

Politecnico di Milano

Dipartimento di Elettronica e Informazione
Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria Elettronica



PROGETTO E SVILUPPO DI UN SISTEMA PER L'ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI SU CHIP MICROFLUIDICO

Relatore: Prof. Pietro Sampietro

Correlatore: Ing. Marco Bianchessi

Tesi di Laurea Magistrale di:

Fausto Xibilia

Matr. 734630

Anno Accademico 2011-2012

Indice

| | |
|-------------------|---|
| INTRODUZIONE..... | I |
|-------------------|---|

Capitolo 1

Un nuovo approccio alla fluidica

| | | |
|-----|---|----|
| 1.1 | Introduzione..... | 2 |
| 1.2 | Chip microfluidici..... | 4 |
| 1.3 | Comportamento dei fluidi su scala micrometrica..... | 6 |
| 1.4 | Pompaggio dei fluidi nei microcanali..... | 14 |

Capitolo 2

La purificazione del DNA

| | | |
|-----|---|----|
| 2.1 | Introduzione..... | 18 |
| 2.2 | La struttura del DNA..... | 20 |
| 2.3 | La purificazione del DNA..... | 22 |
| 2.4 | Fasi fondamentali dell'estrazione del DNA..... | 23 |
| | 2.4.1. Rottura della membrana cellulare..... | 24 |
| | 2.4.2. Allontanamento della membrana..... | 24 |
| | 2.4.3. Allontanamento proteine..... | 24 |
| | 2.4.4. Estrazione eterea..... | 25 |
| | 2.4.5. Purificazione..... | 26 |
| | 2.4.6. Lavaggio..... | 26 |
| 2.5 | Kit di estrazione..... | 27 |
| 2.6 | La purificazione del DNA su chip microfluidico..... | 28 |

Capitolo 3

Lo Strumento: Fluidica

| | | |
|------|---|----|
| 3.1 | Introduzione..... | 31 |
| 3.2 | La struttura dello strumento..... | 32 |
| 3.3 | Le micropompe..... | 34 |
| 3.4 | La piezoelettricità..... | 37 |
| 3.5 | Il sistema microfluidico..... | 40 |
| 3.6 | Le micropompe della Bartels Mikrotechnik..... | 44 |
| | 3.6.1. Caratteristiche tecniche..... | 46 |
| | 3.6.2. Caratteristiche del flusso..... | 48 |
| 3.7 | Il chip microfluidico..... | 51 |
| 3.8 | Il chip in silicio..... | 55 |
| 3.9 | Le valvole..... | 59 |
| 3.10 | Algoritmo di funzionamento dello strumento..... | 62 |

Capitolo 4

Lo Strumento: Elettronica

| | | |
|-----|--|----|
| 4.1 | Introduzione..... | 66 |
| 4.2 | La Board di controllo..... | 67 |
| 4.3 | Il microcontrollore STM32..... | 69 |
| 4.4 | Il motore passo-passo (stepper)..... | 70 |
| 4.5 | Il circuito di riscaldamento: lettura e controllo della temperatura..... | 75 |
| | 4.5.1 Fase di lettura della temperatura..... | 75 |
| | 4.5.2 Fase di controllo della temperatura..... | 78 |
| | 4.5.3 Implementazione PID..... | 78 |
| | 4.5.4 Realizzazione digitale del PID..... | 80 |
| | 4.5.5 Scelta della frequenza di campionamento..... | 82 |

| | | |
|------|--|-----|
| 4.6 | Lo stadio di potenza: Il convertitore Boost..... | 82 |
| 4.7 | Implementazione dello stadio di potenza..... | 92 |
| 4.8 | Analisi dei componenti circuitali..... | 94 |
| 4.9 | Consumi..... | 102 |
| 4.10 | Il firmware..... | 104 |
| 4.11 | Il software..... | 110 |

Capitolo 5

Validazione dello strumento e risultati

| | | |
|-----|--|-----|
| 5.1 | Introduzione..... | 114 |
| 5.2 | Prove di estrazione e purificazione del DNA..... | 114 |
| 5.3 | Real-Time PCR..... | 115 |
| 5.4 | Il termociclatore..... | 116 |
| 5.5 | Le prove fluidiche..... | 118 |
| 5.6 | Risultati ottenuti..... | 122 |

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....125

BIBLIOGRAFIA.....128

Introduzione

A metà degli anni '70 le tecniche basate sulle tecnologie litografiche per la realizzazione di circuiti elettronici furono applicate per la prima volta nella fabbricazione di strutture meccaniche in silicio nell'ordine di grandezza dei micrometri o anche più piccole: si trattava della nascita dei MEMS (Micro Electro Mechanical System).

Un MEMS è un sistema altamente miniaturizzato che integra dispositivi di diversa natura, meccanici, elettrici ed elettronici, su uno stesso circuito, solitamente di silicio, e svolge funzioni di rilevazione, elaborazione o attuazione.

I dispositivi MEMS, o microsistemi, sono il risultato dell'integrazione dei "chip" con altre tecnologie innovative e rappresentano così una naturale evoluzione della microelettronica. Le parti elettroniche sono realizzate usando i processi standard dei circuiti integrati; analoghi processi o tecniche di microlavorazione vengono usati per fabbricare i componenti meccanici o di altra natura che fanno parte dei MEMS.

L'integrazione dei vari elementi meccanici ed elettronici in uno stesso substrato di silicio consente di realizzare un oggetto che ha molteplici funzioni e possibilità applicative. I circuiti elettronici del chip possono essere visti come il "cervello" di un sistema, cui gli altri dispositivi contenuti nello stesso chip aggiungono "sensi" e "braccia". Si ha quindi un sistema in grado di captare informazioni dall'ambiente, di prendere decisioni e, infine, di attuare le azioni opportune. I sensori possono misurare fenomeni di varia natura: meccanica, termica, biologica, chimica, ottica, magnetica, ecc. I circuiti elettronici del chip elaborano i dati raccolti e indicano agli attuatori le azioni da compiere: muovere, posizionare, regolare, pompare, filtrare, ecc. Un sottogruppo dei microsistemi è rappresentato dai dispositivi Lab on Chip.

Lab-on-chip (LOC) è una struttura che integra funzioni multiple, che si possono svolgere in laboratorio, su un singolo chip che va da pochi millimetri a qualche centimetro quadrato di grandezza ed è capace di trattare volumi di fluidi estremamente piccoli, sotto i picolitri. A questa scala di grandezza il comportamento,

il controllo e la gestione dei fluidi prende il nome di microfluidica. Questa è un recente campo di ricerca prettamente interdisciplinare che si interessa alla manipolazione e al trasporto di piccolissime quantità di liquido. Uno degli obiettivi principali è proprio la realizzazione del LoC, ossia la riduzione su un chip di dimensioni millimetriche di tutte le operazioni chimiche (sintesi, separazione, analisi...) che attualmente richiedono l'uso di sistemi robotizzati. I chip microfluidici vengono utilizzati per i notevoli vantaggi che presentano, tutti derivanti dai ridotti volumi di fluido trattati. Ad esempio, questi dispositivi garantiscono: portabilità, un elevato controllo dei flussi, una diminuzione dei tempi per sintetizzare e analizzare un prodotto; una riduzione dei costi per reagenti e dei prodotti di scarto; un maggiore controllo delle concentrazioni e delle interazioni molecolari; la possibilità di fare processi in parallelo.

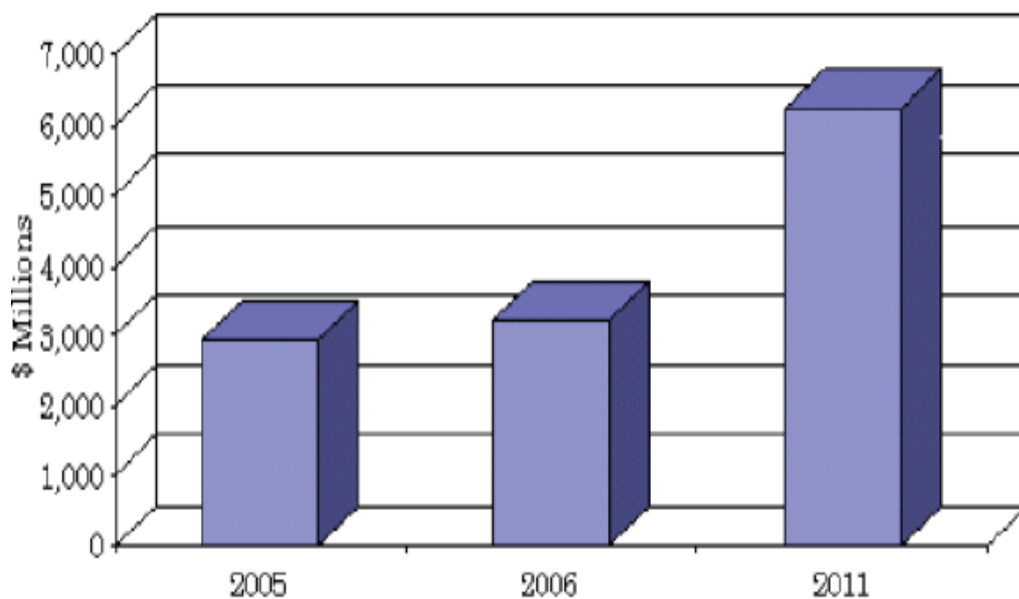


Grafico 1: Mercato dei materiali microfluidici dal 2005 al 2011 in dollari.

Tra le diverse applicazioni alle quali i chip microfluidici si prestano ci sono l'amplificazione del DNA e la purificazione dello stesso; quest'ultimo prima di essere analizzato e trattato deve essere lisato e separato da tutte quelle molecole che lo rendono impuro o che possono danneggiarlo (proteine, polisaccaridi ...).

L'operazione di purificazione (Sample Preparation) oggi è realizzata in laboratorio e prevede l'utilizzo di più reagenti in quantità considerevole e di strumenti ingombranti quali la centrifuga (Vortex) per la distruzione della membrana cellulare oltre che di pipette e puntali. Se il suddetto procedimento fosse effettuato su scala micrometrica attraverso l'ausilio di un dispositivo micro fluidico ci sarebbe un notevole risparmio di materiale chimico, si eviterebbero strumentazioni di laboratorio e il processo sarebbe del tutto automatizzato.

Il lavoro di tesi si sviluppa nella progettazione di uno strumento capace, attraverso l'integrazione di un dispositivo micro fluidico, di effettuare l'operazione di estrazione e purificazione del DNA per renderlo fruibile ad altre tecniche di analisi; i liquidi saranno controllati da micropompe piezoelettriche che preleveranno da apposite cartucce i reagenti. Le quantità di questi ultimi saranno molto basse ed il processo sarà controllato semplicemente da pc grazie ad un software appositamente realizzato.

L'argomentazione si sviluppa in 5 capitoli; il primo riguarderà, il comportamento dei fluidi su scala micrometrica, le caratteristiche dei sistemi microfluidici e la loro realizzazione; nel secondo capitolo verrà trattata la sample preparation spiegando il protocollo operativo per l'implementazione dello strumento; il terzo e quarto capitolo descrivono lo strumento e le soluzioni adottate dal punto di vista della fluidica e dell'elettronica rispettivamente e sarà presentata la componente software per la gestione ed il controllo; il quinto capitolo conclude la trattazione con le prove fluidiche e biologiche ed i risultati ottenuti.

CAPITOLO 1

Un nuovo approccio alla fluidica

1.1 Introduzione

La Microfluidica è la scienza connessa allo studio del comportamento, della manipolazione e del controllo preciso dei fluidi su scala micrometrica; è uno dei campi di applicazione principali nella tecnologia dei microsistemi puntando alla progettazione e sviluppo di dispositivi miniaturizzati che possono percepire, pompare, mescolare o controllare piccoli volumi di fluido (gas o liquido) o utilizzare i liquidi per produrre le forze d'attuazione.

La Microfluidica ha la potenzialità per rivoluzionare i processi ed i prodotti che maneggiano o usano i fluidi riducendo la loro scala dimensionale ed introducendo l'alta integrazione con un processo simile a quello nella tecnologia del circuito integrato (IC).

Microelectronics vs. Microfluidics

| | Integrated Circuit | Microfluidic chip |
|-----------------------------|---|--|
| Transport quantity | Charge-No Mass | Mass (no charge) |
| Chip Materials | Inorganic (semiconductors) | Organic (polymers) |
| Characteristic channel size | ~100 nm | ~100 μm |
| Transport regime | Similar to macroscopic circuits (classical, no quantum) | Different to macroscopic circuits (laminar, no turbulence) |

Tabella 1: Differenze tra chip elettronici e microfluidici.

La natura interdisciplinare le permette di spaziare tra chimica, biologia, fisica e ingegneria riscuotendo per questo un grande interesse dal punto di vista industriale: gli specialisti del settore sostengono che l'impatto della microfluidica sulla medicina sarà analogo a quello del circuito integrato in elettronica.

Le caratteristiche principali che distinguono i sistemi microfluidici sono:

- Piccoli volumi trattati (nl, pl).
- Piccole dimensioni (um, nm).
- Bassa dissipazione di potenza.

Tipicamente i liquidi sono trasportati, miscelati, separati e successivamente analizzati. Molte tecniche impiegano metodi di controllo passivo del fluido come le forze capillari; in altri casi i chip passivi sono sottoposti a forzanti esterne come forze centrifughe.

Il controllo attivo, invece, si riferisce alla manipolazione dei fluidi attraverso l'ausilio di microcomponenti attivi quali possono essere micropompe e microvalvole: le prime alimentano il flusso dei fluidi in modo continuo oppure impulsato; le seconde determinano la direzione del flusso se passive o la modalità di movimento dei liquidi pompate se attive. Nel presente capitolo saranno descritte le caratteristiche principali dei chip microfluidici, le tecniche di costruzione, e il comportamento dei fluidi che li attraversano mettendo in luce vantaggi e svantaggi dell'utilizzo di un circuito microfluidico in sostituzione alla classica strumentazione da laboratorio.

1.2 Chip microfluidici

La proprietà principale dei chip microfluidici è quella di poter integrare funzioni multiple che altrimenti sarebbero svolte in laboratorio su pochi millimetri o centimetri quadrati e di poter trattare volumi di fluidi dell'ordine del picolitro (pl).

Data la necessità di trattare campioni di sostanze fluide, in genere il LoC è caratterizzato dalla presenza di microcamere e microcanali, nonché attuatori e sensori microfluidici; infatti l'impiego in campo biochimico prevede fasi di ciclatura termica nel processamento dei campioni e quindi il chip microfluidico è equipaggiato con resistenze e sensori di temperatura che provvedono al controllo dei processi di riscaldamento e raffreddamento dei reagenti.

E' il caso dei dispositivi progettati e realizzati durante il presente lavoro di tesi dal momento che alcuni protocolli per la purificazione del DNA prevedono l'innalzamento della temperatura della mix (reagenti e campione da trattare).

Nell'utilizzo dei materiali per la fabbricazione dei LoC, occorre considerare fattori come biocompatibilità, possibilità di reazioni superficiali compromettenti per il campione, bagnabilità delle superfici, e in alcuni casi proprietà ottiche.

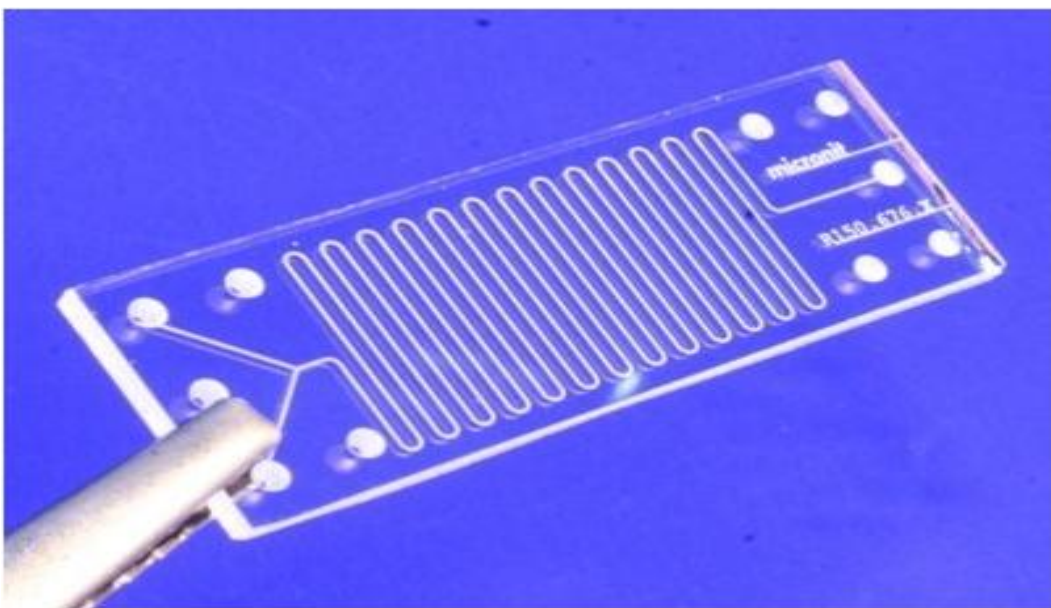


Figura 1. 1: Chip microfluidico in vetro.

Per queste ragioni e per andare incontro a richieste quali minori costi di produzione e fasi di prototipazioni più veloci si sono progressivamente affiancati al silicio altri materiali come vetro, ceramica, o materiali polimerici quali polidimetilsilossano (PDMS), policarbonato (PC), polimetilmetacrilato (PMMA) e metodi di lavorazione veloce come *injection molding* (stampaggio) e *embossing* (formatura).

L' immediato vantaggio riscontrabile dalla miniaturizzazione e compattezza del dispositivo microfluidico è il ridotto volume di fluidi in gioco dato dalla dimensione del chip che comporta un beneficio in termini di minor quantità di campione necessario per la diagnosi e naturalmente in termini di costi di reagenti; inoltre si ha un abbattimento dei costi di fabbricazione, con la possibilità di produrre chips usa e getta (*disposable*), fabbricati con produzione di massa.

Altri vantaggi dati dalle ridotte dimensioni sono rappresentati da un miglior controllo del processo grazie ad una più veloce risposta del sistema cosicché il controllo di temperatura per le reazioni chimiche possa avvenire in tempi brevi; l'alto rapporto tra la superficie e il volume del fluido, le basse capacità termiche e le ridotte lunghezze di diffusione permettono di minimizzare i tempi di reazione determinando un'elevata efficienza del processo; infine i minori volumi di fluido da immagazzinare e le contenute energie permettono di migliorare la sicurezza nel trattamento di sostanze chimiche e biologiche.

Tra gli svariati vantaggi apportati dai chip microfluidici desta particolare attenzione l'opportunità di poter fabbricare questi ultimi in grandi quantità; il concetto di monouso: l'alta ripetibilità dei processi di fabbricazione consente la produzione su larga scala di sistemi *disposable*.

Si può quindi pensare di realizzare LoC dedicati per ogni singola analisi, aumentando la prefunzionalizzazione e limitando i rischi di contaminazioni. Parte del lavoro di tesi è dedicato alla progettazione e fabbricazione del chip microfluidico necessario allo svolgimento dell'operazione di sample preparation: questo è funzionalizzato con microbiglie magnetiche (magnetic beads) contenenti silice, sostanza affine al DNA per permette l'estrazione e la purificazione dello stesso.

