i
-4.0	3.596	71.3	-49	0.3209 - 0.3806i
-4.5	3.596	79.5	-49	0.2868 - 0.3414i
-5.0	3.596	87.5	-50	0.2542 - 0.3148i
4 MHz				
0.0	3.634	32.2	-36	0.9030 - 0.6634i
-0.5	3.634	43.0	-32	0.7067 - 0.4478i
-1.0	3.633	56.6	-25	0.5717 - 0.2713i
-1.5	3.632	69.9	-20	0.4783 - 0.1777i
-2.0	3.632	82.4	-16	0.4137 - 0.1215i
-2.5	3.631	93.8	-13	0.3672 - 0.0871i
-3.0	3.630	105.47	-12	0.3266 - 0.0716i
-3.5	3.629	118.0	-10	0.2929 - 0.0534i
-4.0	3.629	129.3	-9	0.2672 - 0.0439i
-4.5	3.628	140.6	-9	0.2449 - 0.0404i
-5.0	3.628	153.7	-8	0.2237 - 0.0329i

Tabella A.12.: Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta senza Sylgard® n°2

A. Appendice

Micropipetta in vetro senza Sylgard® n° 3				
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	Sfasamento (°)	Impedenza ($\Omega \cdot 10^5$)
1 kHz				
0.0	3.541	13.9	0.0	2.5375
-0.5	3.541	13.9	0.0	2.5375
-1.0	3.541	13.9	0.0	2.5375
-1.5	3.541	13.9	0.0	2.5375
-2.0	3.541	13.9	0.0	2.5375
-2.5	3.541	13.9	0.0	2.5375
-3.0	3.541	13.8	0.0	2.5559
-3.5	3.541	13.8	0.0	2.5559
-4.0	3.541	13.7	0.0	2.5747
-4.5	3.541	13.7	0.0	2.5747
-5.0	3.541	13.7	0.0	2.5747
1 MHz				
0.0	3.597	16.5	-21	2.0252 - 0.7812i
-0.5	3.597	18.8	-26	1.7097 - 0.8387i
-1.0	3.596	24.1	-34	1.2270 - 0.8344i
-1.5	3.596	29.7	-40	0.9175 - 0.7783i
-2.0	3.596	36.5	-43	0.7105 - 0.6719i
-2.5	3.596	44.2	-46	0.5552 - 0.5852i
-3.0	3.596	51.9	-47	0.4625 - 0.5067i
-3.5	3.596	61.6	-48	0.3806 - 0.4338i
-4.0	3.596	69.9	-49	0.3275 - 0.3883i
-4.5	3.596	78.5	-50	0.2845 - 0.3509i
-5.0	3.596	86.0	-50	0.2588 - 0.3203i
4 MHz				
0.0	3.633	31.4	-33	0.9604 - 0.6301i
-0.5	3.633	38.3	-32	0.7944 - 0.5027i
-1.0	3.633	52.4	-26	0.6131 - 0.3039i
-1.5	3.631	65.5	-21	0.5075 - 0.1987i
-2.0	3.630	78.0	-17	0.4351 - 0.1361i
-2.5	3.630	93.8	-15	0.3638 - 0.1002i
-3.0	3.629	103.2	-13	0.3326 - 0.0791i
-3.5	3.629	117.1	-12	0.2931 - 0.0644i
-4.0	3.628	129.4	-11	0.2652 - 0.0535i
-4.5	3.627	144.8	-10	0.2367 - 0.0435i
-5.0	3.626	157.0	-10	0.2175 - 0.0401i

Tabella A.13.: Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta senza Sylgard® n°3

A. Appendice

Micropipetta in vetro senza Sylgard® n° 4				
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	Sfasamento (°)	Impedenza ($\Omega \cdot 10^5$)
1 kHz				
0.0	3.540	13.1	0.0	2.6923
-0.5	3.540	12.9	0.0	2.7342
-1.0	3.540	12.6	0.0	2.7995
-1.5	3.540	12.5	0.0	2.8220
-2.0	3.540	12.3	0.0	2.8680
-2.5	3.540	12.0	0.0	2.9400
-3.0	3.540	11.9	0.0	2.9648
-3.5	3.540	11.8	0.0	2.9900
-4.0	3.540	11.5	0.0	3.0683
-4.5	3.540	11.4	0.0	3.0953
-5.0	3.540	10.8	0.0	3.2678
1 MHz				
0.0	3.597	16.1	-19	2.1024 - 0.7274i
-0.5	3.597	18.3	-28	1.7255 - 0.9228i
-1.0	3.597	23.5	-40	1.1625 - 0.9839i
-1.5	3.596	30.8	-45	0.8156 - 0.8256i
-2.0	3.596	38.4	-47	0.6287 - 0.6849i
-2.5	3.596	45.1	-48	0.5235 - 0.5925i
-3.0	3.596	54.4	-49	0.4237 - 0.4989i
-3.5	3.596	63.1	-50	0.3563 - 0.4366i
-4.0	3.596	72.4	-50	0.3093 - 0.3805i
-4.5	3.595	85.0	-50	0.2619 - 0.3240i
-5.0	3.595	90.6	-50	0.2451 - 0.3040i
4 MHz				
0.0	3.633	30.3	-36	0.9600 - 0.7048i
-0.5	3.633	39.4	-32	0.7720 - 0.4886i
-1.0	3.632	52.9	-25	0.6122 - 0.2902i
-1.5	3.631	65.4	-19	0.5150 - 0.1808i
-2.0	3.630	77.0	-16	0.4432 - 0.1299i
-2.5	3.630	88.3	-13	0.3906 - 0.0925i
-3.0	3.629	95.2	-12	0.3629 - 0.0793i
-3.5	3.629	110.6	-10	0.3131 - 0.0570i
-4.0	3.628	123.2	-9	0.2808 - 0.0461i
-4.5	3.628	141.4	-9	0.2434 - 0.0401i
-5.0	3.627	152.8	-8	0.2251 - 0.0330i