Purtroppo sono presenti anche svantaggi dovuti al fatto che si tratta di una nuova tecnologia e dunque in fase di sviluppo; inoltre il comportamento dei fluidi su scala

micrometrica cambia presentando problematiche legate al variato rapporto tra superficie e volumi accrescendo le forze di attrito all' interno dei microcanali.

Questo determina l'instaurarsi di un regime laminare del flusso e la presenza di forze di capillarità. Non da meno durante la fase di riempimento del chip (priming) è facile che si formino bolle d'aria a fronte di piccole irregolarità delle superfici causando un andamento errato del flusso e conseguenti errori nel processo per cui il sistema microfluidico è progettato.

Queste problematiche saranno affrontate in modo dettagliato nel capitolo 3.

1.3 Comportamento dei fluidi su scala micrometrica

Le ridotte dimensioni che caratterizzano la microfluidica determinano un cambiamento nel comportamento dei fluidi.

Fattori come la tensione superficiale e la resistenza fluidica iniziano a dominare il sistema microfluidico aumentando le perdite di carico all' interno dei canali e i materiali impiegati nella fabbricazione rivestono un ruolo fondamentale dal momento che la bagnabilità diventa una caratteristica importante.

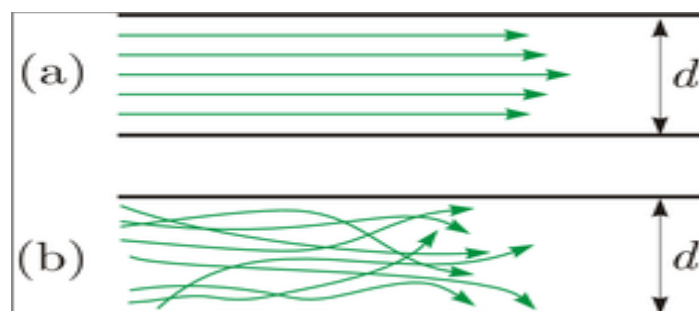


Figura 1. 2: Flusso laminare(a) e flusso turbolento(b).

La condizione può essere descritta dal numero di Reynolds; questo è un gruppo adimensionale usato in fluidodinamica, proporzionale al rapporto tra le forze d'inerzia e le forze viscosive.

Permette di valutare se il flusso di scorrimento di un fluido è in regime laminare (in corrispondenza del quale si hanno valori più bassi del numero di Reynolds) o turbolento (in corrispondenza del quale si hanno valori più elevati del parametro).

I valori del numero di Reynolds sono da considerarsi "bassi" o "elevati" relativamente ad uno specifico sistema, in cui siano fissate:

- la geometria del corpo investito dal flusso;
- la natura del fluido;
- le condizioni operative (temperatura e pressione) alle quali avviene la reazione.

Considerando le forze d'inerzia e quelle viscosi agenti su una particella fluida che si muove con velocità U all'interno dello stesso fluido si ha:

$$Re = \frac{F_i}{F_v} \quad [1.1]$$

La forza inerziale vale:

$$F_i = M \cdot a = \rho \cdot S \cdot d \cdot \frac{d}{t^2} \quad [1.2]$$

quella viscosa invece:

$$F_v = \mu \cdot S \cdot \frac{\Delta U}{\Delta d} \cong \mu \cdot S \cdot \frac{d}{d \cdot t} \quad [1.3]$$

il rapporto tra le due forze fornisce l'espressione generale del numero di Reynolds:

$$Re = \rho \cdot d \cdot \frac{d}{t \cdot \mu} = \rho \cdot d \cdot \frac{U}{\mu} \quad [1.4]$$

dove:

- ρ è la densità;
- U è la velocità media;
- μ è la viscosità dinamica;
- d è il diametro efficace; se la forma del canale non è circolare si definisce il diametro idraulico:

$$D_h = \frac{4 \cdot Area}{perimetro bagnato} \quad [1.5]$$

Si ha:

- $Re < 2000$: flusso laminare;
- $2000 < Re < 3000$: regime di transizione;
- $Re > 3000$: flusso turbolento.

Avendo fissato la geometria del sistema, la composizione del fluido, la temperatura e la pressione, nell'espressione del numero di Reynolds l'unica variabile rimasta è la velocità del fluido. Se ne deduce che, con tali assunzioni, all'aumentare della velocità del fluido aumenta il numero di Reynolds, mentre al diminuire della velocità del fluido diminuisce il numero di Reynolds; quindi un fluido in regime laminare

possiede una velocità minore rispetto allo stesso fluido in regime turbolento, o in altre parole, il passaggio tra regime laminare e regime turbolento si manifesta aumentando la velocità del fluido.

Ma in microfluidica, date le dimensioni ridotte dei canali, indipendentemente dalla velocità, ed essendo in prima approssimazione la densità dei reagenti bassa, il regime del flusso è laminare.

Ecco perché spesso la Microfluidica è definita Fluidodinamica a bassi numeri di Reynolds.

La caratteristica del moto laminare consiste nel fatto che il moto avviene con scorrimento di strati infinitesimi gli uni sugli altri senza alcun tipo di rimescolamento di fluido.

La procedura di purificazione del DNA comporta l'interazione tra reagenti e campione e quindi a tale scopo capiamo bene che il chip microfluidico da progettare è dotato di una piccola cameretta dove confluiscono i diversi canali; questa è l'unica porzione del circuito in cui i liquidi possono miscelarsi sotto regime turbolento.

Altro aspetto importante è rappresentato dagli effetti dovuti alla *capillarità* che si manifestano a causa della piccola sezione dei microcanali che sia essa circolare, rettangolare o quadrata. La capillarità è un fenomeno che si manifesta sulla superficie di separazione tra le molecole di un liquido e quelle del solido che le contiene. Essa è il risultato dell'azione congiunta di più forze quali la tensione superficiale, l'adesione e la coesione.

La coesione è la forza di attrazione di natura elettrostatica che si crea tra le particelle elementari del liquido che scorre nel canale, tenendole unite e opponendosi alle eventuali forze esterne che invece tendono a separarle; l'adesione, invece, rappresenta l'attrazione molecolare tra due materiali di natura differente posti a contatto che in questo caso rappresentano il liquido e la parete dei canali.

Queste forze dipendono dalla densità del liquido in questione (inversamente); quindi a seconda della natura del reagente che scorre all'interno del circuito microfluidico si può assistere a comportamenti diversi.

Ad esempio considerando due sostanze con densità differente quali acqua ed olio; la superficie del liquido in contatto col solido può presentarsi sollevata (nel caso dell'acqua), poiché le forze di adesione tra l'acqua ed il recipiente che la contiene sono maggiori delle forze di coesione tra le molecole d'acqua, o infossata (nel caso dell'olio) rispetto al resto della superficie, perché in questo caso sono le forze di coesione a prevalere rispetto alle forze di adesione.

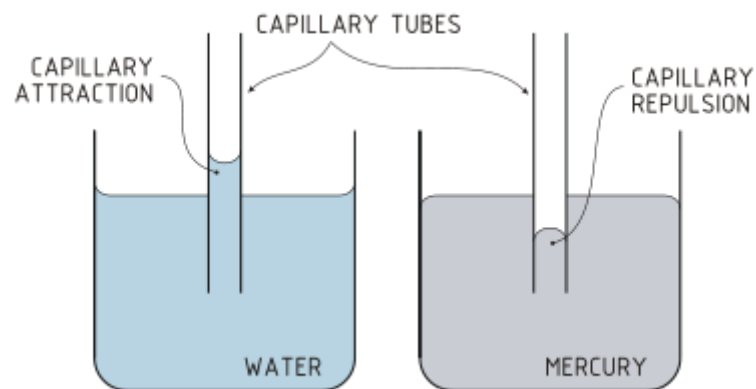


Figura 1. 3: Fenomeno di capillarità per l'acqua e per il mercurio: le caratteristiche dei liquidi determina la generazione di differenti pressioni.

Quando la superficie di un liquido è curva, nella parte concava si genera una pressione maggiore di quella esistente nella parte convessa. Per ristabilire l'equilibrio tra queste pressioni, il liquido dovrà salire o scendere di un certo volume.

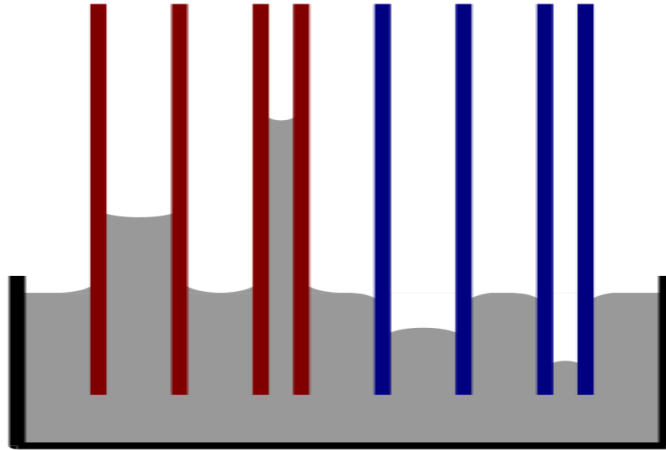


Figura 1. 4: menischi convessi e concavi al variare dell'affinità tra liquido e parete dei tubi.

Il fenomeno è più evidente nei chip microfluidici poiché in questi è maggiore la parte di liquido a contatto con le pareti del recipiente rispetto al volume totale e quindi la parte di liquido che genererà le forze di coesione sarà maggiore e perciò lo spostamento del livello del liquido all'interno del capillare sarà maggiore. Questo aspetto è di importanza rilevante dal momento che cambiando i volumi all'interno della camera di reazione per capillarità, potrebbe alterare le proporzioni dei reagenti e quindi falsare la riuscita del processo.

La superficie incurvata del liquido che sia concava (acqua) o convessa (olio) prende il nome di *menisco* e dipende dal rapporto tra forze di coesione e adesione.

Per un microcanale circolare di raggio r si può calcolare l'innalzamento h del liquido rispetto le camere di reazione come:

$$h = \frac{2\gamma \cos \theta}{\rho g r} \quad [1.6]$$

dove:

- γ è la tensione superficiale (J/m² or N/m);
- θ è l'angolo di raccordo tra la superficie del liquido e la parete del contenitore;

- ρ è la densità del liquido (kg/m^3);
- g è l'accelerazione di gravità (m/s^2);
- r è il raggio del microcanale(m).

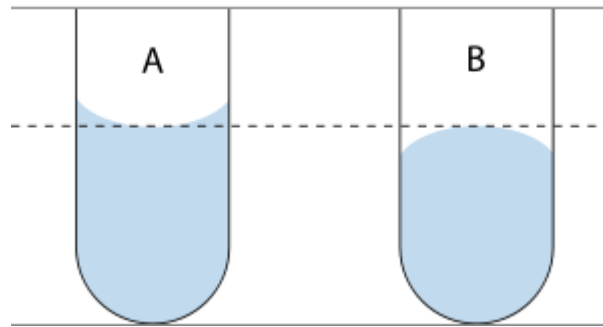


Figura 1. 5: Particolare del menisco convesso e concavo.

Indicando con P_0 la pressione immediatamente al di sotto del menisco e con P_1 la pressione immediatamente al di sopra si ha che la tensione superficiale è legata alle pressioni dalla seguente relazione:

$$P_1 = P_0 \pm \gamma \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \quad [1.7]$$

dove (il segno $+$ vale per i menischi concavi e il segno $-$ vale per i menischi convessi):

- γ è la tensione superficiale (J/m^2 or N/m);
- r_1 e r_2 sono i raggi di curvatura del menisco (m).

Nel caso dei menischi sferici, essendo $r_1 = r_2 = r$ si ha:

$$P_1 = P_0 \pm \left(\frac{2\gamma}{r} \right) \quad [1.8]$$

Un ulteriore aspetto da tener in considerazione è rappresentato dalle perdite di carico che aumentano con la riduzione della sezione dei canali. Le suddette possono essere viste come una variazione di pressione legata alla variazione di velocità:

$$\Delta p = p_1 - p_2 = 8 \cdot \frac{w^2 \cdot L \cdot \mu}{R^2} \quad [1.9]$$

in cui:

- w è la velocità media
- μ è la viscosità del fluido
- L è la lunghezza del canale
- R è il raggio della sezione del canale.

La perdita di carico è quindi direttamente proporzionale alla viscosità e alla velocità del fluido e alla lunghezza del canale ed è inversamente proporzionale al quadrato del raggio della sezione. Ad ogni metro di tubo corrisponde quindi una certa dissipazione di energia, che aumenta in modo quadratico con la velocità.

Sfruttando il numero di Reynolds si ha:

$$\Delta p = \frac{64}{Re} \cdot \frac{L}{D} \cdot \frac{w^2}{2} \cdot \rho \quad [1.10]$$

Il numero puro $64/Re$ prende il nome di fattore di attrito e viene indicato con f .

Scalare le dimensioni a livello micrometrico determina la comparsa di fattori che tendono a portare il sistema microfluidico a funzionare in modo differente rispetto il caso ideale e quindi in fase di progettazione è necessario considerare il comportamento dei fluidi in un ambiente in cui le loro proprietà possono cambiare drasticamente e agire di conseguenza per poter compensare eventuali modifiche del flusso.

1.4 Pilotaggio dei fluidi nei microcanali

Per ottenere un controllo preciso del flusso e del volume lo strumento maggiormente utilizzato è la syringe pump. Questa pompa per la sua struttura è anche definita pompa a spostamento dal momento che è costituita da un cilindro contenente il fluido da iniettare nel circuito microfluidico e da un pistone; il pistone è azionato da un motore applicato ad una vite generando una pressione non pulsata.



Figura 1. 6: Modello di syringe pump.

Dunque queste pompe garantiscono un flusso stabile e regolabile ma presentano lo svantaggio di avere un costo di mercato molto elevato che arriva sino a qualche migliaia di euro e soprattutto le dimensioni contrastano con l'obiettivo di integrazione che la microfluidica si propone: come si vede in figura la syringe pump è circa 50 volte il chip microfluidico.

Un prerequisito per lo sviluppo dei sistemi microfluidici è una tecnologia matura di microattuatori. Verso questo obiettivo, la ricerca sulla progettazione, sul montaggio e sulla descrizione di nuovi microattuatori è aumentata significativamente durante gli ultimi cinque anni. L'attuazione deve essere alimentata e controllata elettricamente, permettendo così l'utilizzazione completa dell'integrazione con l'elettronica del circuito. Malgrado questi requisiti rigorosi, recentemente sono stati dimostrati numerosi fenomeni fisici per le applicazioni dei microattuatori.

Le microstrutture deformabili quali i diaframmi forniscono lo spostamento e la forza con una deformazione meccanica (o straining). Contrariamente al funzionamento dei dispositivi meccanici macroscopici in cui le forze gravitazionali ed inerziali sono spesso dominanti, l'attrito svolge un ruolo importante nel funzionamento dei dispositivi micromeccanici.

In essi infatti, le forze gravitazionali (cioè, il peso delle parti mobili) sono solitamente insignificanti allo stesso modo delle forze inerziali. Mentre l'attrito è eliminato grazie al fatto che utilizzano soltanto giunti flessibili e sospensioni.

Tuttavia, il fatto di evitare l'attrito avviene a scapito di un movimento trattenuto (e spesso piccolo); ma date le ridotte dimensioni dei circuiti microfluidici questo non rappresenta un problema.

Le micropompe utilizzate in questo lavoro di tesi sfruttano l'effetto piezoelettrico e saranno largamente analizzate nel capitolo 3 riguardante la fluidica dello strumento progettato.

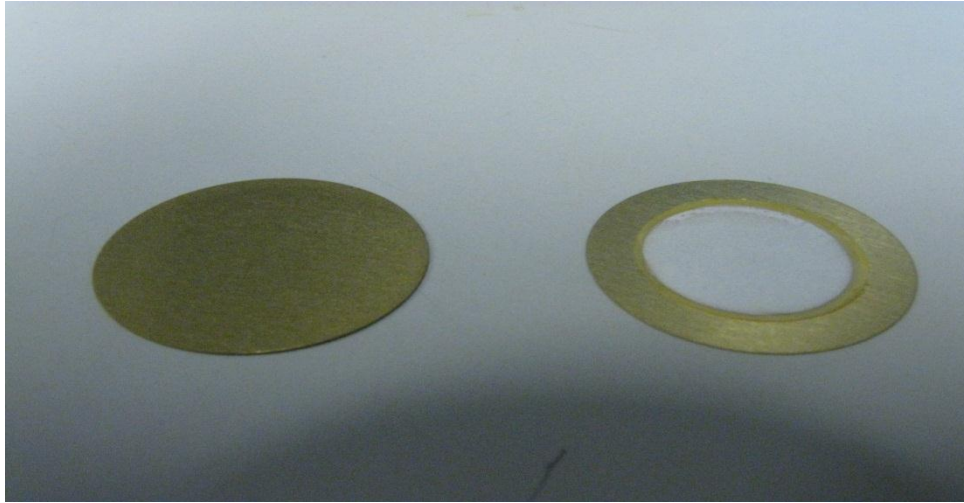


Figura 1. 7: Comuni dischi di PZT: il diametro è di 0.8 cm.

CAPITOLO 2

La purificazione del DNA

2.1 Introduzione

Operazioni come l'analisi, la manipolazione o l'amplificazione del DNA che riguardano applicazioni come il sequencing, la marcatura, l'ibridazione, il clonaggio e la PCR necessitano di campioni di DNA puro per la loro realizzabilità.

Infatti, la purificazione del DNA è una fase fondamentale che deve precedere ogni esperimento. E' un processo indispensabile in quanto libera il DNA da tutte quelle molecole che lo rendono impuro (proteine, polisaccaridi,...). Il DNA, nella sua caratteristica forma a doppia elica, non può essere utilizzato per nessun esperimento, ma deve essere lisato e separato da ogni altra molecola; inoltre nella stessa cellula sono presenti sostanze, dette DNAsi che possono danneggiarlo e che vanno quindi eliminate.

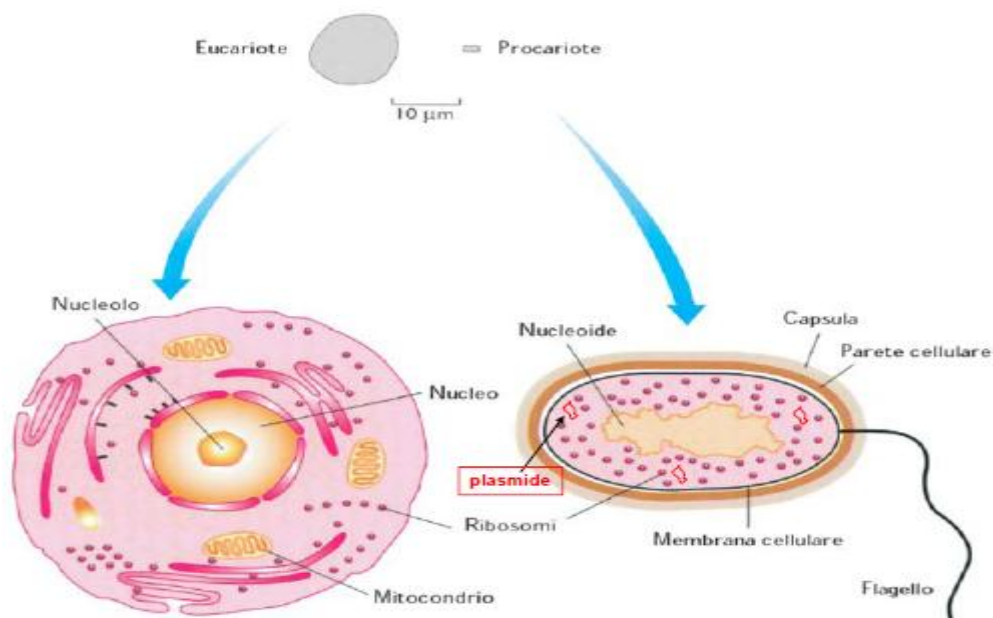


Figura 2. 1: Struttura della cellula.