Tabella A.14.: Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta senza Sylgard® n°4

A. Appendice

Micropipetta in vetro senza Sylgard® n° 5				
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	Sfasamento (°)	Impedenza ($\Omega \cdot 10^5$)
1 kHz				
0.0	3.540	14.3	0.0	2.4655
-0.5	3.540	13.9	0.0	2.5368
-1.0	3.540	12.4	0.0	2.8448
-1.5	3.540	12.4	0.0	2.8448
-2.0	3.540	12.2	0.0	2.8916
-2.5	3.540	12.1	0.0	2.9156
-3.0	3.540	11.6	0.0	3.0417
-3.5	3.540	10.3	0.0	3.4269
-4.0	3.540	9.6	0.0	3.6775
-4.5	3.540	8.9	0.0	3.9675
-5.0	3.540	8.2	0.0	4.3071
1 MHz				
0.0	3.597	15.3	-22	2.1698 - 0.8807i
-0.5	3.597	17.4	-31	1.7620 - 1.0647i
-1.0	3.597	22.9	-39	1.2107 - 0.9885i
-1.5	3.597	29.6	-44	0.8641 - 0.8442i
-2.0	3.597	36.6	-46	0.6727 - 0.7070i
-2.5	3.596	43.8	-48	0.5394 - 0.6101i
-3.0	3.596	51.6	-49	0.4472 - 0.5260i
-3.5	3.596	59.5	-49	0.3865 - 0.4561i
-4.0	3.596	66.2	-49	0.3464 - 0.4100i
-4.5	3.596	74.0	-49	0.3088 - 0.3667i
-5.0	3.596	82.1	-49	0.2774 - 0.3306i
4 MHz				
0.0	3.633	31.6	-39	0.8835 - 0.7235i
-0.5	3.633	40.8	-33	0.7368 - 0.4850i
-1.0	3.632	51.8	-26	0.6202 - 0.3074i
-1.5	3.631	62.9	-21	0.5289 - 0.2069i
-2.0	3.631	73.6	-17	0.4618 - 0.1442i
-2.5	3.630	84.0	-14	0.4093 - 0.1045i
-3.0	3.630	94.5	-12	0.3657 - 0.0799i
-3.5	3.629	105.3	-10	0.3294 - 0.0599i
-4.0	3.629	119.4	-10	0.2893 - 0.0528i
-4.5	3.628	132.1	-9	0.2613 - 0.0430i
-5.0	3.627	144.7	-8	0.2382 - 0.0349i

Tabella A.15.: Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta senza Sylgard® n°5

A. Appendice

Micropipetta in vetro senza Sylgard® n° 6				
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	Sfasamento (°)	Impedenza ($\Omega \cdot 10^5$)
1 kHz				
0.0	3.5316	15.4	0.0	2.2832
-0.5	3.5316	15.4	0.0	2.2832
-1.0	3.5316	15.2	0.0	2.3134
-1.5	3.5316	14.9	0.0	2.3602
-2.0	3.5317	14.6	0.0	2.4090
-2.5	3.5317	14.3	0.0	2.4597
-3.0	3.5320	13.9	0.0	2.5310
-3.5	3.5320	13.5	0.0	2.6063
-4.0	3.5322	13.1	0.0	2.6863
-4.5	3.5322	12.9	0.0	2.7281
-5.0	3.5323	12.2	0.0	2.8853
1 MHz				
0.0	3.57	17.8	-19	1.8863 - 0.6530i
-0.5	3.57	20.0	-26	1.5943 - 0.7825i
-1.0	3.57	25.5	-35	1.1368 - 0.8030i
-1.5	3.57	31.9	-40	0.8473 - 0.7194i
-2.0	3.57	38.9	-42	0.6720 - 0.6141i
-2.5	3.57	46.5	-44	0.5423 - 0.5333i
-3.0	3.57	54.4	-45	0.4540 - 0.4640i
-3.5	3.57	62.2	-46	0.3887 - 0.4129i
-4.0	3.57	69.9	-47	0.3383 - 0.3735i
-4.5	3.57	77.4	-47	0.3046 - 0.3373i
-5.0	3.57	85.0	-48	0.2710 - 0.3121i
4 MHz				
0.0	3.60	32.1	-32	0.9411 - 0.5943i
-0.5	3.60	39.5	-31	0.7712 - 0.4694i
-1.0	3.60	53.8	-24	0.6013 - 0.2722i
-1.5	3.60	67.0	-19	0.4980 - 0.1749i
-2.0	3.60	79.3	-15	0.4285 - 0.1175i
-2.5	3.60	91.1	-13	0.3750 - 0.0889i
-3.0	3.60	103.3	-11	0.3321 - 0.0665i
-3.5	3.60	116.4	-9	0.2955 - 0.0484i
-4.0	3.60	129.9	-8	0.2644 - 0.0386i
-4.5	3.60	142.4	-8	0.2404 - 0.0352i
-5.0	3.60	154.1	-7	0.2219 - 0.0285i

Tabella A.16.: Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta senza Sylgard® n°6

A. Appendice

Vout / Vin per micropipetta senza Sylgard®						
profondità (mm)	n° 1	n° 2	n° 3	n° 4	n° 5	n° 6
1 kHz						
0.0	0.0041	0.0039	0.0039	0.0037	0.0040	0.0044
-0.5	0.0041	0.0038	0.0039	0.0036	0.0039	0.0044
-1.0	0.0041	0.0035	0.0039	0.0036	0.0035	0.0043
-1.5	0.0040	0.0033	0.0039	0.0035	0.0035	0.0042
-2.0	0.0039	0.0032	0.0039	0.0035	0.0034	0.0041
-2.5	0.0038	0.0031	0.0039	0.0034	0.0034	0.0040
-3.0	0.0037	0.0030	0.0039	0.0034	0.0033	0.0039
-3.5	0.0037	0.0030	0.0039	0.0033	0.0029	0.0038
-4.0	0.0036	0.0028	0.0039	0.0032	0.0027	0.0037
-4.5	0.0035	0.0027	0.0039	0.0032	0.0025	0.0037
-5.0	0.0034	0.0025	0.0039	0.0031	0.0023	0.0035
1 MHz						
0.0	0.0049	0.0046	0.0046	0.0045	0.0043	0.0050
-0.5	0.0053	0.0053	0.0052	0.0051	0.0048	0.0056
-1.0	0.0065	0.0070	0.0067	0.0065	0.0064	0.0071
-1.5	0.0082	0.0091	0.0083	0.0086	0.0082	0.0089
-2.0	0.0102	0.0113	0.0102	0.0107	0.0102	0.0109
-2.5	0.0123	0.0135	0.0123	0.0125	0.0122	0.0130
-3.0	0.0143	0.0155	0.0144	0.0151	0.0143	0.0152
-3.5	0.0166	0.0175	0.0171	0.0175	0.0165	0.0174
-4.0	0.0189	0.0198	0.0194	0.0201	0.0184	0.0196
-4.5	0.0213	0.0221	0.0218	0.0236	0.0206	0.0217
-5.0	0.0237	0.0243	0.0239	0.0252	0.0228	0.0238
4 MHz						
0.0	0.0085	0.0089	0.0086	0.0083	0.0087	0.0089
-0.5	0.0109	0.0118	0.0105	0.0108	0.0112	0.0110
-1.0	0.0150	0.0156	0.0144	0.0146	0.0143	0.0149
-1.5	0.0189	0.0192	0.0180	0.0180	0.0173	0.0186
-2.0	0.0228	0.0227	0.0215	0.0212	0.0203	0.0220
-2.5	0.0266	0.0258	0.0258	0.0243	0.0231	0.0253
-3.0	0.0303	0.0291	0.0284	0.0262	0.0260	0.0287
-3.5	0.0347	0.0325	0.0323	0.0305	0.0290	0.0323
-4.0	0.0389	0.0356	0.0357	0.0340	0.0329	0.0361
-4.5	0.0439	0.0388	0.0399	0.0390	0.0364	0.0396
-5.0	0.0487	0.0424	0.0433	0.0421	0.0399	0.0428

Tabella A.17.: Prove di ripetibilità: Vout / Vin per micropipette senza Sylgard®

A. Appendice

Valor medio dell'impedenza della micropipetta senza Sylgard®				
profondità (mm)	Impedenza ($\Omega \cdot 10^5$)	Modulo ($\Omega \cdot 10^5$)	Fase ($^\circ$)	Vout / Vin ()
1 kHz				
0.0	2.4892	2.4892	0.0	0.0040
-0.5	2.5235	2.5235	0.0	0.0040
-1.0	2.6307	2.6307	0.0	0.0038
-1.5	2.6740	2.6740	0.0	0.0038
-2.0	2.7225	2.7225	0.0	0.0037
-2.5	2.7718	2.7718	0.0	0.0036
-3.0	2.8518	2.8518	0.0	0.0035
-3.5	2.9432	2.9432	0.0	0.0034
-4.0	3.0691	3.0691	0.0	0.0033
-4.5	3.1517	3.1517	0.0	0.0032
-5.0	3.3134	3.3134	0.0	0.0031
1 MHz				
0.0	2.0181 - 0.7536i	2.1542	-20.3333	0.0046
-0.5	1.6826 - 0.8897i	1.9034	-27.6667	0.0052
-1.0	1.1771 - 0.8999i	1.4817	-37.1667	0.0067
-1.5	0.8516 - 0.7927i	1.1634	-42.6667	0.0085
-2.0	0.6602 - 0.6693i	0.9401	-45.0000	0.0106
-2.5	0.5316 - 0.5776i	0.7850	-46.8333	0.0126
-3.0	0.4429 - 0.5004i	0.6683	-47.8333	0.0148
-3.5	0.3759 - 0.4389i	0.5778	-48.6667	0.0171
-4.0	0.3276 - 0.3908i	0.5099	-49.1667	0.0194
-4.5	0.2877 - 0.3485i	0.4519	-49.5000	0.0219
-5.0	0.2584 - 0.3198i	0.4112	-50.0000	0.0240
4 MHz				
0.0	0.9456 - 0.6445i	1.1443	-34.0000	0.0087
-0.5	0.7630 - 0.4704i	0.8963	-31.3333	0.0111
-1.0	0.6022 - 0.2878i	0.6674	-25.1667	0.0148
-1.5	0.5019 - 0.1881i	0.5360	-20.1667	0.0184
-2.0	0.4317 - 0.1308i	0.4511	-16.5000	0.0217
-2.5	0.3766 - 0.0951i	0.3884	-13.8333	0.0252
-3.0	0.3384 - 0.0760i	0.3468	-12.3333	0.0281
-3.5	0.2989 - 0.0588i	0.3047	-10.8333	0.0319
-4.0	0.2678 - 0.0495i	0.2723	-10.1667	0.0355
-4.5	0.2396 - 0.0429i	0.2434	-9.8333	0.0396
-5.0	0.2193 - 0.0365i	0.2223	-9.1667	0.0432