Il problema dell'estrazione del DNA è molto complesso dal momento che si può partire da campioni differenti (sangue, organi, colture cellulari ecc.) e il grado di purezza che si desidera dipende dall'applicazione.

Il DNA è protetto all'interno della cellula e bisogna quindi riuscire ad accedervi; per fare ciò è necessaria una centrifuga oltre a vari reagenti (buffer) e strumenti di laboratorio.

La centrifuga serve a separare i resti cellulari, pesanti, dal DNA, una volta che questo è stato estratto dalla cellula.

Successivamente la molecola è trattata con alcol etanolo in cui non è solubile: si vengono a creare stati aggregati e tramite un ulteriore ciclo di centrifuga lo si fa depositare sul fondo; adesso è possibile prelevarlo.

E' un procedimento lungo e costoso e oggi è completamente automatizzato.

Per semplificare i passaggi manuali si utilizzano colonnine di silice costituite da microfilamenti che in particolari condizioni di salinità e pH della soluzione si legano al DNA. Questo rimane intrappolato e quando si centrifuga i resti cellulari scivolano lungo le porosità della silice; infine si libera il DNA attraverso buffer di eluizione.

E' un procedimento più semplice e non richiede passaggi tra diverse provette.

Per eliminare la centrifuga si possono utilizzare microbiglie magnetiche(magnetic beads) rivestite di silice.

Il DNA in sospensione a seguito della lisi cellulare si lega alla silice e trattenendo magneticamente le microbiglie è possibile rimuovere le impurità.

In questo capitolo vedremo dettagliatamente la procedura di purificazione del DNA analizzando tutti i passi necessari ad avere un campione puro; le varie tecniche; i prodotti presenti sul mercato; e sarà spiegato come il metodo che impiega le microbiglie magnetiche si candida come il migliore per poter integrare tutte le fasi della purificazione su un chip microfluidico.

2.2 La struttura del DNA

Prima di affrontare la questione dell'estrazione e purificazione del DNA è utile ricordare la composizione della molecola che costituisce ogni essere vivente.

IL DNA è una macromolecola a carattere acido con struttura costituita da una catena a doppia elica con avvolgimento destrorso e polarità inversa.

I componenti base del DNA sono: residui di 2' deossiribosio, residui fosfati e quattro basi eterocicliche: due purine (adenina e guanina) e due pirimidiniche (citosina e timina). Ogni elica del DNA è costituita da un residuo di 2' deossiribosio legato ad un gruppo fosfato il quale unisce la posizione 3' di uno zucchero con quella 5' del gruppo zuccherino vicino. Ciascuna delle quattro basi è attaccata in posizione 1' dello zucchero.

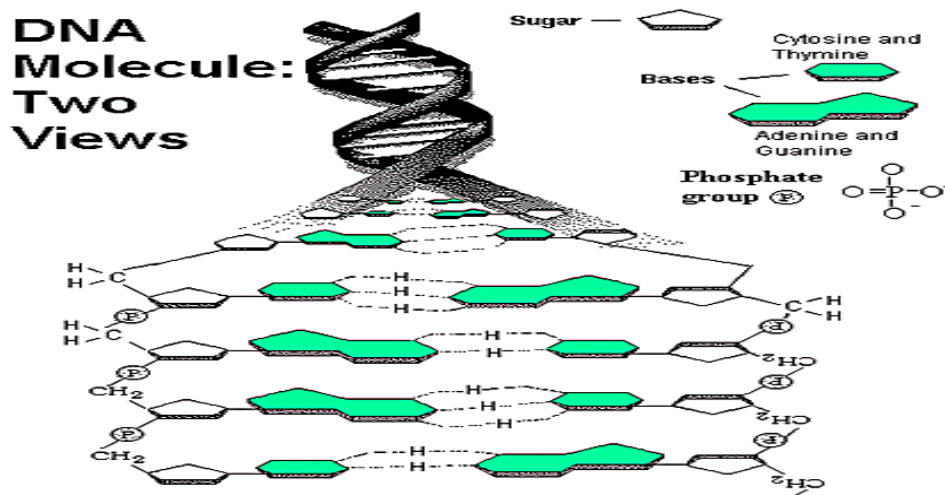


Figura 2. 2: Struttura a doppia elica del DNA.

Le due eliche, complementari l'una all'altra, sono unite mediante ponti ad idrogeno che si instaurano tra le basi: l'adenina forma due legami ad idrogeno con la timina, la guanina forma tre legami con la citosina. La percentuale della coppia di basi GC

rispetto alla coppia di basi TA può variare dal 26 al 74% del totale delle basi in relazione alla specie.

Unità funzionale del DNA è il codone definita come sequenza di tre nucleotidi che codifica un singolo aminoacido della proteina.

Per esempio l'aminoacido alanina (Ala) è codificato da: GCC, ma anche da GCA, oppure da GCG, oppure da GCU. Vi sono quindi 4 possibili codoni che codificano tutti per lo stesso aminoacido.

L'insieme dei codoni codificanti per un'intera proteina costituisce un gene.

La doppia elica è ulteriormente stabilizzata da legami idrofobici addizionali tra le basi.

Il DNA è un polimero che presenta un alto rapporto lunghezza-diametro che lo rende estremamente sensibile alle rotture durante le fasi di purificazione in soluzione.

Una caratteristica peculiare del DNA è la presenza di due zone con caratteristiche antitetiche di polarità: una zona idrofobica centrale dovuta alle basi puriniche e pirimidiniche e quindi estremamente poco solubile in acqua, ed estese zone idrofile esterne ad elevata carica negativa, dovuta ai gruppi fosfato deprotonati a pH fisiologico, le quali rendono il DNA abbastanza solubile in acqua.

La molecola del DNA può essere lineare o circolare. In questo ultimo caso essa va incontro a modificazioni topologiche che ne stabilizzano la struttura tridimensionale mediante avvolgimenti positivi o negativi della doppia elica. Si possono così distinguere forme topologiche del DNA rilassate o superavvolte dotate di proprietà chimico-fisiche diverse.

Condizioni estreme di pH, denaturano reversibilmente la doppia elica del DNA. La denaturazione può essere ottenuta anche mediante il riscaldamento, e da qui deriva l'importanza del fattore temperatura negli esperimenti di ibridazione molecolare e PCR.

2.3 La purificazione del DNA

Poter eseguire studi sul DNA significa poter isolare campioni puri dello stesso.

E' indispensabile disporre della molecola dell'Acido Nucleico, una volta separata dall'involucro cellulare in cui è contenuta all'interno della cellula.

Il campione biologico di partenza da cui estrarre il DNA potrebbe essere di vario tipo: sangue, ossa, tessuti.

L'estrazione e purificazione si articola principalmente in 3 fasi:

- *Demolizione della struttura cellulare:*

E' necessario liberare il DNA e l'RNA dall'involucro nucleare. Per permettere al DNA di

uscire dalla cellula e di srotolarsi senza perdere la struttura ad elica, occorre sia demolire pareti e membrane cellulari, che allontanare le proteine attorno alle quali il filamento di DNA si avvolge e si ripiega ripetutamente su se stesso.

- *Digestione delle proteine:*

il DNA all'interno del nucleo è legato ed associato a proteine che contribuiscono a determinarne la struttura: gli istoni. Per isolarlo occorre distruggere queste proteine.

- *Precipitazione del DNA:*

una volta ottenuto il DNA libero in soluzione bisogna separarlo sfruttando la sua proprietà di precipitare in etanolo. Un soluto precipita quando non riesce più a stare in soluzione, cioè a mescolarsi in modo omogeneo con le molecole del solvente. Il DNA non è solubile in etanolo, quindi l'aggiunta di etanolo fa sì che il DNA precipiti, cioè si addensi in una gelatina trasparente (jellyfish).

2.4 Fasi fondamentali per l'estrazione del DNA

Vediamo adesso dettagliatamente le fasi dell'estrazione e purificazione del DNA sino ad arrivare al campione puro.

E' possibile procedere con l'estrazione di acidi nucleici mediante 2 metodologie differenti in base a vari parametri quali la quantità del materiale di partenza, disponibilità di tempo per gli esperimenti, possibilità economiche dei laboratori ecc:

- 1) Metodo di estrazione tradizionale
- 2) Utilizzo dei kit di estrazione

Metodo di estrazione tradizionale

E' la tecnica di laboratorio più utilizzata.

Si procede per centrifugate successive con scopi e fasi diverse, variando i tempi e la velocità di centrifugazione. Al termine di ogni centrifugazione si separa un sovrantante da un precipitato.

L'estrazione degli acidi nucleici si articola in diverse fasi:

- 1- Rottura e lisi cellulare
- 2- Allontanamento delle membrane
- 3- Allontanamento lipidi, proteine e carboidrati (Estrazione fenolica)
- 4- Estrazione eterea (per allontanare il fenolo)
- 6- Precipitazione alcoolica e purificazione.

2.4.1 Rottura della membrana cellulare

La rottura delle cellule può avvenire con varie modalità a seconda del principio fisico utilizzato; meccanicamente attraverso omogeneizzatore a pestello (potter); con vibrazioni ultrasoniche; scoppio delle cellule per shock osmotico; oppure per mezzo di agenti litici (reagenti che genericamente sono detti buffers), in questo caso le membrane vengono frantumate utilizzando detergenti anionici quali SDS(sodio lauril fosfato) capaci di degradare le membrane e liberare il contenuto cellulare in soluzione.

Le soluzioni di lisi contengono oltre al principio litico numerosi additivi che servono a stabilizzare il DNA durante il processo di purificazione. Tra di essi il tampone Tris-HCl è usato per mantenere il pH tra 7,5 e 8,0. Dal momento che il DNA è una molecola che può facilmente rompersi durante il trattamento di lisi, nelle soluzioni si trovano frequentemente polialcoli (saccarosio, glucosio, glicerolo, sorbitolo) che minimizzano le rotture stabilizzando la molecola del DNA.

2.4.2 Allontanamento delle membrane

A tale scopo si procede con una centrifugazione che permette la separazione di due fasi:

- una superiore (sopranatante) che contiene gli acidi nucleici in soluzione.
- una inferiore (pellet) che comprende membrane e frammenti cellulari.

2.4.3 Allontanamento delle proteine

Per eliminare residui proteici e lipidici si procede con una o più estrazioni fenoliche in quanto IL FENOLO legandosi al nucleo delle proteine ne causa la loro denaturazione. Si aggiunge un egual volume di fenolo al sopranatante (si può anche aggiungere cloroformio per allontanare i lipidi) che diventa lattescente dopo agitazione.

Quindi si centrifuga. Si ottengono così 3 fasi:

- 1) **superiore**, che contiene la soluzione di acidi nucleici;
- 2) **interfase**, di proteine denaturate;
- 3) **inferiore**, fase fenolica contenente lipidi e proteine ricche di aminoacidi idrofobici.

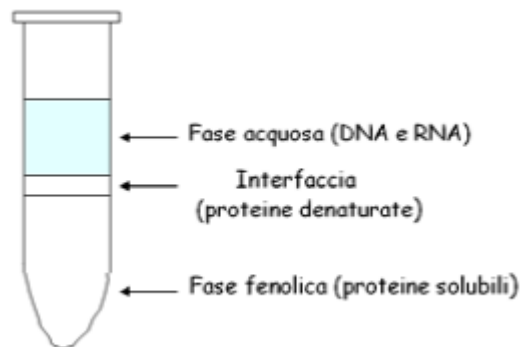


Figura 2. 3: Fase di allontanamento delle proteine.

2.4.4 Estrazione eterea

Si preleva quindi la fase superiore che viene poi sottoposta ad estrazione eterea allo scopo di allontanare eventuali residui di fenolo. Dopo centrifugazione l'etere localizzato nella parte superiore del tubo viene allontanato.

La soluzione risultante costituisce la miscela di *acidi nucleici*.

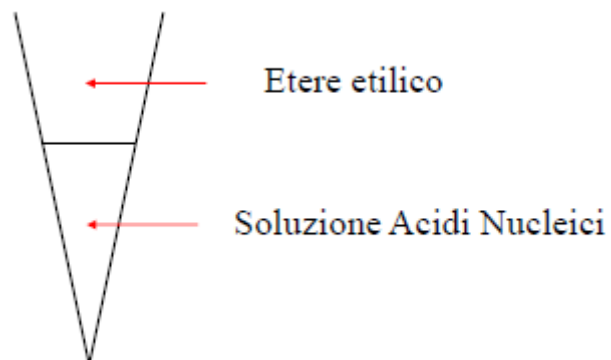


Figura 2. 4: Estrazione eterea.

2.4.5 Purificazione

La fase finale dell'estrazione è costituita dalla precipitazione alcolica.

La preparazione del DNA deproteinizzato è miscelata con 2 volumi di *etanolo assoluto*, in presenza di cationi monovalenti (acetato di sodio, acetato d'ammonio, cloruro di sodio) e viene lasciata precipitare.

L'alcool etilico determina modificazioni strutturali degli Acidi Nucleici che ne inducono l'aggregazione e quindi la precipitazione.

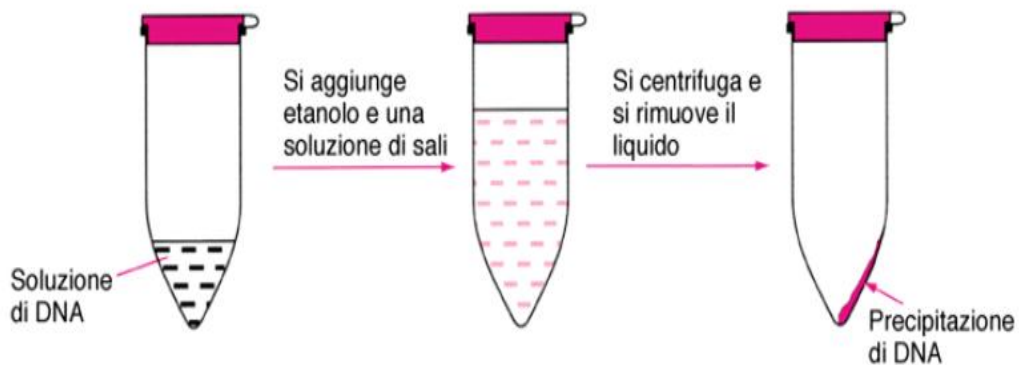


Figura 2. 5: Fase finale della purificazione: il DNA precipitato è pronto per essere raccolto.

2.4.6 Lavaggio

Dopo centrifugazione, i pellet di DNA vanno lavati in *etanolo 70%* e ricentrifugati. Tale lavaggio allontana i sali, insolubili in tale solvente.

Quindi il DNA viene risospeso in un tampone a bassa forza ionica, in genere TE (Tris-EDTA) a pH 7.6 - 8.0.

L'acido nucleico è pronto per essere dosato ed utilizzato per procedure quali analisi, PCR, marcatura ecc.

In fase di estrazione un' alternativa all'utilizzo di fenolo è il legame del DNA presente nella soluzione acquosa ad una resina di silice. In questo caso l'estrazione e la purificazione del DNA avvengono in un unico step; però alla fine del processo è necessario l'utilizzo di un buffer di eluizione: il DNA legato alla resina è recuperato facendo passare attraverso la stessa un tampone con un pH alcalino; il tampone alcalino, infatti causa un piccolo cambiamento nella struttura tridimensionale del DNA e provoca il distacco della molecola dalla resina.

L'intero processo di estrazione e purificazione impiega un tempo che può variare da 1 ora a 4 ore; infatti mentre la maggior parte delle fasi dura al massimo 15 minuti, la lisi cellulare può arrivare ad impiegare anche 3 ore.

In base ai reagenti utilizzati ed ai protocolli seguiti si distinguono diverse metodiche per l'estrazione del DNA tra cui le più note sono il Metodo CTAB che utilizza il tampone di lisi CTAB, detergente che elimina i polisaccaridi, il Metodo Wizard che sfrutta la resina wizard: silice carica positivamente in grado di legare il DNA (che ha nella sua molecola cariche elettriche negative).

2.5 Kit di estrazione

In alternativa ai classici metodi di purificazione degli acidi nucleici esistono in commercio numerosi kit di isolamento e purificazione degli Acidi Nucleici che rappresentano una alternativa sempre più utilizzata sia per i costi sia per la tempistica; tra i più noti figurano Promega, Perkin Elmer, Quiagen, Amersham e Boheringer. Esistono molti prodotti commerciali che garantiscono facilità d'uso, riproducibilità ed elevato livello di purificazione. Si basano essenzialmente sull'utilizzo di:

- Kit per estrazione in soluzione
- Resine a scambio ionico (scambiatori anionici come la DEAE cellulosa)
- Matrici silicee
- Gel filtration

- Ultrafiltrazione

Il kit Promega utilizza beads magnetiche per trattenere il DNA: la possibilità di utilizzare microbiglie rivestite di silice permette di evitare l'utilizzo della centrifuga saltando così diversi passaggi manuali; non solo, il vantaggio notevole è il risparmio di spazio dal momento che la centrifuga presenta dimensioni importanti.

Quindi questo metodo dimostra le potenzialità per poter integrare la purificazione del DNA su chip.

2.6 La purificazione del DNA su chip microfluidico

Oggi giorno la maggior parte delle analisi effettuate su campioni di DNA è svolta presso laboratori specializzati ad opera di personale competente.

Ma le sempre maggiori potenzialità conoscitive mostrate da varie tecniche come la PCR permette di credere che nei prossimi anni molte applicazioni potrebbero andar oltre i confini degli stessi laboratori.

L'obbiettivo a cui si tende nell'ultimo decennio è l'ambito *point of care testing*, ovvero alla possibilità di svolgere analisi direttamente sul campo, senza dover ricorrere a strutture apposite, accorciando quindi i tempi e riducendo i costi delle operazioni.

La messa in atto di tale concetto richiede strumenti di ridotte dimensioni, che operino in tempi rapidi e che siano quanto più possibile prefunzionalizzati, cioè sollevino l'utente da tutte quelle operazioni che richiederebbero competenze specialistiche.

Requisito fondamentale e inoltre il basso costo, che renda i prodotti accessibili anche a strutture con risorse limitate.

Questa prospettiva fa perno essenzialmente sulla possibilità di disporre di campioni di DNA puro; quindi lo sviluppo di tecnologie per l'analisi del DNA al di fuori dei laboratori contempla lo studio parallelo di soluzioni per la realizzazione dell'estrazione e della purificazione dell'acido nucleico direttamente in loco.

Il lavoro di tesi si basa sulla implementazione di uno strumento che in piccole dimensioni condensa tutti gli strumenti e le fasi necessari per ottenere un campione puro a partire da materiale grezzo come il sangue; i pochi grammi di peso, le ridotte misure e la bassa alimentazione (12 V) consentono un elevato grado di portabilità andando incontro al suddetto trend di rendere possibili ovunque analisi che altrimenti richiederebbero risorse e strumentazione da laboratorio.