Tabella A.18.: Prove di ripetibilità per la caratterizzazione della micropipetta senza Sylgard®: valor medio dell'impedenza

A. Appendice

Micropipetta in vetro con Sylgard® n° 1				
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	Sfasamento (°)	Impedenza ($\Omega \cdot 10^5$)
1 kHz				
0.0	3.541	13.2	0.0	2.6726
-0.5	3.541	13.1	0.0	2.6931
-1.0	3.541	13.0	0.0	2.7138
-1.5	3.541	12.9	0.0	2.7350
-2.0	3.541	12.9	0.0	2.7350
-2.5	3.541	12.9	0.0	2.7350
-3.0	3.541	12.9	0.0	2.7350
-3.5	3.541	12.9	0.0	2.7350
-4.0	3.541	12.9	0.0	2.7350
-4.5	3.541	13.0	0.0	2.7138
-5.0	3.541	13.0	0.0	2.7138
1 MHz				
0.0	3.596	17.9	-21	1.8655 - 0.7199i
-0.5	3.596	19.9	-29	1.5705 - 0.8761i
-1.0	3.596	23.2	-35	1.2597 - 0.8890i
-1.5	3.596	26.5	-39	1.0446 - 0.8540i
-2.0	3.596	29.4	-42	0.8990 - 0.8184i
-2.5	3.596	33.8	-45	0.7423 - 0.7523i
-3.0	3.596	37.3	-47	0.6475 - 0.7051i
-3.5	3.596	41.4	-49	0.5599 - 0.6555i
-4.0	3.596	45.4	-50	0.4991 - 0.6068i
-4.5	3.596	49.7	-51	0.4453 - 0.5623i
-5.0	3.596	55.1	-53	0.3828 - 0.5212i
4 MHz				
0.0	3.632	32.6	-31	0.9450 - 0.5738i
-0.5	3.632	41.6	-30	0.7461 - 0.4365i
-1.0	3.631	52.5	-27	0.6062 - 0.3140i
-1.5	3.631	61.9	-25	0.5216 - 0.2479i
-2.0	3.630	70.6	-24	0.4597 - 0.2091i
-2.5	3.630	79.8	-23	0.4087 - 0.1777i
-3.0	3.629	89.2	-22	0.3672 - 0.1524i
-3.5	3.629	98.0	-22	0.3333 - 0.1387i
-4.0	3.628	108.6	-21	0.3019 - 0.1197i
-4.5	3.628	119.8	-21	0.2727 - 0.1085i
-5.0	3.628	133.2	-21	0.2443 - 0.0976i

Tabella A.19.: Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta con Sylgard® n°1

A. Appendice

Micropipetta in vetro con Sylgard® n° 2				
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	Sfasamento (°)	Impedenza ($\Omega \cdot 10^5$)
1 kHz				
0.0	3.538	10.3	-1	3.4250
-0.5	3.538	10.1	-1	3.4930
-1.0	3.538	9.9	-1	3.5637
-1.5	3.538	9.8	-1	3.6002
-2.0	3.538	9.8	-1	3.6002
-2.5	3.538	9.7	-1	3.6374
-3.0	3.538	9.7	-1	3.6374
-3.5	3.538	9.7	-1	3.6374
-4.0	3.538	9.8	-1	3.6002
-4.5	3.538	9.8	-1	3.6002
-5.0	3.538	9.8	-1	3.6002
1 MHz				
0.0	3.595	15.4	-24	2.1226 - 0.9495i
-0.5	3.595	17.5	-32	1.7321 - 1.0886i
-1.0	3.595	21.4	-39	1.2955 - 1.0572i
-1.5	3.595	25.7	-44	0.9962 - 0.9717i
-2.0	3.595	30.1	-46	0.8197 - 0.8591i
-2.5	3.594	34.4	-49	0.6754 - 0.7885i
-3.0	3.594	38.7	-51	0.5744 - 0.7217i
-3.5	3.594	43.5	-52	0.4987 - 0.6511i
-4.0	3.594	45.9	-54	0.4502 - 0.6335i
-4.5	3.594	57.1	-55	0.3510 - 0.5156i
-5.0	3.594	62.7	-56	0.3105 - 0.4752i
4 MHz				
0.0	3.632	31.4	-36	0.9258 - 0.6799i
-0.5	3.631	40.3	-33	0.7456 - 0.4907i
-1.0	3.630	50.6	-28	0.6234 - 0.3368i
-1.5	3.630	61.5	-25	0.5249 - 0.2495i
-2.0	3.629	71.7	-23	0.4559 - 0.1978i
-2.5	3.629	80.7	-22	0.4069 - 0.1685i
-3.0	3.629	90.0	-22	0.3639 - 0.1510i
-3.5	3.628	103.5	-22	0.3150 - 0.1313i
-4.0	3.627	125.8	-22	0.2573 - 0.1080i
-4.5	3.627	138.5	-22	0.2328 - 0.0981i
-5.0	3.627	148.8	-22	0.2160 - 0.0913i

Tabella A.20.: Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta con Sylgard® n°2

A. Appendice

Micropipetta in vetro con Sylgard® n° 3				
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	Sfasamento (°)	Impedenza ($\Omega \cdot 10^5$)
1 kHz				
0.0	3.538	18.1	0	1.9447
-0.5	3.538	17.9	-1	1.9665
-1.0	3.538	17.9	-1	1.9665
-1.5	3.538	17.7	-1	1.9889
-2.0	3.538	17.6	-1	2.0002
-2.5	3.538	17.5	-1	2.0117
-3.0	3.538	17.4	-1	2.0233
-3.5	3.538	17.3	-1	2.0351
-4.0	3.538	17.3	-1	2.0351
-4.5	3.538	17.2	-1	2.0470
-5.0	3.538	17.2	-1	2.0470
1 MHz				
0.0	3.594	19.3	-17	1.7708 - 0.5444i
-0.5	3.594	20.6	-22	1.6076 - 0.6536i
-1.0	3.594	23.4	-30	1.3201 - 0.7679i
-1.5	3.594	26.2	-34	1.1272 - 0.7671i
-2.0	3.594	29.0	-38	0.9666 - 0.7630i
-2.5	3.594	31.9	-41	0.8403 - 0.7391i
-3.0	3.594	34.5	-43	0.7519 - 0.7105i
-3.5	3.594	37.5	-45	0.6677 - 0.6777i
-4.0	3.594	41.0	-47	0.5878 - 0.6411i
-4.5	3.594	45.0	-49	0.5140 - 0.6028i
-5.0	3.594	49.6	-51	0.4460 - 0.5631i
4 MHz				
0.0	3.631	32.4	-30	0.9605 - 0.5603i
-0.5	3.630	40.0	-30	0.7759 - 0.4537i
-1.0	3.630	49.1	-28	0.6428 - 0.3471i
-1.5	3.630	58.3	-26	0.5496 - 0.2729i
-2.0	3.629	66.6	-25	0.4838 - 0.2303i
-2.5	3.629	74.7	-24	0.4338 - 0.1976i
-3.0	3.629	82.6	-24	0.3914 - 0.1787i
-3.5	3.629	90.8	-24	0.3551 - 0.1626i
-4.0	3.628	101.0	-24	0.3182 - 0.1461i
-4.5	3.628	112.1	-24	0.2857 - 0.1316i
-5.0	3.627	124.2	-24	0.2568 - 0.1188i

Tabella A.21.: Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta con Sylgard® n°3

A. Appendice

Micropipetta in vetro con Sylgard® n° 4				
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	Sfasamento (°)	Impedenza ($\Omega \cdot 10^5$)
1 kHz				
0.0	3.536	15.1	-2	2.3317
-0.5	3.536	15.1	-2	2.3317
-1.0	3.536	15.1	-2	2.3317
-1.5	3.536	15.1	-2	2.3317
-2.0	3.536	15.1	-2	2.3317
-2.5	3.536	15.0	-2	2.3473
-3.0	3.536	14.9	-2	2.3632
-3.5	3.536	14.8	-2	2.3792
-4.0	3.536	14.7	-2	2.3954
-4.5	3.536	14.7	-2	2.3954
-5.0	3.536	14.7	-2	2.3954
1 MHz				
0.0	3.594	17.8	-20	1.8873 - 0.6906i
-0.5	3.593	19.4	-27	1.6402 - 0.8408i
-1.0	3.593	22.4	-33	1.3352 - 0.8736i
-1.5	3.593	25.9	-39	1.0681 - 0.8730i
-2.0	3.593	29.5	-42	0.8951 - 0.8150i
-2.5	3.593	32.7	-44	0.7804 - 0.7633i
-3.0	3.593	35.9	-46	0.6852 - 0.7199i
-3.5	3.593	39.7	-48	0.5956 - 0.6726i
-4.0	3.592	44.1	-50	0.5136 - 0.6240i
-4.5	3.592	47.6	-51	0.4649 - 0.5865i
-5.0	3.592	50.5	-52	0.4279 - 0.5605i
4 MHz				
0.0	3.629	32.7	-33	0.9589 - 0.7040i
-0.5	3.629	40.9	-32	0.7711 - 0.4881i
-1.0	3.628	51.2	-29	0.6116 - 0.2898i
-1.5	3.628	61.5	-27	0.5145 - 0.1806i
-2.0	3.628	71.6	-25	0.4429 - 0.1299i
-2.5	3.627	79.7	-24	0.3902 - 0.0924i
-3.0	3.627	87.8	-24	0.3627 - 0.0792i
-3.5	3.627	97.7	-23	0.3130 - 0.0570i
-4.0	3.627	108.9	-23	0.2808 - 0.0461i
-4.5	3.626	117.3	-22	0.2433 - 0.0401i
-5.0	3.626	124.7	-22	0.2250 - 0.0330i