Data la complessità del dispositivo, sarà trattata dapprima la parte relativa alla fluidica (micropompe, microvalvole, connessioni microfluidiche) con particolare attenzione alla progettazione e fabbricazione del chip microfluidico, cuore del processo di purificazione; successivamente si affronterà l'aspetto elettronico (hardware, firmware e software), analizzando nel dettaglio la progettazione dello stadio di potenza necessario al pilotaggio dei microattuatori fluidici (micropompe).

CAPITOLO 3

Lo Strumento: Fluidica

3.1 Introduzione

Lo strumento progettato è una complessa struttura costituita da parte fluidica e parte elettronica. Nel presente capitolo saranno trattate tutte le componenti microfluidiche; le micropompe con principio di attuazione piezoelettrico per la movimentazione dei fluidi attraverso il circuito microfluidico; le microvalvole per conferire direzionalità a fluidi o impedirne l'accesso in determinate zone del chip; le connessioni microfluidiche del chip che consentono l'ancoraggio allo strumento durante il processo di purificazione del DNA ed il successivo distacco una volta ottenuto il campione puro.

Sarà dedicata particolare attenzione al paragrafo riguardante il chip microfluidico (successivamente chiamato anche *disposable*); verranno illustrati i prototipi che hanno portato alla realizzazione del modello definitivo, i materiali utilizzati e le modalità di fabbricazione. Infine sarà dedicato un paragrafo alla spiegazione del protocollo di purificazione del DNA che si è seguito.



Figura 3. 1: Lo strumento: la cartuccia di WASTE in basso a sinistra è estraibile per permetterne lo svuotamento.

3.2 La struttura dello strumento

L'intero sistema occupa una superficie di 400 cm^2 e un'altezza di 8 cm.

E' possibile disporla verticalmente su 2 piani: la parte inferiore (figura 3.2) e quella superiore (figura 3.3). Nella prima vediamo che la fluidica è rappresentata dalla zona A costituita dal set di micropompe, e dalla E, preposta alla cartuccia di WASTE, ossia gli scarti di processo costituiti dalle sostanze contenenti membrane, proteine, polisaccaridi, lipidi che formano la cellula prima che questa venga distrutta per l'estrazione dell'acido nucleico; la zona B è riservata al motore stepper per il movimento del magnete mentre la D è la scheda di controllo del motore stesso; infine la C è la board di controllo dell'intero sistema. Nella seconda figura i riquadri H ed F rappresentano rispettivamente il vano di alloggio per il microchip fluidico e le cartucce dei buffers, 2 detergenti, 1 di lisi e 1 di eluizione; invece G è il braccio a cui è ancorato il magnete per la movimentazione delle microbiglie.

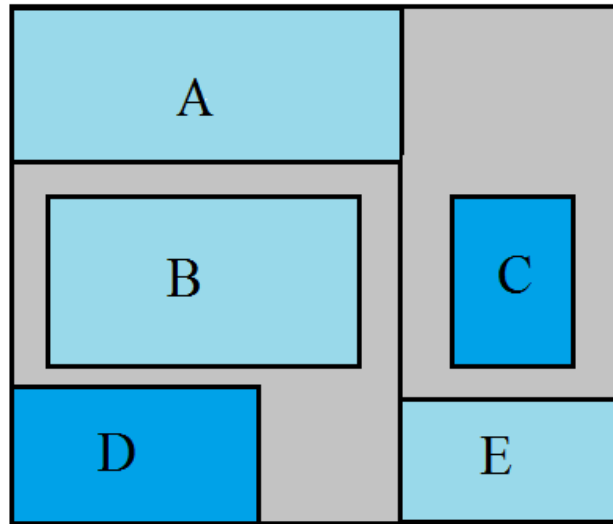


Figura 3. 2: Schema del Bottom dello strumento

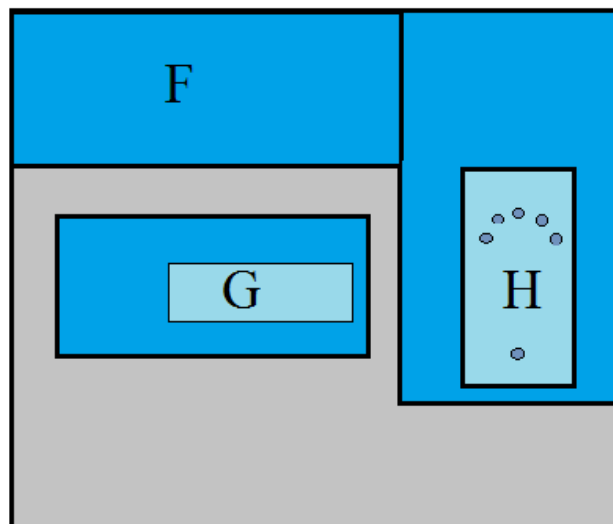


Figura 3. 3: Schema del Top dello strumento.

3.3 Le micropompe

L'integrazione del processo di purificazione riguarda essenzialmente due aspetti: l'eliminazione della centrifuga e l'utilizzo di microattuatori per il pompaggio dei fluidi in luogo della syringe pump.

Infatti ridurre le dimensioni di un apparato per poi pilotarlo con una ingombrante syringe pump non avrebbe senso.

Il principio di attuazione su cui si basano le micropompe utilizzate sfrutta l'effetto piezoelettrico inverso.

I cristalli piezoelettrici attraversati da una corrente o esposti ad un campo elettrico manifestano una deformazione; questa è sfruttata per flettere una membrana che provocherà il riempimento o lo svuotamento di una piccola camera determinando un pompaggio impulsato: attraverso lo scambio tra forze meccaniche e forze elettriche il liquido è trasportato in serie di piccoli volumi discreti.

I vantaggi che si manifestano nell'elevato volume di pompaggio, nella forza di attuazione e nella veloce risposta meccanica rendono tale principio molto conveniente nell'attuazione di micropompe.

Lo svantaggio è rappresentato dal fatto che i materiali piezo necessitano un pilotaggio ad alta tensione (centinaia di volt) per cui necessita la progettazione di uno stadio di potenza.

In figura 3.4 è visibile un esempio schematico di una tipologia a mensola di microattuatore piezoelettrico.

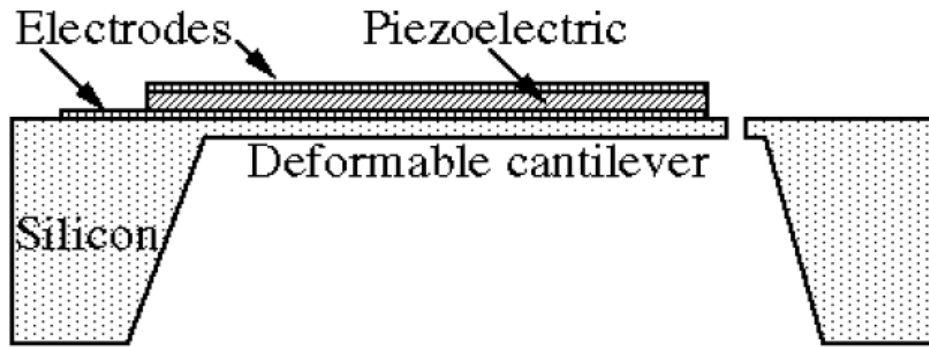


Figura 3. 4: Tipologia a mensola di un attuttore piezoelettrico.

E' osservabile la sottile pellicola piezoelettrica interposta fra i due elettrodi, è disposta in cima ad un campione a mensola di silicio. Quando una tensione di un centinaio di volt è applicata attraverso la pellicola piezoelettrica, provocherà l'espansione o la contrazione di quest'ultima, con conseguente deviazione in discesa o in salita, rispettivamente, della mensola.

La polarità della tensione applicata determina l'espansione o la contrazione della pellicola.

Le pellicole piezoelettriche sono usate per fornire l'attuazione in una varietà di applicazioni quali valvole, pompe e dispositivi di posizionamento. Le pellicole sottili piezoelettriche tipiche usate nei microattuatori sono l'ossido di zinco (ZnO), il PZT e il PVDF. Di questi materiali, il PZT ha i più elevati coefficienti piezoelettrici.

Il principio di funzionamento può essere descritto da un processo ciclico (figura 3.5), diviso in una fase di riempimento (il volume della camera della pompa aumenta) e una fase di pompaggio (il volume della camera diminuisce).

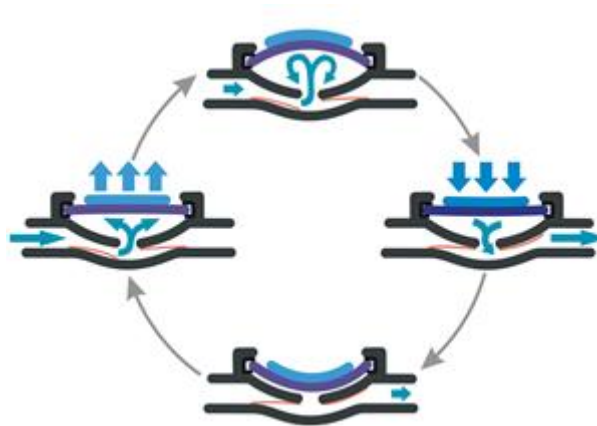


Figura 3. 5: Struttura ciclica del funzionamento della micropompa piezoelettrica.

Questo meccanismo richiede una differenza nella pressione del flusso fra l'ingresso e l'uscita per direzioni di scorrimento differenti. Un tale comportamento viene realizzato con valvole a mensola passive, che permettono una grande portata del fluido nel senso di andata e bassi tassi di perdita nel funzionamento inverso.

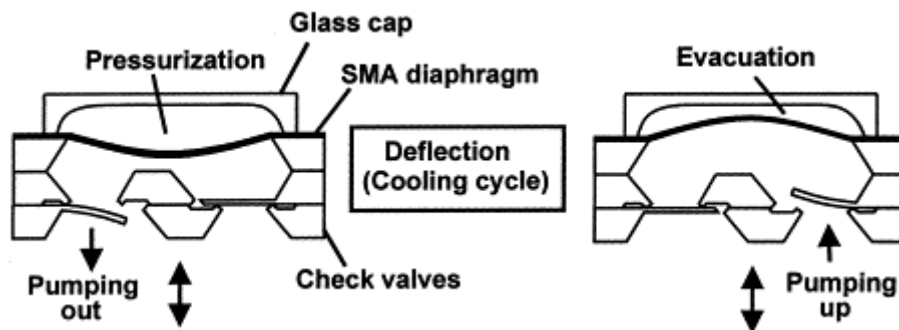


Figura 3. 6: Sistema di valvole passive a flap per la direzionalità del fluido.

Durante la fase di riempimento viene generata una depressione nella camera, che induce il liquido ad essere aspirato attraverso l'ingresso, non appena il Δp diventa superiore alla pressione di soglia della valvola di ingresso (inlet). Durante la fase di pompaggio si presenta un' aumento di pressione nella camera della pompa, che trasferisce il liquido all'uscita, non appena il Δp diventa superiore alla pressione di soglia delle valvole di scarico (outlet). In questa fase la valvola di ingresso sta

ostruendo un flusso d'inversione indesiderato, così come fa la valvola di uscita durante la fase di riempimento.

Il continuo sviluppo nella realizzazione di materiali piezoelettrici ha permesso di abbassare notevolmente le tensioni di pilotaggio; le tensioni tipiche di attuazione sono nella gamma del centinaio di volt.

Questa tensione di attuazione più bassa è utile per la progettazione di driver elettronici, che permettono il funzionamento a bassa potenza anche tramite alimentazione a batteria.

3.4 La piezoelettricità

La piezoelettricità è la proprietà di alcuni cristalli di generare una differenza di potenziale quando sono soggetti ad una deformazione meccanica.

L'effetto è reversibile e si verifica su scale dell'ordine dei nanometri.

Il funzionamento di un cristallo piezoelettrico è abbastanza semplice: quando viene applicata una pressione (o decompressione) esterna, si posizionano, sulle facce opposte, cariche di segno opposto. Il cristallo, così, si comporta come un condensatore al quale è stata applicata una differenza di potenziale. Se le due facce vengono collegate tramite un circuito esterno, viene quindi generata una corrente elettrica detta corrente piezoelettrica.

Al contrario, quando si applica una differenza di potenziale al cristallo, esso si espande o si contrae.

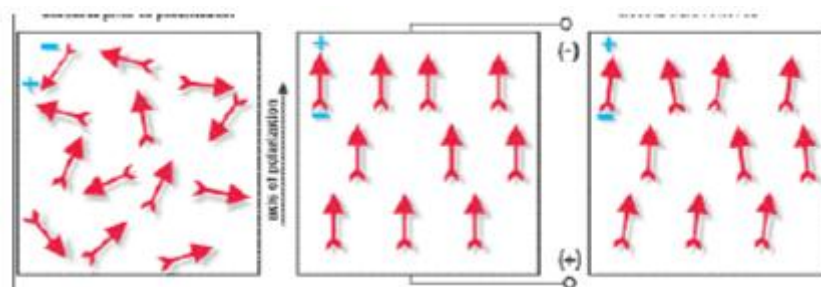


Figura 3. 7: Orientamento dei dipoli a seguito dell'applicazione del campo elettrico E.

Dal punto di vista della struttura cristallina, i materiali piezoelettrici hanno normalmente varie configurazioni geometriche equivalenti dal punto di vista dell'energia, cioè della stabilità del sistema, ma orientate diversamente.

Ad esempio il titanato di bario (BaTiO_3) ha una cella di forma romboidale che può allungarsi lungo uno qualsiasi dei tre assi principali. Per fargli acquisire proprietà piezoelettriche il materiale viene riscaldato ad una temperatura prossima a quella di Curie e immerso in un campo elettrico in modo da farlo polarizzare e raffreddare; alla fine del processo il materiale ha tutte le celle deformate nella stessa direzione.

E' importante notare che solo lungo questa direzione si hanno proprietà piezoelettriche. Al contrario, quando si applica una differenza di potenziale al cristallo, esso si espande o si contrae lungo un asse determinato provocando una vibrazione anche violenta. L'espansione volumetrica è facilmente pilotabile ed è strettamente dipendente dalla stimolazione elettrica. Le caratteristiche che contraddistinguono materiali che presentano proprietà piezoelettriche sono l'elevata efficienza di trasformazione elettro-meccanica, una buona lavorabilità ed un'ampia tipologia di forme ottenibili.

Alcuni minerali presenti in natura come il quarzo e la tormalina possiedono già tale proprietà; ma spesso nei dispositivi per micropompe si utilizzano cristalli artificiali come il titanato di Bario o come per i microattuatori utilizzati nel presente lavoro di tesi, il titanato di Piombo (PZT).

| DATA | Lead Zirconate Titanate | | | | | Lead Titanate |
|--|-------------------------|-------|-------|-------|-------|---------------|
| | SP-4 | SP-8 | SP-5A | SP-5J | SP-5H | SP-2 |
| Piezoelectric Coupling Co-efficient: | | | | | | |
| k_p | 0.60 | 0.50 | 0.61 | 0.60 | 0.63 | 0.01 |
| k_{33} | 0.68 | 0.63 | 0.70 | 0.71 | 0.73 | 0.52 |
| Piezoelectric Charge Constants | | | | | | |
| $d_{33}(\times 10^{-12} \text{ C/N})$ | 300 | 215 | 400 | 460 | 550 | 66 |
| $d_{31}(\times 10^{-12} \text{ C/N})$ | -11.5 | -9.5 | -170 | -210 | -265 | -3 |
| Piezoelectric Voltage Constants | | | | | | |
| $g_{33}(\times 10^{-3} \text{ Vm/N})$ | 26 | 25 | 25 | 22 | 19 | 39 |
| $g_{31}(\times 10^{-3} \text{ Vm/N})$ | -11 | -11 | -11 | -9 | -9 | -1.7 |
| Relative Dielectric Constant, K^T_{33} (low signal) | 1250 | 1000 | 1750 | 2450 | 3100 | 195 |
| Dissipation factor, $\tan \delta$ (low field) | 0.004 | 0.004 | 0.020 | 0.020 | 0.020 | 0.010 |
| Density ρ (kg/m^3) | 7600 | 7600 | 7650 | 7500 | 7500 | 6900 |
| Curie temperature, T_c ($^{\circ}\text{C}$) | 325 | 330 | 360 | 260 | 190 | 200 |
| Mechanical Quality Factor, Q_m | 500 | 1000 | 75 | 70 | 65 | - |
| Figure of Merit $d_{31} \times g_{31}$ ($\times 10^{-15}$) | 150 | 110 | 65 | 150 | 67 | 2400 |
| Elastic Constants, short circuit | | | | | | |
| $s^E_{11}(\times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{N})$ | 12 | 11 | 19 | 23 | 21 | - |
| $s^E_{33}(\times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{N})$ | 16 | 14 | 16 | 16 | 15 | - |
| Frequency Constants(Hz-m) | | | | | | |
| N_p (planar mode disk) | 2200 | 2270 | 1950 | 2000 | 1950 | - |
| N_t (thickness mode disk) | 1905 | 2032 | 1800 | 1950 | 2000 | 2200 |
| Ageing Rate, %change per time decade | | | | | | |
| K^T_{33} | -2.5 | -4.6 | -0.1 | -0.4 | -0.4 | -0.3 |
| k_p | -1.6 | -2.0 | -0.7 | -1.5 | -0.9 | - |
| N_p | +1.0 | +0.8 | +0.1 | +0.2 | +0.15 | +0.3 |

Tabella 2: Caratteristiche dei più comuni materiali piezoelettrici.

3.5 Il sistema microfluidico

Per capire come pilotare al meglio gli attuatori microfluidici bisogna prima comprendere come il sistema rappresentato dal chip risponde ad una azione esterna dovuta alla deformazione di un disco di PZT.

Supponiamo di poter schematizzare il PZT come un sottile cilindro di area A e altezza infinitesima L posto tra due elettrodi alla tensione V e sollecitato da una forza F di trazione.

Se il materiale è sollecitato da tensioni tali da produrre un comportamento piezoelettrico lineare si ha:

$$\sigma = K\rho - \varepsilon E \quad [3.1]$$

$$D = \varepsilon\rho + PE \quad [3.2]$$

dove

- $\sigma = F/A$ tensione
- $\rho = \Delta L / L$ deformazione
- $D =$ spostamento elettrico
- K è la costante elastica
- ε è la costante dielettrica
- P è la permittività dielettrica

Mettendo in corto gli elettrodi ($E = 0$) si ha:

$$\sigma = K\rho \quad [3.3]$$

$$D = \varepsilon \rho = \frac{\varepsilon}{K} \sigma \quad [3.4]$$

Rimuovendo la forza F ($\sigma = 0$) si ha:

$$\rho = \frac{\varepsilon \cdot E}{K} \quad [3.5]$$

$$D = \frac{\varepsilon^2}{K} + P \quad [3.6]$$

La 3.5 rappresenta l'equazione di principale interesse.

Infatti si aziona la micropompa fornendo una tensione e ottenendo una deformazione del cilindro, cioè una variazione del volume della camera di pompaggio che conseguentemente imprime pressione al fluido.

Dall'equazione evidenziata si nota che la deformazione del materiale varia linearmente con il campo elettrico applicato, e il coefficiente di proporzionalità dipende solo dalla costante dielettrica del materiale e da quella elastica.