Tabella A.22.: Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta con Sylgard® n°4

A. Appendice

Micropipetta in vetro con Sylgard® n° 5				
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	Sfasamento (°)	Impedenza ($\Omega \cdot 10^5$)
1 kHz				
0.0	3.537	16.3	-1	2.4655
-0.5	3.537	16.3	-1	2.5368
-1.0	3.537	16.3	-1	2.8448
-1.5	3.537	16.1	-1	2.8448
-2.0	3.537	16.0	-1	2.8916
-2.5	3.537	15.8	-1	2.9156
-3.0	3.537	15.6	-1	3.0417
-3.5	3.537	15.3	-1	3.4269
-4.0	3.537	15.2	-1	3.6775
-4.5	3.537	15.0	-1	3.9675
-5.0	3.537	14.9	-1	4.3071
1 MHz				
0.0	3.594	17.5	-20	2.1698 - 0.8807i
-0.5	3.594	19.8	-28	1.7620 - 1.0647i
-1.0	3.594	22.9	-34	1.2107 - 0.9885i
-1.5	3.594	26.9	-40	0.8641 - 0.8442i
-2.0	3.594	30.5	-42	0.6727 - 0.7070i
-2.5	3.594	33.9	-45	0.5394 - 0.6101i
-3.0	3.594	37.4	-47	0.4472 - 0.5260i
-3.5	3.593	41.2	-49	0.3865 - 0.4561i
-4.0	3.593	45.9	-51	0.3464 - 0.4100i
-4.5	3.593	52.6	-53	0.3088 - 0.3667i
-5.0	3.593	57.2	-54	0.2774 - 0.3306i
4 MHz				
0.0	3.630	32.5	-34	0.8835 - 0.7235i
-0.5	3.630	42.5	-31	0.7368 - 0.4850i
-1.0	3.629	52.5	-28	0.6202 - 0.3074i
-1.5	3.629	62.8	-25	0.5289 - 0.2069i
-2.0	3.628	72.0	-24	0.4618 - 0.1442i
-2.5	3.628	80.6	-23	0.4093 - 0.1045i
-3.0	3.628	89.3	-23	0.3657 - 0.0799i
-3.5	3.627	99.1	-22	0.3294 - 0.0599i
-4.0	3.627	112.9	-22	0.2893 - 0.0528i
-4.5	3.626	127.9	-22	0.2613 - 0.0430i
-5.0	3.626	137.8	-21	0.2382 - 0.0349i

Tabella A.23.: Prove di ripetibilità: caratterizzazione della micropipetta con Sylgard® n°5

A. Appendice

Vout / Vin per micropipetta con Sylgard®					
profondità (mm)	n° 1	n° 2	n° 3	n° 4	n° 5
1 kHz					
0.0	0.0037	0.0029	0.0051	0.0043	0.0040
-0.5	0.0037	0.0029	0.0051	0.0043	0.0039
-1.0	0.0037	0.0028	0.0051	0.0043	0.0035
-1.5	0.0036	0.0028	0.0050	0.0043	0.0035
-2.0	0.0036	0.0028	0.0050	0.0043	0.0034
-2.5	0.0036	0.0027	0.0049	0.0042	0.0034
-3.0	0.0036	0.0027	0.0049	0.0042	0.0033
-3.5	0.0036	0.0027	0.0049	0.0042	0.0029
-4.0	0.0036	0.0028	0.0049	0.0042	0.0027
-4.5	0.0037	0.0028	0.0049	0.0042	0.0025
-5.0	0.0037	0.0028	0.0049	0.0042	0.0023
1 MHz					
0.0	0.0050	0.0043	0.0054	0.0050	0.0043
-0.5	0.0055	0.0049	0.0057	0.0054	0.0048
-1.0	0.0065	0.0060	0.0065	0.0062	0.0064
-1.5	0.0074	0.0071	0.0073	0.0072	0.0082
-2.0	0.0082	0.0084	0.0081	0.0082	0.0102
-2.5	0.0094	0.0096	0.0089	0.0091	0.0122
-3.0	0.0104	0.0108	0.0096	0.0100	0.0143
-3.5	0.0115	0.0121	0.0104	0.0110	0.0165
-4.0	0.0126	0.0128	0.0114	0.0123	0.0184
-4.5	0.0138	0.0159	0.0125	0.0133	0.0206
-5.0	0.0153	0.0174	0.0138	0.0141	0.0228
4 MHz					
0.0	0.0090	0.0086	0.0089	0.0083	0.0087
-0.5	0.0115	0.0111	0.0110	0.0109	0.0112
-1.0	0.0145	0.0139	0.0135	0.0146	0.0143
-1.5	0.0170	0.0169	0.0161	0.0180	0.0173
-2.0	0.0194	0.0198	0.0184	0.0212	0.0203
-2.5	0.0220	0.0222	0.0206	0.0243	0.0231
-3.0	0.0246	0.0248	0.0228	0.0262	0.0260
-3.5	0.0270	0.0285	0.0250	0.0305	0.0290
-4.0	0.0299	0.0347	0.0278	0.0340	0.0329
-4.5	0.0330	0.0382	0.0309	0.0390	0.0364
-5.0	0.0367	0.0410	0.0342	0.0421	0.0399