Per comprendere il comportamento del sistema micropompa-chip è necessario analizzarlo dal punto di vista energetico:

$$\frac{1}{2} V(t)^2 C(t) = [kx(t) + \xi \dot{x}(t)] x(t) \quad [3.7]$$

Dove:

- V è la tensione applicata al piezoelettrico;
- C è la capacità associata al piezoelettrico;
- K è la costante elastica del PZT;
- x è la deformazione del disco di PZT;
- ξ è lo smorzamento del sistema.

Nell'equazione 3.7 è espressa l'energia elettrica impiegata nel caricare il condensatore (il disco di PZT) come il lavoro compiuto per vincere la forza elastica del piezoelettrico e lo smorzamento. Quest'ultimo parametro è legato alle perdite di carico del fluido impiegato nel sistema microfluidico che dipendono dalla sezione e dalla lunghezza dei microcanali del circuito (più stretti e più lunghi sono, più diventano significativi i fenomeni di attrito tra il fluido e le pareti dei canali in cui esso scorre).

Ma, inoltre, la capacità associata al disco di PZT non è costante bensì varia al variare della deformazione; è bene riscrivere l'equazione precedente tenendo conto di questo aspetto:

$$\frac{1}{2} V(t)^2 \varepsilon \frac{A}{d + x(t)} = [Kx(t) + \xi \dot{x}(t)] x(t)$$

[3.8]

Dove:

- d è lo spessore del disco di PZT;
- A è l'area del disco;
- ε è prodotto tra costante dielettrica del vuoto e quella relativa del PZT.

Si supponga di volere una deformazione lineare nel tempo:

$$x(t) = \alpha t$$

[3.9]

e

$$\dot{x}(t) = \alpha \quad [3.10]$$

Con α costante si ha:

$$\frac{1}{2}V(t)^2 \varepsilon \frac{A}{d + \alpha t} = [K\alpha^2 t^2 + \xi\alpha^2 t] \quad [3.11]$$

E' possibile ricavare il valore della tensione V in funzione del tempo t:

$$V(t) = \sqrt{\frac{2(d + \alpha t)}{\varepsilon A} [K\alpha^2 t^2 + \xi\alpha^2 t]} = \sqrt{\frac{2\alpha^2}{\varepsilon A} [Kt^2 + \xi t](d + \alpha t)} \quad [3.12]$$

Si noti che per piccole deformazioni del piezoelettrico (cioè αt trascurabile rispetto a d), per ottenere una deformazione meccanica che vari linearmente con la tensione, è necessario ridurre il più possibile lo smorzamento; questo vuol dire che si può ottenere maggior linearità e minor impiego di energia utilizzando fluidi poco viscosi ed evitando brusche deformazioni del piezoelettrico (cioè alte velocità di scorrimento del fluido).

Questo risultato è importante perché facilita molto il controllo del sistema: sapendo che la deformazione è direttamente proporzionale alla tensione applicata, per ottenere una data alterazione dello spessore del piezoelettrico, è possibile applicare il controllo elettronico direttamente alla tensione fornita al disco di PZT, senza dover trasdurre le deformazioni meccaniche dell'attuatore in un segnale elettronico di feedback, che complicherebbe notevolmente il sistema.

Nei materiali piezoelettrici usati nella realizzazione di microattuatori, si ottiene tipicamente una deformazione massima del materiale di circa l'1%; questo significa che l'equazione può essere scritta come:

$$\frac{1}{2}V^2 \cdot C = [K \cdot x^2(t)]$$

[3.13]

3.6 Le micropompe della Bartels Mikrotechnik

Le micropompe scelte per la realizzazione dello strumento sono le mp-6 della Bartels Mikrotechnik; sono pompe piezoelettriche a diaframma.

Diversamente a quanto si è visto nei paragrafi precedenti la struttura di questi microattuatori si sviluppa orizzontalmente; come si può osservare dalla figura 3.x l'unica differenza consiste nell'ancoraggio dei flap delle valvole passive: in fase di compressione del disco di PZT il fluido è aspirato all'interno della microcamera mentre in fase di dilatazione lo stesso viene espulso attraverso la valvola ed il beccuccio di uscita.

Durante queste fasi il compito delle valvole è quello di far passare ed arrestare il liquido in base alla variazione di pressione all'interno della camera: il comportamento è lo stesso delle strutture verticali.

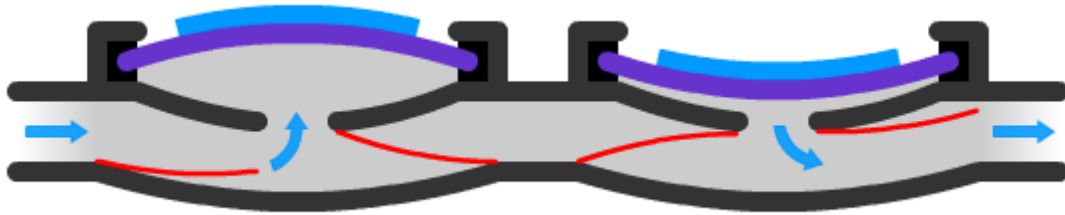


Figura 3. 8: Struttura orizzontale della micropompa mp-6: L'ancoraggio della valvola di inlet è sulla parte bassa mentre quello della valvola di outlet è sulla parte alta.

Dalla figura 3.8 si possono constatare le ridotte dimensioni del film di PZT: circa 8 mm di diametro fissato ad una base metallica molto flessibile che funge tra elettrodo inferiore.

L'unidirezionalità del flusso è garantita dalla morfologia stessa della struttura: il fluido può scorrere da sinistra a destra ma non il contrario.

Le caratteristiche tecniche, il costo contenuto e la reperibilità sul mercato hanno condotto alla scelta di utilizzare questo microattuatore.

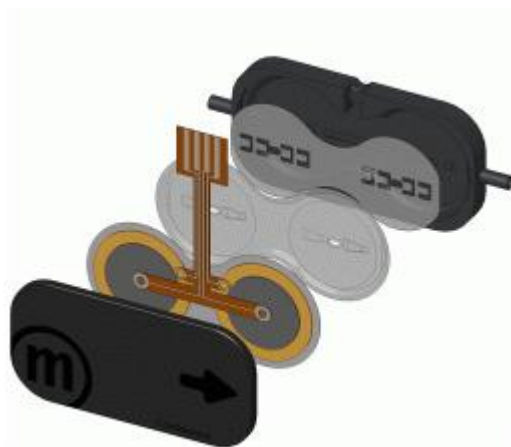


Figura 3. 9: Sezione della micropompa mp-6: in ordine si distinguono i dischi di PZT, le camere di riempimento e la struttura delle valvole passive.

3.6.1 Caratteristiche tecniche

Le dimensioni della pompa soddisfano ai requisiti di integrabilità richiesti: i lati di 30 x 15 mm^2 e uno spessore di appena 3.8 mm; il peso è anch'esso molto ridotto, circa 2 g.

Le connessioni fluidiche hanno un diametro esterno di 1.6 mm e utilizzano microtubi con diametro interno di 1.3 mm.

La collegamento elettrico è realizzato da un connettore flessibile Molex e a pino regime la dissipazione di potenza non raggiunge i 200 mW.

La biocompatibilità è garantita dai materiali a contatto coi fluidi (polipropilene PPSU, Polimide PI e Epoxy Resin EP); la portata massima è importante date le dimensioni (6ml/min) e ottenibile a frequenze ridotte (circa 100 Hz).

Technical Data of the mp6 ¹

| | | | |
|--|--|--------------------|---------------------------|
| mp6 | Order code: mp6 | | |
| Pump type | piezoelectric diaphragm pump | | |
| Number of actuators | 2 | | |
| Dimensions without connectors | 30 x 15 x 3.8 mm ³ | | |
| Weight | 2 g | | |
| Fluidic connectors | tube clip (outer diameter 1,6 mm, length 3,5 mm) | | |
| Electric connector | flex connector / Molex FCC 1,25 mm pitch | | |
| Power consumption | < 200 mW | | |
| Self-priming | yes ² | | |
| Pumping media | liquids, gases and mixtures | | |
| Operating temperature | 0 - 70°C ³ | | |
| Life time | 5000 h ³ | | |
| IP code | IP33 ⁴ | | |
| Materials in contact with media | polyphenylene sulphone (PPSU) | | |
| Suitable evaluation controller | mp-x and mp6-OEM | | |
| Typical values of flow and back pressure for selected media (values defined with mp-x: 250 V, SRS): | | | |
| Gases | | Max. flow | on request |
| | | Max. back pressure | on request |
| Liquids | | Max. flow | 6 ml/min +/- 15% (100 Hz) |
| Water | | Max. back pressure | 550 mbar +/- 15% (100 Hz) |

¹ Typical values. Values can vary under application conditions. Content is subject to changes without notice.

² Conditions: suction pressure < 10 mbar, DI water, settings mp-x: 100 Hz, 250 V, SRS, the max. flow rate will be reached after a few minutes of operation time.

³ Value of previous version

⁴ Can be changed to IP44

Tabella 3: Caratteristiche tecniche della micropompa mp-6.

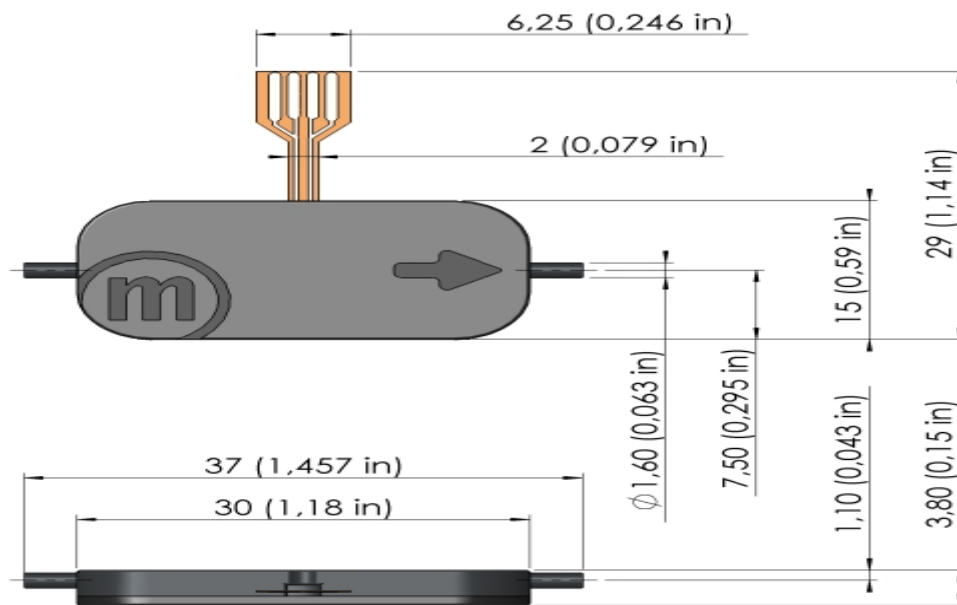


Figura 3. 10: Le ridotte dimensioni della micropompa mp-6.

3.6.2 Caratteristiche del flusso

Vediamo come si comporta la micropompa al varia della pressione, dell'ampiezza e della frequenza di comando.

Dalla figura 3.11 si può osservare come la portata dipende linearmente dalla contropressione: a 0 mbar è possibile raggiungere il flusso massimo mentre esisterà un valore della contropressione che porterà a zero il valore della portata in modo lineare.

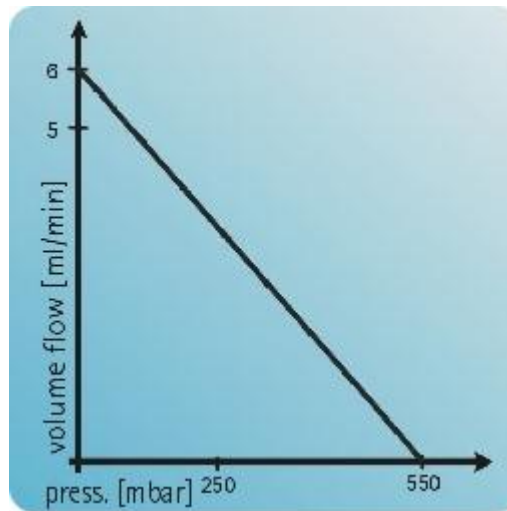


Figura 3. 11: Variazione della portata della micropompa in funzione della pressione.

Allo stesso modo la portata aumenta con l'ampiezza; bisogna considerare, però, che il disco di PZT dato il suo spessore può sopportare fino ad un determinato valore di tensione (in questo caso circa 350 V) dopodiché si romperà.

Inoltre la deformazione del disco dovuta alla tensione applicata definisce la variazione del liquido pompato per ciclo di pompaggio; in questo caso la massima deformazione è limitata dal packaging e sperimentalmente non può andare oltre un valore corrispondente ad una tensione di 280 V.

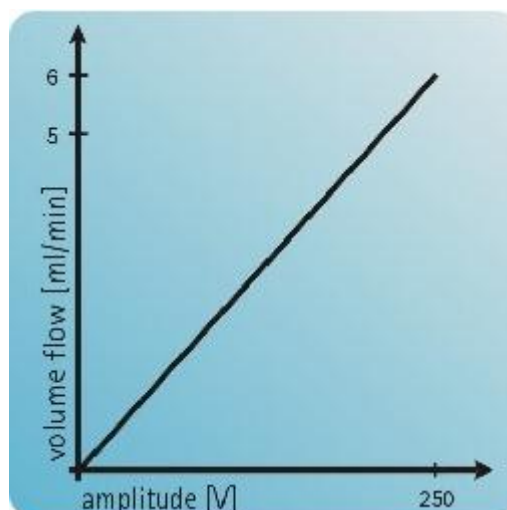


Figura 3. 12: Variazione della portata della micropompa in funzione dell'ampiezza di pilotaggio.

La portata aumenta con la frequenza fino al valore massimo, in corrispondenza della frequenza di risonanza.

Le due grandezze dipendono strettamente dalla viscosità del fluido; come si può osservare dal Grafico 2, minore è la viscosità e maggiori sono la portata massima e la frequenza di risonanza; superata quest'ultima il flusso diminuisce nuovamente.

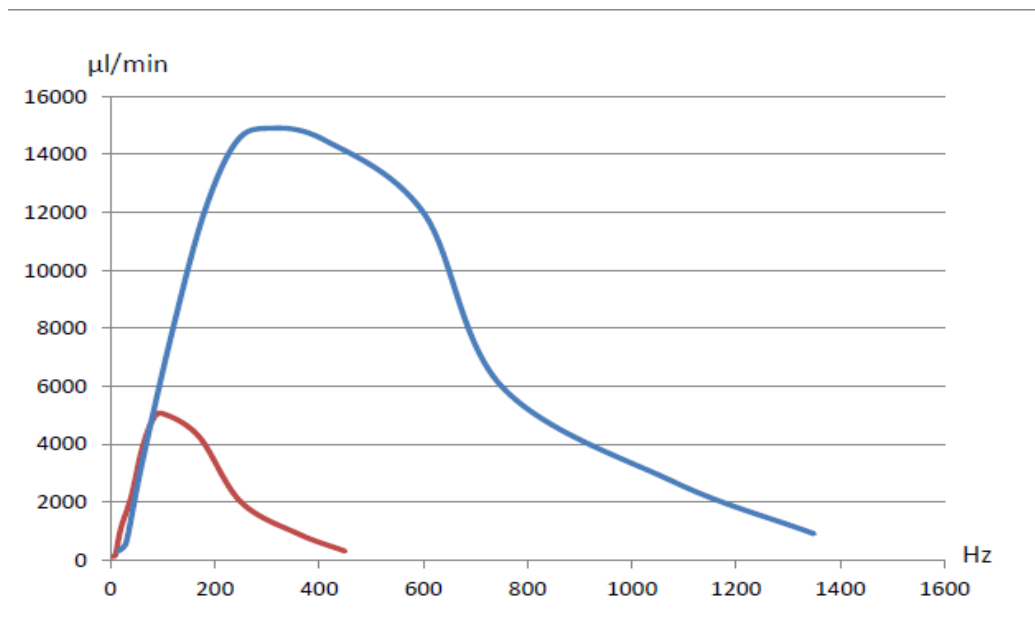


Grafico 2: Variazione della portata della micropompa in funzione della frequenza: la frequenza di risonanza dipende dalla densità del fluido; per l'acqua vale circa 100 Hz per l'aria circa 200Hz.



Figura 3. 13: La micropompa mp-6 della Bartels Mikrotechnik.

3.7 Il chip microfluidico

Oltre allo strumento vero e proprio, la progettazione del chip microfluidico rappresenta una parte essenziale del presente lavoro di tesi; esso rappresenta il cuore del processo di estrazione del DNA, è al suo interno che avviene la distruzione della membrana cellulare e la purificazione dell'acido nucleico.

Le difficoltà incontrate durante la sua realizzazione riguardano soprattutto la tenuta; questa è intesa sia interna al chip stesso sia esterna a causa del collegamento con lo strumento.

Altri problemi riguardano il fenomeno del pinnig ossia la comparsa di microbolle durante la fase di riempimento del chip (da qui in avanti chiamato *disposable*); e la realizzazione delle valvole per poter direzionare ed indirizzare i vari reagenti all'interno del circuito fluidico.

I materiali utilizzati sono comuni a tutti i prototipi grazie al fatto che garantiscono buona lavorabilità e biocompatibilità: sono policarbonato e polidimetilsilossano.

Col primo si sono realizzate le strutture rigide quali microcanali e microcamere di reazione; mentre il secondo, comunemente chiamato PDMS, grazie alle proprietà di trasparenza, elasticità, esiguo ritiro volumetrico e ottima replica di superfici è stato impiegato per la realizzazioni di guarnizioni.

I primi tentativi di realizzazione hanno riguardato la dimensione e la forma ideale della microcamera in cui si realizza la purificazione della molecola; come si vede dalle figure 3.14 e 3.15 le geometrie prese in considerazione sono le più svariate e la loro analisi ha condotto principalmente a 2 risultati:

- I microcanali non devono avere curvature maggiori di 45 gradi, pena l'aumento resistivo delle pareti;
- La microcamera non deve presentare angoli minori di 160 gradi; questo per evitare che rimangano residui liquidi in prossimità degli angoli una volta che la camera è svuotata alla fine di ogni ciclo di lavaggio;
- L'angolatura d' ingresso alla camera deve essere maggiore di quella d'uscita per permettere un riempimento totale della suddetta.

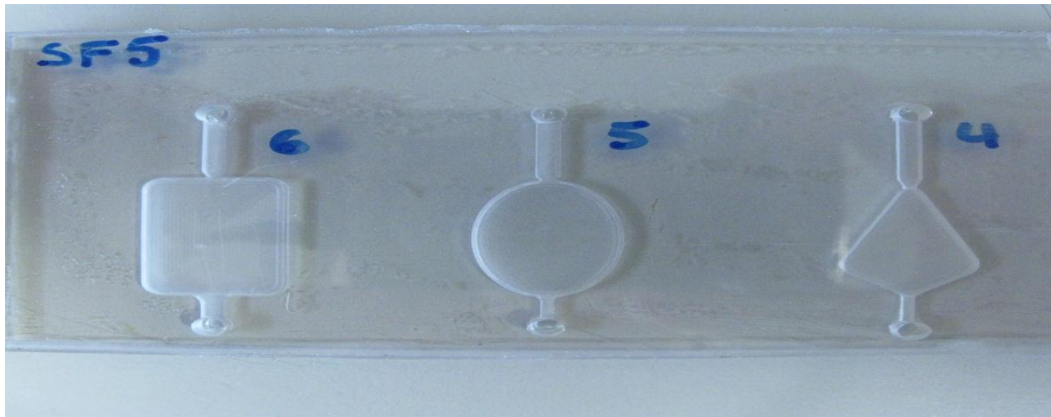


Figura 3. 14: Array di microcamere A .

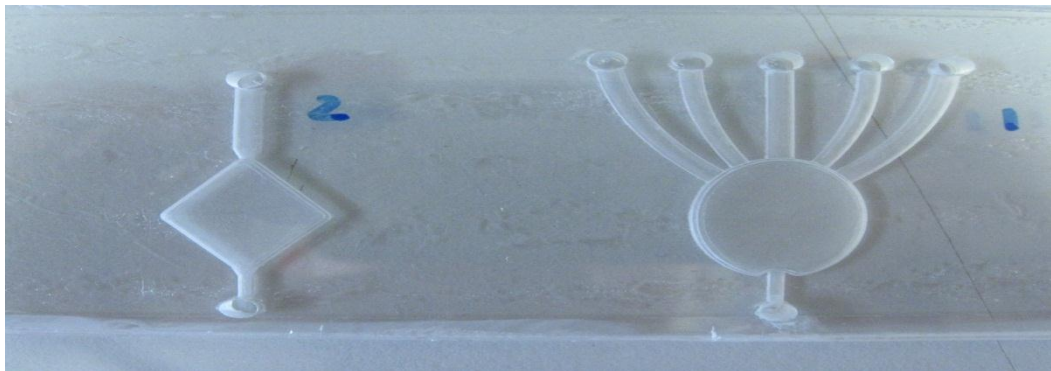


Figura 3. 15: Array di microcamere B.

Queste osservazioni hanno condotto a disegnare i canali privi di angoli e alla geometria finale della microcamera che presenta una forma riconducibile alla sovrapposizione tra un rombo ed un ellisse (figura 3.16). Inoltre residui inevitabili di aria all'interno della microcamera determinano la comparsa di bolle che se non adeguatamente eliminate possono compromettere la bontà del processo di estrazione. Il fenomeno di intrappolamento del menisco formatosi tra aria e liquido prende il nome di pinning e avviene quando l'interfaccia liquido-gas resta vincolata ad un'imperfezione di lavorazione. E' necessario eliminare le bolle d'aria attraverso l'introduzione di particolari geometrie presenti in corrispondenza dell'ingresso e dell'uscita della microcamera (figura 3.16).

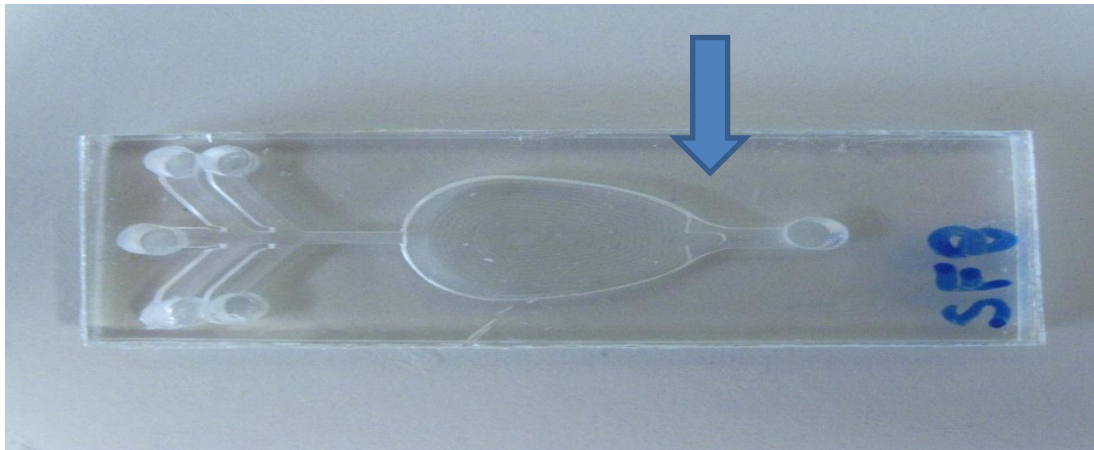


Figura 3. 16: Prototipo di chip microfluidico SF8; la struttura indicata dalla freccia permettere di evitare la formazione di microbolle d'aria.

La lavorazione del polycarbonato è stata effettuata con una microfresa a controllo numerico (CNC) che ha permesso non solo di realizzare canali di 500um di larghezza e 300um di profondità ma grazie all'elevata precisione anche le complicate microstrutture indispensabili per la compensazione delle bolle d'aria.

Le connessioni microfluidiche prendono ispirazione dal ben collaudato meccanismo di incastro tra una siringa ed il proprio ago: il luer (figura 3.17).

La parte "maschio" è presente sullo strumento mentre la "femmina" è ricavata sul disposable incidendo il polycarbonato per 3 mm di profondità realizzando un tronco di cono con angolazione del 6%. In questo modo è garantita la connessione del chip alle pompe evitando eventuali perdite.



Figura 3. 17: Luer per l'ancoraggio del chip microfluidico allo strumento.

Il *diposabile* è composto oltre che da una parte fluidica, anche da una elettronica; un chip in silicio dotato di un sensore di temperatura ed un riscaldatore collocato proprio sotto la camera di reazione.

Infatti dal momento che alcuni protocolli di purificazione prevedono il riscaldamento del campione grezzo durante la fase di lisi al fine di rompere la membrana cellulare, la realizzazione di uno strumento completo implica l'integrazione di questa funzione.

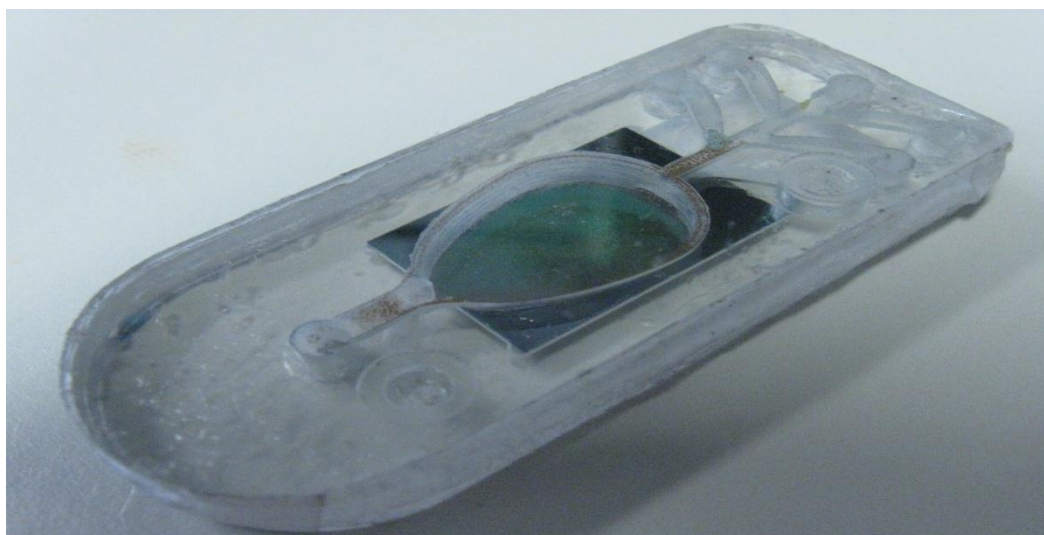


Figura 3. 18: Modello migliorato di chip microfluidico.

3.8 Il chip in silicio

IL chip è realizzato da STMicroelectronics per applicazioni di biologia molecolare come la PCR; è quindi ottimizzato per altri strumenti ma si adatta benissimo ai nostri scopi. Essendo in silicio offre il vantaggio di una buona conducibilità termica (148 W/m K) e, date anche le dimensioni ridotte, di una bassa capacità termica (dato che il calore specifico è pari a 700 J/kg K). Ciò garantisce un rapido ed efficiente trasferimento di calore verso la miscela di reazione.

Sulla parte inferiore del substrato (figura 3.19) sono integrati sia i riscaldatori che il sensore di temperatura, ottenuti tramite deposizione di metal di alluminio



Figura 3. 19: Chip in silicio contenente sensori di temperatura e riscaldatori per permettere il trattamento in temperatura del campione all'interno della microcamera.

I riscaldatori consistono in quattro elementi resistivi in alluminio connessi in parallelo, che generano potenza termica per effetto Joule in seguito all'applicazione di una tensione elettrica.

Essi sono disposti in modo da ricoprire l'intera superficie del chip ad eccezione della parte centrale e dell'area destinata ai contatti. La parte centrale, in cui è posto invece il sensore, è lasciata libera dai riscaldatori in misura proporzionale alla distanza dai lati esterni. Ciò consente di migliorare l'uniformità della distribuzione di temperatura sulla superficie del chip (che altrimenti tenderebbe a scaldarsi maggiormente proprio al centro) nonché l'effettiva corrispondenza tra la temperatura rilevata dal sensore e quella presente sull'intero substrato.

La configurazione a quattro elementi in parallelo consente un meccanismo di compensazione: le resistenze più vicine alla zona dei contatti, avendo il compito di scaldare un'area più vasta, sono leggermente più piccole, perciò a parità di tensione applicata sviluppano una maggiore potenza termica.

Il sensore è di tipo RTD (Resistance Temperature Detector), e a sua volta costituito da una resistenza in alluminio e sfrutta la variazione di resistività del materiale in funzione della temperatura.

I dati numerici relativi ad attuatori e sensore sono i seguenti:

- Resistenza della metal in alluminio: 30mU/Quadro
- Resistenza dei riscaldatori (si intende la resistenza equivalente, teorica a 25°C): 23.5U (serpentina da 115 µm, isolamento 30 µm).
- Resistenza del sensore di temperatura (teorica a 25°C): 1 kU (serpentina da 5 µm, isolamento 5 µm).

Nella parte inferiore del chip sono presenti quattro contact pads: due più esterni, relativi ai riscaldatori, e due interni, relativi al sensore. Questi consentono il contatto per strisciamento, che avviene tramite l'apposita contattiera presente sullo strumento.

Attivare o disattivare i riscaldatori significa consentire o interrompere il passaggio di corrente attraverso di essi. Volendo sfruttare per questo un segnale PWM, si può pensare di applicare direttamente ai riscaldatori i livelli di tensione estremi che il microcontrollore è in grado di generare, ossia 0V per il livello basso e 3,3V per il livello alto.

Ma dato il basso valore delle resistenze che fungono da riscaldatori (circa 23Ω), per raggiungere la temperatura desiderata in tempi brevi è preferibile fornire i 12V dell'alimentazione, attraverso un circuito che utilizza un transistor nMOS, pilotato al gate dal segnale PWM, come interruttore di corrente.

Si è aggiunto, tra i contatti del chip e l'alimentazione, un pMOS di protezione che viene spento nel momento in cui il chip non è presente, onde evitare accidentali cortocircuiti che potrebbero danneggiare il microcontrollore.

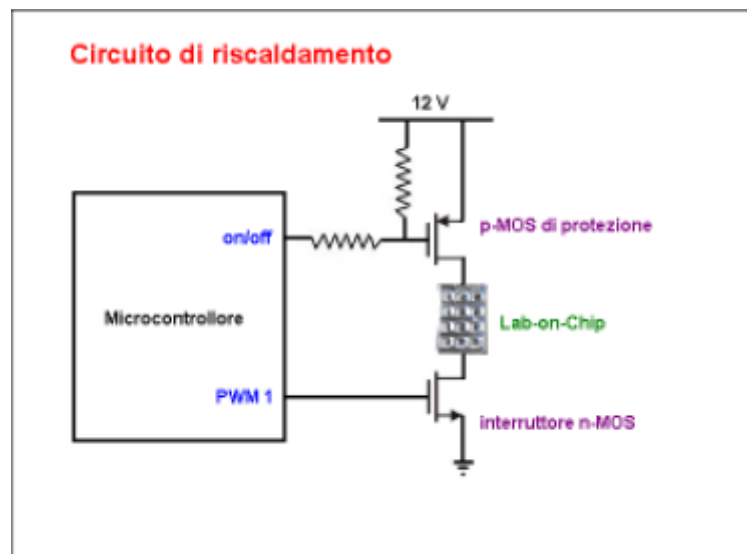


Figura 3. 20: Schema dell'azionamento del circuito di riscaldamento attraverso modulazione PWM.

Il pMOS è controllato da un apposito segnale logico alto/basso.

La frequenza del segnale PWM, e quindi di accensione/spengimento del nMOS, è di circa 600Hz (periodo di circa 1.67 ms).

Data l'applicazione prevista, non è necessario attuare a valle un filtraggio passa basso di tipo elettrico. Il segnale che interessa produrre, infatti, è una potenza che inciderà sul riscaldamento o raffreddamento del sistema. I transistori termici hanno tempistiche dell'ordine di decine o centinaia di secondi, quindi molto più lente rispetto al periodo dell'onda quadra.

Sono dunque le capacità e le resistenze termiche in gioco ad operare una sorta di filtraggio sulla potenza applicata, consentendo di vederne solo il valore medio, che sarà

$$\bar{P} = \frac{(V_{\max.})^2}{R_{heaters}} \cdot D \quad [3.14]$$

La scelta del transistor MOS da utilizzare tiene conto della necessità di avere tempi di commutazione rapidi, in modo da riprodurre fedelmente in uscita la frequenza del segnale d'ingresso, ottenendo il valore medio desiderato.

Si punta dunque a valori minimi dei parassitismi capacitivi presenti. Inoltre sarà opportuna una bassa R_{DSon} , per consentire che tutti i 12V dell'alimentazione cadano sui riscaldatori.

Ovviamente, la soglia di accensione del transistor dovrà essere inferiore a 3.3V, ma questa caratteristica è comune alla maggior parte dei MOS commerciali.

Nel capitolo 4 si vedrà dettagliatamente come è stato implementato l'algoritmo di lettura e controllo della temperatura.



Figura 3. 21: Particolare dell'alloggiamento del chip sullo strumento; da notare il magnete pilotato dallo stepper.

3.9 Le valvole

Il processo di purificazione prevede che il campione grezzo sia trattato con diversi buffers in fasi diverse.

Questo implica che un determinato reagente possa entrare in circolo nel chip fluidico e contemporaneamente gli altri siano bloccati: è necessario l'utilizzo di valvole.

Il primo sistema di valvole prese in considerazione era esterno al disposable e si basa sul principio CAM: la valvola interposta tra il cartuccia contenente il buffer ed il chip schiaccia letteralmente il tubicino di connessione impedendo il passaggio del fluido (figura 3.22). Questa soluzione è stata presto abbandonata visto che non consentiva un elevato grado di integrazione.

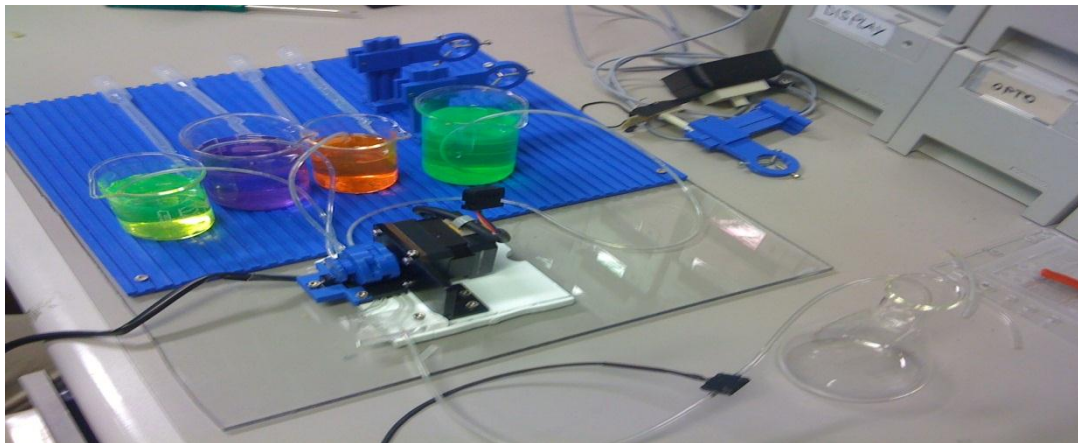


Figura 3. 22: Set-up di prova per testare il funzionamento delle valvole CAM.

In seguito l'attenzione si è concentrata sullo sviluppo di valvole piezoelettriche.

In questo caso il passaggio del liquido è ostruito da un pistone pilotato dalla deformazione di un PZT.

Dal punto di vista dell'integrazione rispetto alle CAM presenta notevoli vantaggi ma si dovrebbero avere dischi piezo molto piccoli e quindi soggetti a facili rotture a causa di tensioni alte ed inoltre si dovrebbero prevedere ulteriori stadi di potenza a danno sia dell'occupazione di area che della dissipazione di potenza.

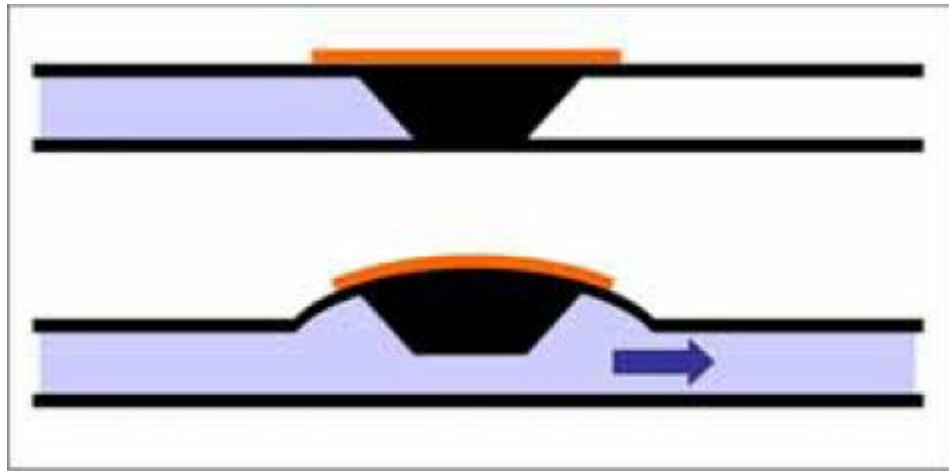


Figura 3. 23: Valvole con principio di funzionamento piezoelettrico; in base alla tensione con cui si pilota il disco di PZT il pistone si alza e abbassa.

Quindi un'altra soluzione presa in considerazioni prevedeva l'utilizzo di valvole magnetiche (PDMS-Fe); il processo di realizzazione prevede di introdurre microbiglie magnetiche (le stesse utilizzate per la purificazione) all'interno di PDMS col quale si dà forma alle valvole. Attraverso un magnete si agisce sui flap delle valvole, ricchi di microbiglie, permettendo l'apertura o la chiusura del passaggio. Anche in questo caso l'integrazione della valvola è realizzabile ma necessita della presenza di un grosso magnete esterno.