Tabella A.24.: Prove di ripetibilità: Vout / Vin per micropipette con Sylgard®

A. Appendice

Valor medio dell'impedenza della micropipetta senza Sylgard®				
profondità (mm)	Impedenza ($\Omega \cdot 10^5$)	Modulo ($\Omega \cdot 10^5$)	Fase ($^\circ$)	Vout / Vin ()
1 kHz				
0.0	2.5679	2.5679	-0.6000	0.0040
-0.5	2.6042	2.6042	-0.8000	0.0040
-1.0	2.6841	2.6841	-0.8000	0.0039
-1.5	2.7001	2.7001	-0.8000	0.0038
-2.0	2.7118	2.7118	-0.8000	0.0038
-2.5	2.7294	2.7294	-0.8000	0.0038
-3.0	2.7601	2.7601	-0.8000	0.0038
-3.5	2.8427	2.8427	-0.8000	0.0037
-4.0	2.8886	2.8886	-0.8000	0.0036
-4.5	2.9448	2.9448	-0.8000	0.0036
-5.0	3.0127	3.0127	-0.8000	0.0036
1 MHz				
0.0	1.9632 - 0.7570i	2.1041	20.8000	0.0048
-0.5	1.6625 - 0.9048i	1.8927	-28.2000	0.0053
-1.0	1.2843 - 0.9153i	1.5770	-35.2000	0.0063
-1.5	1.0201 - 0.8620i	1.3355	-40.0000	0.0074
-2.0	0.8506 - 0.7925i	1.1626	-42.8000	0.0086
-2.5	0.7156 - 0.7307i	1.0227	-45.4000	0.0098
-3.0	0.6213 - 0.6766i	0.9186	-47.2000	0.0110
-3.5	0.5417 - 0.6226i	0.8252	-48.6000	0.0123
-4.0	0.4794 - 0.5830i	0.7548	-50.0000	0.0135
-4.5	0.4168 - 0.5268i	0.6717	-51.0000	0.0152
-5.0	0.3689 - 0.4901i	0.6134	-52.2000	0.0167
4 MHz				
0.0	0.9347 - 0.6483i	1.1376	-34.4000	0.0087
-0.5	0.7551 - 0.4708i	0.8899	-31.6000	0.0111
-1.0	0.6208 - 0.3190i	0.6980	-26.8000	0.0142
-1.5	0.5279 - 0.2316i	0.5765	-23.2000	0.0171
-2.0	0.4608 - 0.1823i	0.4956	-21.0000	0.0198
-2.5	0.4098 - 0.1482i	0.4358	-19.2000	0.0225
-3.0	0.3702 - 0.1283i	0.3918	-18.4000	0.0249
-3.5	0.3292 - 0.1099i	0.3470	-17.6000	0.0280
-4.0	0.2895 - 0.0945i	0.3045	-17.2000	0.0319
-4.5	0.2591 - 0.0843i	0.2725	-17.0000	0.0355
-5.0	0.2361 - 0.0751i	0.2477	-16.6000	0.0388

Tabella A.25.: Prove di ripetibilità per la caratterizzazione della micropipetta con Sylgard®: valor medio dell'impedenza

A. Appendice

Micropipetta in vetro senza Sylgard®				
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vout (mVrms)	Sfasamento (°)	Vout / Vin ()
1 kHz				
0.0	3.5316	15.4	0	0.0044
-0.5	3.5316	15.4	0	0.0044
-1.0	3.5316	15.2	0	0.0043
-1.5	3.5316	14.9	0	0.0042
-2.0	3.5317	14.6	0	0.0041
-2.5	3.5317	14.3	0	0.0040
-3.0	3.5320	13.9	0	0.0039
-3.5	3.5320	13.5	0	0.0038
-4.0	3.5322	13.1	0	0.0037
-4.5	3.5322	12.9	0	0.0037
-5.0	3.5323	12.2	0	0.0035
1 MHz				
0.0	3.57	17.8	-19	0.0050
-0.5	3.57	20.0	-26	0.0056
-1.0	3.57	25.5	-35	0.0071
-1.5	3.57	31.9	-40	0.0089
-2.0	3.57	38.9	-42	0.0109
-2.5	3.57	46.5	-44	0.0130
-3.0	3.57	54.4	-45	0.0152
-3.5	3.57	62.2	-46	0.0174
-4.0	3.57	69.9	-47	0.0196
-4.5	3.57	77.4	-47	0.0217
-5.0	3.57	85.0	-48	0.0238
4 MHz				
0.0	3.60	32.1	-32	0.0089
-0.5	3.60	39.5	-31	0.0110
-1.0	3.60	53.8	-24	0.0149
-1.5	3.60	67.0	-19	0.0186
-2.0	3.60	79.3	-15	0.0220
-2.5	3.60	91.1	-13	0.0253
-3.0	3.60	103.3	-11	0.0287
-3.5	3.60	116.4	-9	0.0323
-4.0	3.60	129.9	-8	0.0361
-4.5	3.60	142.4	-8	0.0396
-5.0	3.60	154.1	-7	0.0428