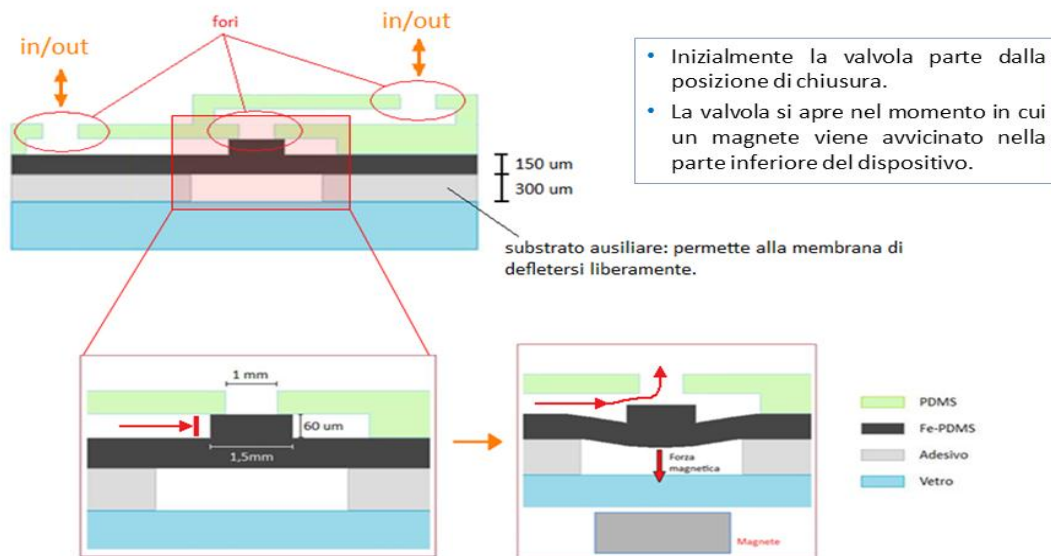


Figura 3. 24: Valvole magnetiche; avvicinando il magnete si permette l'apertura della valvola.

Le tre soluzioni nonostante garantiscano un buon isolamento e direzionalità dei fluidi presentano problemi legati all'integrazione.

In realtà in microfluidica, come visto nei capitoli precedenti, i fluidi si muovono secondo regime laminare e quindi è possibile sfruttare questo aspetto per poter creare un buon sistema di valvole.

Infatti, sfruttando lo stesso principio del focus idrodinamico, regolando il modo opportuno le tensioni e le frequenze con cui si pilotano le micropompe è possibile realizzare delle valvole "virtuali" dal momento che i liquidi non si miscelano.

Azionando una pompa in modalità di pompaggio e un'altra in modalità di aspirazione dalla parte opposta della cameretta, soltanto un buffer attraverserà il chip microfluidico.

Il sistema non richiede nessun elemento aggiuntivo e quindi è il miglior candidato per l'integrazione.

Quindi il *disposable* è un chip microfluidico che integra una parte elettronica per il riscaldamento della cameretta di reazione; ha dimensioni di 5x2 cm e si compone di due parti incollate l'una sull'altra per uno spessore totale di 4 mm; la parte inferiore alta 3 mm è incisa da entrambi i lati per alloggiare su un lato il chip in silicio e sull'altro i microcanali, la cameretta di reazione ed il pozzetto del campione grezzo; la parte superiore presenta 2 fori preposti per l'inserimento del campione grezzo (sangue o saliva) ed il prelievo del campione puro dopo l'avvenuto processo. Le 2

parti sono incollate attraverso uno speciale biadesivo della 3M resistente all'acqua e alle alte temperature.

Inoltre prima della suddetta chiusura il *disposable* è prefunzionalizzato con l'inserimento delle microbiglie all'interno della camera di reazione: durante l'estrazione del DNA le microbeads svolgeranno il duplice ruolo di centrifuga e "resina" per la cattura dell'acido nucleico.

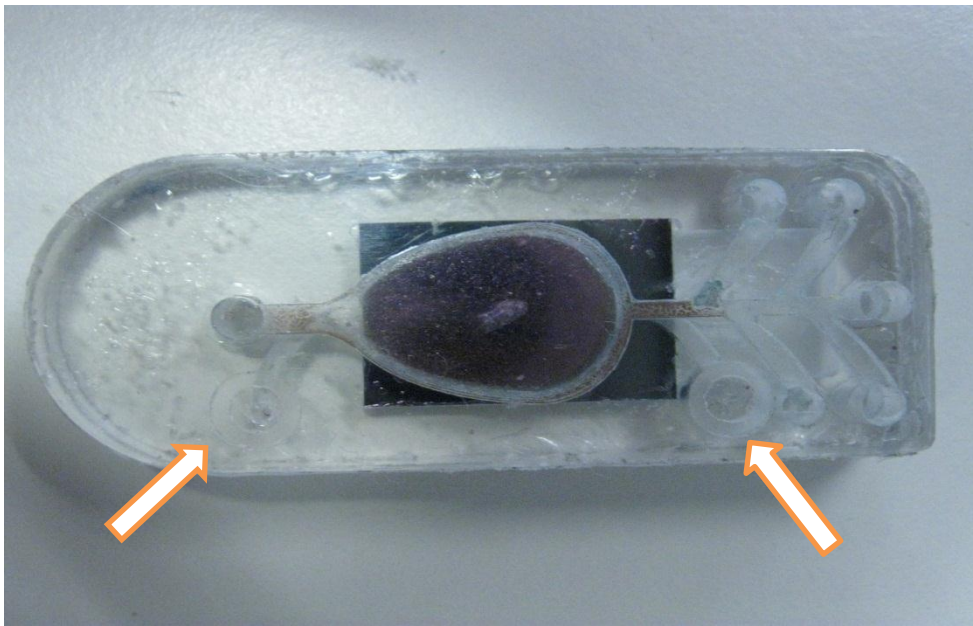


Figura 3. 25: Chip microfluidico finale; da notare l'ingresso del campione grezzo e l'uscita del campione purificato

3.10 Algoritmo di funzionamento dello strumento

Prima di affrontare il tema riguardante l'elettronica è bene capire quale compito lo strumento è chiamato a svolgere.

Le fasi principali della estrazione e purificazione del DNA possono essere riassunte in:

- Lisi
- Estrazione

- Purificazione
- Lavaggio
- Eluizione

Vediamo come esse vengono eseguite dallo strumento.

Dopo aver agganciato il disposable prefunzionalizzato allo strumento attraverso il luer, è possibile introdurre il campione di sangue nell'apposito pozzetto; quest'ultimo viene chiuso attraverso un piccolo tappo prodotto in PDMS; viene sospeso il magnete al di sopra della cameretta per trattenere le microbiglie e la purificazione del campione può avere inizio.

Attivando la pompa 1 in aspirazione e la 2 in pompaggio viene introdotto il buffer di Lisi.

Con sangue e buffer all'interno della camera si centrifuga attraverso un movimento oscillatorio del braccio a cui è agganciato il magnete.

Si blocca il magnete al di sopra della cameretta; ora il DNA è agganciato alla silice di cui le microbiglie sono rivestite.

Si aziona la pompa 4 in pompaggio e la 1 in aspirazione per svuotare la cameretta stessa dai residui della membrana molecolare che andranno nella cartuccia di WASTE a cui la pompa 1 è connessa.

La pompa 4 in realtà non è connessa ad alcuna cartuccia ma pompa semplicemente aria;

questa in sinergia con la pompa 1 permette lo svuotamento della cameretta ed evita che gli altri buffer entrino in circolo: è l'applicazione delle valvole "virtuali".

Adesso si introduce il primo buffer di detersione azionando sempre la pompa 1 in aspirazione e questa volta la 3 in pompaggio; si effettua nuovamente un ciclo di "shake" del magnete e con questo fermo sulla cameretta si effettua lo svuotamento.

La stessa operazione sarà effettuata per il secondo buffer di detersione.

Infine verrà introdotto il buffer di eluizione: cambierà il pH presente all'interno della cameretta provocando il distacco del DNA, adesso puro, dalle microbiglie.

Quindi mantenendo sempre il magnete fisso sulla cameretta attraverso pipetta si può prelevare l'acido nucleico dal foro preposto (questo è presigillato in fase di

fabbricazione attraverso una sottile membrana che potrà essere rotta semplicemente col puntale della pipetta).

A questo punto il DNA puro è pronto per qualsiasi applicazione di biologia molecolare mentre il disposable, una volta estratto dallo strumento, è destinato alla pattumiera (dei rifiuti speciali).

CAPITOLO 4

Lo Strumento: Elettronica

4.1 Introduzione

L'utilizzo di microattuatori che sfruttano l'effetto piezoelettrico comporta l'utilizzo di uno stadio di potenza per il pilotaggio delle micropompe; queste necessitano di tensioni di centinaia di volt a fronte di un'alimentazione dello strumento di 12 Volt.

Inoltre è necessario pilotare il motore stepper che controlla il braccio a cui è ancorato il magnete necessario alla movimentazione delle microbiglie.

In questo capitolo si affronterà la progettazione dello stadio di potenza e si vedranno le soluzioni adottate per i segnali di comando delle pompe e del motore del braccio; si vedranno il firmware scritto per la generazione dei comandi e il software per la gestione dello strumento attraverso pc.



Figura 4. 1: Top view dello strumento.

4.2 La Board di controllo

La board di controllo è il centro nevralgico del sistema.

Ha il compito di gestire il funzionamento delle micropompe, dei riscaldatori e del motore passo-passo che controlla il braccio a cui è ancorato il magnete; inoltre permette l'interfacciamento dell'utente attraverso comunicazione seriale USB consentendo il controllo totale di tutte le operazioni dello strumento tramite PC.

Il microcontrollore, provvede a fornire la potenza termica richiesta in fase di aumento della temperatura; i valori dei segnali PWM sono calcolati a partire dai valori di temperatura all'interno della camera di reazione: un apposito circuito di condizionamento dei sensori consente di rilevare la temperatura del campione biologico mediante sensori posizionati in prossimità della camera di reazione.

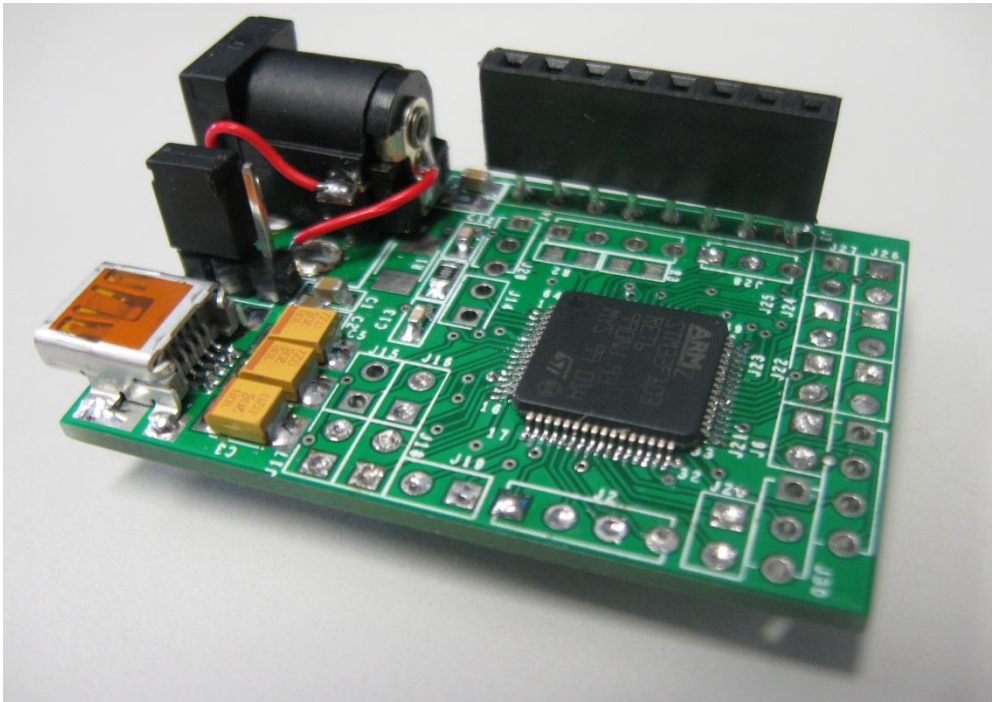


Figura 4. 2: Board di controllo: cuore elettronico dello strumento.

Inoltre invia i segnali di comando al driver della scheda motore e controlla l'azionamento delle pompe attraverso un anello chiuso effettuando il sensing sulla tensione di uscita.

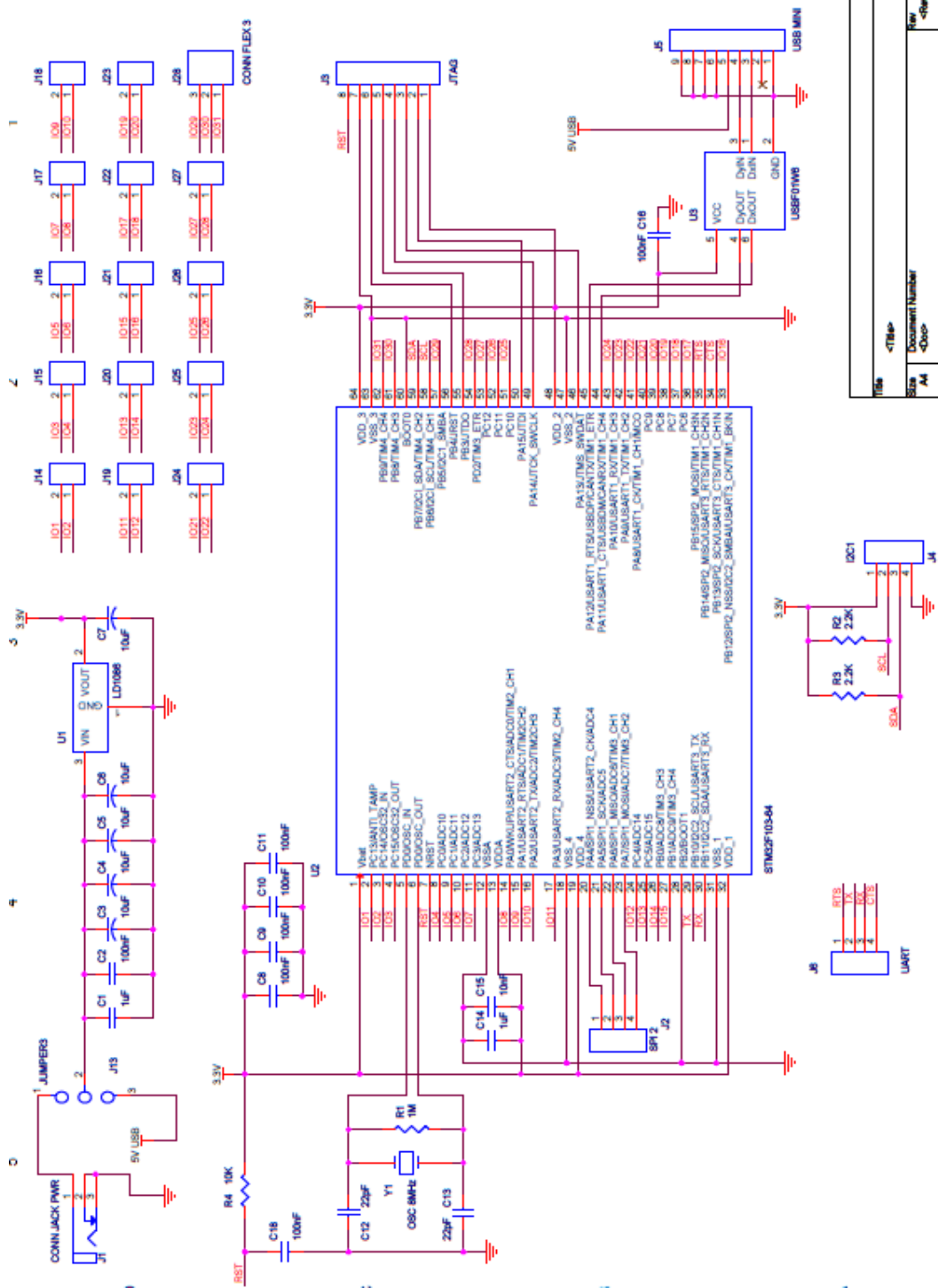


Figura 4. 3: Schematico della Board di controllo.

4.3 Il microcontrollore STM32

L'STM32 è un microcontrollore a 64 bit realizzato da STMicroelectronics che sfrutta le potenzialità di un core implementato da ARM e caratterizzato da memorie Flash e RAM integrate e facilmente programmabili; in particolare il banco di memoria Flash è di 256kb quello RAM di 64kb; le azioni del microcontrollore sono scandite da un oscillatore di 72 MHz.

STM32 offre la possibilità di sfruttare 5 Timer ognuno dei quali possiede 4 canali, 3 banchi di GPIO ognuno dei quali gestisce 16 pin, e un ADC.

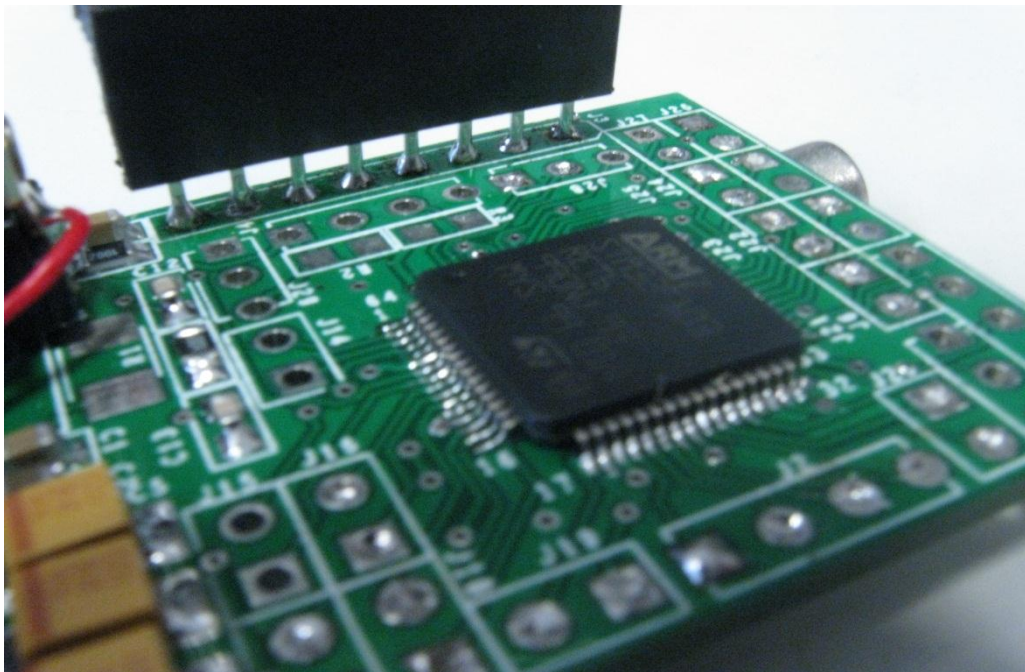


Figura 4. 4: Il microcontrollore STM32.

I compiti principali del microcontrollore in questo contesto sono molteplici:

- Generare i segnali di controllo da inviare alla scheda di potenza per il controllo delle pompe;
- Fare il sensing sulla tensione di uscita delle pompe per garantire la tensione desiderata dall'utente;
- Coordinare il funzionamento di 6 micropompe;
- Controllare il driver della board motore;
- Generare il segnale PWM per il controllo della temperatura
- Effettuare il sensing dei sensori di temperatura.

Grazie al core ARM Cortex il microcontrollore è in grado di gestire un Real Time Operative System(RTOS) e quindi poter gestire più Task simultaneamente rendendo possibile il controllo di più pompe nello stesso momento.