Tabella A.26.: Prova di caratterizzazione per micropipetta senza Sylgard®

A. Appendice

Micropipetta in vetro con Sylgard®				
profondità (mm)	Vout (mVrms)	Vin (Vrms)	Vin' (Vrms) ¹	Vin'' (Vrms) ²
1 kHz				
0.0	5.7	1.4525	1.3072	1.4250
-0.5	5.7	1.4530	1.3072	1.4250
-1.0	5.4	1.4540	1.2546	1.4211
-1.5	5.4	1.4555	1.2799	1.4211
-2.0	5.4	1.4565	1.3062	1.4595
-2.5	5.3	1.4570	1.3090	1.4722
-3.0	5.2	1.4570	1.3213	1.4857
-3.5	5.1	1.4570	1.3343	1.5000
-4.0	5.1	1.4570	1.3751	1.5455
-4.5	5.5	1.4570	1.5060	1.7187
-5.0	5.5	1.4570	1.5924	1.7742
1 MHz				
0.0	7.6	1.2200	1.5243	1.6522
-0.5	8.2	1.2195	1.4637	1.5769
-1.0	10.0	1.2195	1.4000	1.4925
-1.5	12.1	1.2190	1.3541	1.4235
-2.0	14.5	1.2185	1.3307	1.3679
-2.5	16.9	1.2185	1.2975	1.3413
-3.0	19.3	1.2185	1.2666	1.3041
-3.5	21.6	1.2180	1.2397	1.2632
-4.0	24.2	1.2180	1.2360	1.2474
-4.5	27.0	1.2175	1.2453	1.2329
-5.0	29.3	1.2175	1.2306	1.2208
4 MHz				
0.0	19.6	1.2225	2.1981	2.2529
-0.5	21.9	1.2225	1.9959	1.9730
-1.0	25.7	1.2224	1.7197	1.7365
-1.5	29.4	1.2223	1.5797	1.5978
-2.0	32.8	1.2222	1.4890	1.5115
-2.5	36.4	1.2222	1.4384	1.4444
-3.0	39.7	1.2219	1.3835	1.4128
-3.5	43.5	1.2217	1.3454	1.3636
-4.0	47.5	1.2216	1.3164	1.3380
-4.5	51.6	1.2210	1.3045	1.3030
-5.0	55.5	1.2210	1.2966	1.2847

Tabella A.27.: Prova di simulazione per micropipetta senza Sylgard®

A. Appendice

Variazine Vin per elettrodo metallico fino			
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vin' (Vrms)	sfasamento (°)
1 kHz			
0.0	3.540	3.340	-2
-0.5	3.540	3.486	0
-1.0	3.540	3.500	0
-1.5	3.540	3.507	0
-2.0	3.540	3.511	0
-2.5	3.540	3.515	0
-3.0	3.540	3.516	0
-3.5	3.540	3.518	0
-4.0	3.540	3.521	0
-4.5	3.540	3.521	0
-5.0	3.540	3.523	0
1 MHz			
0.0	3.62	3.19	20.5
-0.5	3.62	3.58	5.5
-1.0	3.62	3.61	4
-1.5	3.62	3.62	3.5
-2.0	3.62	3.62	3
-2.5	3.62	3.63	3
-3.0	3.62	3.63	3
-3.5	3.62	3.62	2.5
-4.0	3.62	3.63	1.5
-4.5	3.62	3.64	1.5
-5.0	3.62	3.64	1.5
4 MHz			
0.0	3.60	2.40	46
-0.5	3.61	3.42	22
-1.0	3.62	3.59	16
-1.5	3.63	3.66	13
-2.0	3.63	3.69	12
-2.5	3.63	3.71	10
-3.0	3.63	3.72	10
-3.5	3.64	3.73	9
-4.0	3.64	3.74	9
-4.5	3.64	3.74	8
-5.0	3.64	3.75	8

Tabella A.28.: Variazione della tensione d'ingresso Vin per elettrodo metallico fino

A. Appendice

Variazine Vin per elettrodo metallico spesso			
profondità (mm)	Vin (Vrms)	Vin' (Vrms)	sfasamento (°)
1 kHz			
0.0	3.539	3.513	0
-0.5	3.539	3.553	0
-1.0	3.539	3.557	0
-1.5	3.539	3.558	0
-2.0	3.539	3.560	0
-2.5	3.539	3.560	0
-3.0	3.539	3.562	0
-3.5	3.539	3.561	0
-4.0	3.539	3.562	0
-4.5	3.539	3.562	0
-5.0	3.539	3.563	0
1 MHz			
0.0	3.61	3.560	8.5
-0.5	3.61	3.66	3.5
-1.0	3.61	3.67	3
-1.5	3.61	3.67	2.5
-2.0	3.61	3.67	2
-2.5	3.61	3.67	2
-3.0	3.61	3.67	2
-3.5	3.61	3.67	2
-4.0	3.61	3.67	1
-4.5	3.61	3.67	2
-5.0	3.61	3.67	1.5
4 MHz			
0.0	3.61	3.14	30
-0.5	3.63	3.67	14
-1.0	3.63	3.72	11
-1.5	3.64	3.74	10
-2.0	3.64	3.75	9
-2.5	3.64	3.75	8
-3.0	3.64	3.75	8
-3.5	3.64	3.76	8
-4.0	3.64	3.76	7
-4.5	3.64	3.76	7
-5.0	3.64	3.76	7

Tabella A.29.: Variazione della tensione d'ingresso Vin per elettrodo metallico spesso

A. *Appendice*