4.4 Il motore passo-passo

I motori passo-passo, spesso chiamati anche step o stepper, sono caratterizzati nel panorama dei motori elettrici da una serie di particolarità che ne fanno la scelta (quasi) ideale per tutte quelle applicazioni che richiedono precisione nello spostamento angolare e nella velocità di rotazione, quali la robotica ed i servomeccanismi in genere. Ecco perché si prestano particolarmente all'applicazione in questione, ossia muovere un magnete con velocità diverse per effettuare lo "shakeraggio" delle microbiglie e contemporaneamente garantire la precisa posizione al di sopra della camera di reazione nel momento in cui è necessaria la sospensione del pellet di microbiglie.

I **vantaggi** dei motori passo passo sono:

- E' possibile realizzare azionamenti di precisione controllati tramite microprocessore in catena aperta, cioè senza utilizzare sensori di posizione o

di velocità. Sono quindi utilizzabili con relativa semplicità e senza richiedere particolare potenza di calcolo.

- Hanno un'elevata robustezza meccanica ed elettrica: infatti non esistono contatti elettrici striscianti.
- E' facile far compiere all'albero piccole rotazioni angolari arbitrarie in ambedue i versi e bloccarlo in una determinata posizione.
- La velocità di rotazione può essere molto bassa anche senza l'uso di riduttori meccanici.

Ovviamente hanno anche **difetti**:

- Richiedono sempre circuiti elettronici per il pilotaggio.
- Il loro rendimento energetico è basso e, in genere, la potenza meccanica è piccola.
- Hanno un costo elevato, relativamente ad altri tipi di motore con analoghe prestazioni.
- Difficilmente raggiungono velocità di rotazione elevate.

La figura 4.5 mostra una rappresentazione semplificata di un motore passo passo a magneti permanenti. Il motore e' costituito da due parti principali. Il rotore che consiste in una serie di magneti permanenti distribuiti radialmente sull'albero di rotazione. Lo statore costituito da elettromagneti in modo che, opportunamente alimentati, possano generare campi magnetici orientati come da figura.

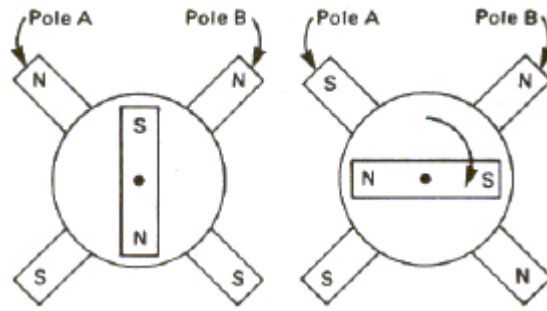


Figura 4. 5: Struttura semplificato del motore passo-passo a magneti permanenti.

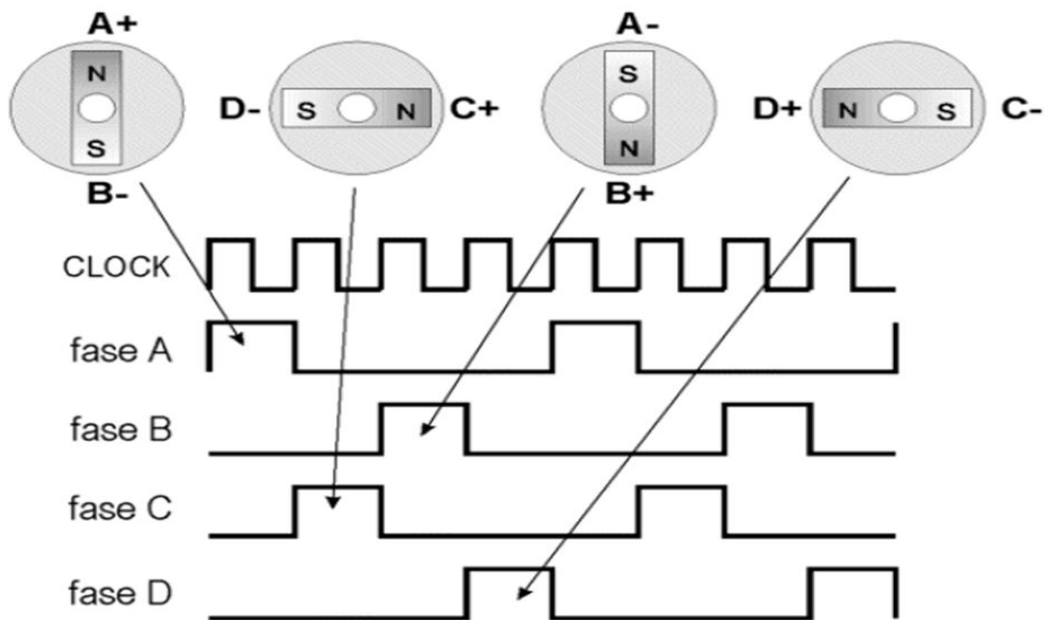


Figura 4. 6: Fasi del motore passo-passo.

La rotazione dell'albero avviene poiché i magneti permanenti che lo costituiscono tendono ad allinearsi al campo magnetico generato dagli elettromagneti dello statore. In base all'avvolgimento statorico che viene percorso da corrente ed in base al verso di percorrenza della corrente è possibile creare un campo magnetico statorico che può assumere (in questa semplificazione) 4 orientamenti spaziali che potremmo individuare come: ALTO, DESTRA, BASSO, SINISTRA,... . Il rotore nell'allinearsi al campo magnetico statorico compie una rotazione. Il permanere della rotazione del

rotore si ottiene ripetendo la sequenza ALTO, DESTRA, BASSO, SINISTRA. I motori passo-passo sono motori che, a differenza di tutti gli altri, hanno come scopo quello di mantenere fermo l'albero in una posizione di equilibrio: se alimentati si limitano infatti a bloccarsi in una ben precisa posizione angolare.

Solo indirettamente è possibile ottenerne la rotazione: occorre inviare al motore una serie di impulsi di corrente, secondo un'opportuna sequenza, in modo tale da far spostare, per scatti successivi, la posizione di equilibrio.

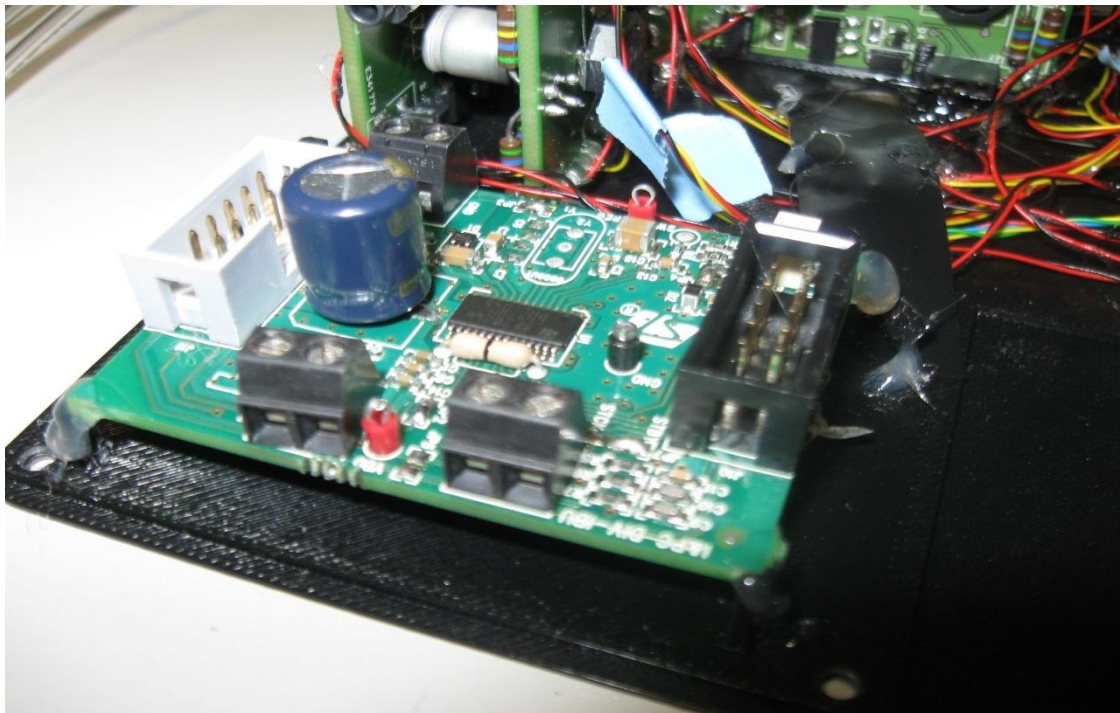


Figura 4. 7: Zoom della scheda controllo motore passo-passo; al centro è osservabile il driver di controllo che gestisce tutte le fasi.

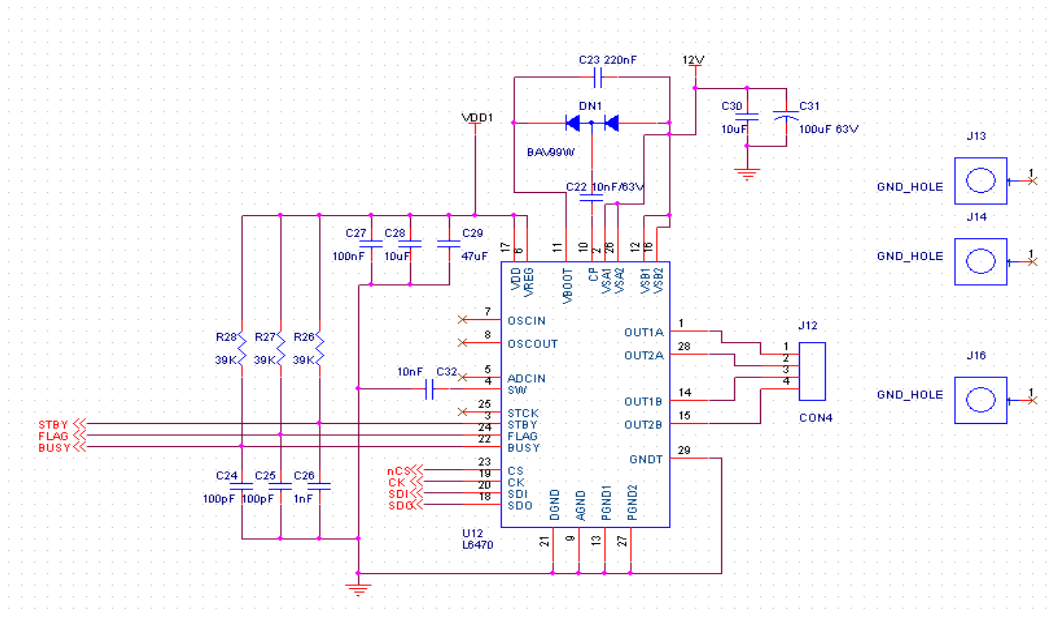


Figura 4. 8: Schematico del driver della scheda controllo motore.

E' così possibile far ruotare l'albero nella posizione e alla velocità voluta semplicemente contando gli impulsi ed impostando la loro frequenza, visto che le posizioni di equilibrio dell'albero sono determinate meccanicamente con estrema precisione.

Tra gli svantaggi è presente la necessità di pilotarli con una board adatta; STMicroelectronins ha messo a punto una scheda per il controllo degli stepper capace di gestire le fasi dei motori attraverso l'ausilio di un driver. L'utente ha il solo compito di determinare le funzioni che il motore deve svolgere tramite firmware.

E' stato scritto un firmware ad hoc per permettere al braccio comandato dal motore passo-passo di potersi muovere velocemente con versi di rotazione differenti per effettuare la movimentazione delle microbiglie ed inoltre con estrema precisione lo stepper è capace di posizionare il magnete sopra la camera di reazione al momento opportuno.

4.5 Il Circuito di riscaldamento: lettura e controllo della temperatura

Il sistema di controllo della temperatura prevede le seguenti fasi:

- Lettura della resistenza del sensore presente sul chip, e conversione in un valore numerico tramite ADC integrato nel microcontrollore;
- Applicazione di un algoritmo PID che controlli tale valore numerico, adeguandolo a quello desiderato.

4.5.1 Fase di lettura della temperatura

In realtà, l'ADC non converte la resistenza, ma la tensione vista ai capi del sensore. Il circuito complessivo è schematizzato in fig. 4.9. Si utilizza un generatore di corrente che, attraverso un demultiplexer, può essere collegato ad una resistenza da $1.3\text{ k}\Omega$ o da $1\text{ k}\Omega$, oppure al sensore del chip. Gli ingressi di selezione del DEMUX provengono dal microcontrollore tramite pin GPIO.

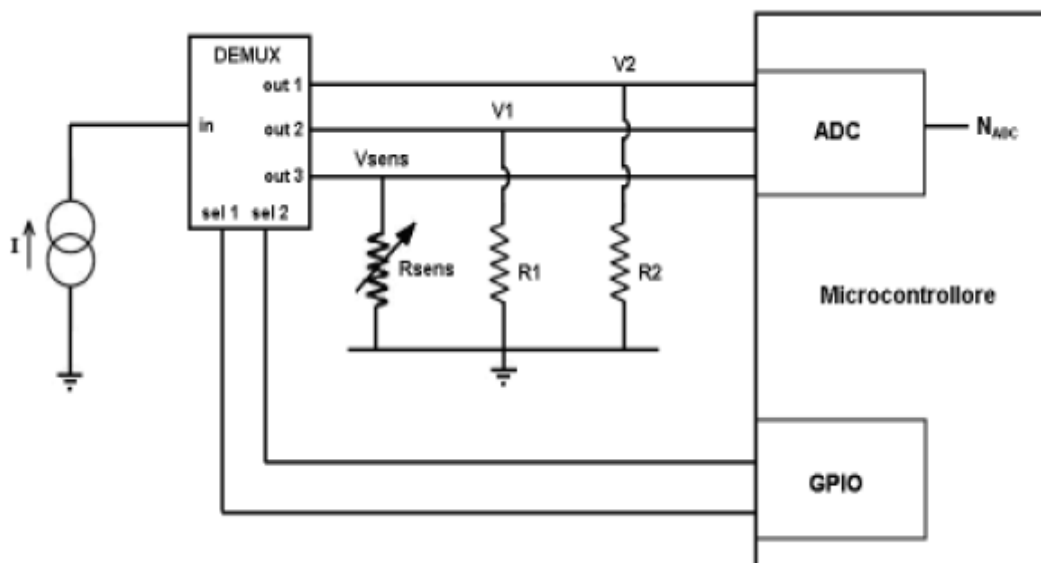


Figura 4. 9: circuito semplificato per il controllo della temperatura tramite resistori e sensori.

All'accensione dello strumento, la fase di board calibration consente di determinare l'esatto valore della corrente fornita dal generatore (tipicamente circa 2.4 mA). Si procede in questo modo: il generatore è connesso alternativamente alle resistenze R1 e R2, sulle quali si leggono le cadute di tensione V1, e V2, convertite nei valori numerici NADC1 e NADC2.

Idealmente, ci si aspetta di ricavare la corrente:

$$I_0 = \frac{V_{1,0}}{R_1} = \frac{V_{2,0}}{R_2} \quad [4.1]$$

In pratica, la misura viene svolta su due resistenze diverse per eliminare eventuali errori con un'operazione di media. I valori di R1 e R2 sono scelti in modo da coprire il range tipico entro cui varia la resistenza del sensore.

Quest'ultima è sottoposta a campionamento costante durante ogni ciclatura termica.

Il generatore di corrente, però, presenta una forte variabilità in temperatura.

Per questo, ad ogni campionamento deve essere applicata una correzione al valore di I_0 .

Ad una frequenza di circa 20 Hz, viene quindi replicato l'intero algoritmo di campionamento, che comprende 512 letture della tensione su R1 e 512 letture della tensione sul chip, da cui si ricavano dei valori medi eliminando il rumore bianco.

La corrente fornita dal generatore al campionamento i -esimo sarà:

$$I_i = \frac{V_{1,i}}{R_1} = \frac{V_{1,0} \cdot K_i}{R_1} = I_0 \cdot K_i \quad [4.2]$$

dove K_i è il coefficiente di variazione della corrente (o della tensione) su R1:

$$K_i = \frac{V_{1,i}}{V_{1,0}} \quad [4.3]$$

Note V_1 , I_0 e $V_{1,i}$, e leggendo la tensione sul chip $V_{sens,i}$, è possibile calcolare la resistenza del sensore:

$$R_{sens,i} = \frac{V_{sens,i}}{I_i} = \frac{V_{sens,i}}{I_0 \cdot K_i} = \frac{V_{sens,i}}{I_0} \cdot \frac{V_{1,0}}{V_{1,i}} \quad [4.4]$$

si è realizzato così un circuito con funzione di ohmetro.

Infine, la tensione $V_{sens,i}$ è convertita da un ADC a 12 bit nel valore numerico NADC, compreso tra 0 e 4095.

La catena di acquisizione che porta da una variazione di temperatura ad una variazione di NADC può quindi essere schematizzata nel modo seguente:

$$T_{sens} \rightarrow R_{sens} \rightarrow V_{sens} \rightarrow N_{ADC} \quad [4.5]$$

Lo stesso percorso svolto al contrario consente il calcolo della temperatura T_{sens} a partire dal segnale digitale, una volta che siano note le relazioni matematiche tra le varie grandezze.

A questo proposito, si noti che il microcontrollore presenta una caratteristica NADC(V_{in}) abbastanza lineare per tensioni di ingresso entro i 3V (valore mai superato nell'applicazione di interesse).

4.5.2 Fase di controllo della temperatura

In generale, un problema di controllo si pone ogni qual volta si deve adeguare l'uscita $y(t)$ di un certo processo, detta variabile controllata, ad un valore di riferimento $y_{ref}(t)$, agendo sull'ingresso $u(t)$ del processo stesso, detto variabile di controllo. L'obiettivo è quindi annullare il segnale errore:

$$e(t) = y_{ref}(t) - y(t) \quad [4.6]$$

In questo caso, la variabile di controllo è il segnale PWM applicato ai riscaldatori, mentre la variabile controllata è NADC, o equivalentemente la temperatura T_{sens} . La variabile di riferimento è NADC_{ref}, corrispondente alla temperatura T_{ref} indicata dal protocollo termico in uso.

4.5.3 Implementazione PID

L'algoritmo di regolazione scelto è di tipo PID, ovvero ad azione Proporzionale, Integrativa e Derivativa

.

I regolatori lineari appartenenti a questa classe sono i più usati in ambito industriale, per diverse ragioni: innanzitutto il loro impiego consente di controllare con successo un'ampia gamma di processi; in secondo luogo, negli anni sono state sviluppate semplici regole per la loro taratura automatica, applicabili con buoni risultati anche in assenza di un modello matematico preciso del sistema sotto controllo; inoltre, per la loro semplicità, i PID possono essere realizzati con le tecnologie più varie: meccanica, pneumatica, idraulica, elettronica analogica o, come nel caso in esame, elettronica digitale.

Il principio di funzionamento di un PID si basa su considerazioni empiriche, secondo le quali la variabile di controllo deve essere ottenuta sommando tre contributi:

Contributo proporzionale: la variabile di controllo è data dall'errore $e(t)$ moltiplicato per un guadagno costante K_p :

$$u_p(t) = K_p \cdot e(t) \quad [4.7]$$

Tale azione consente di limitare l'errore in fase dinamica, ma ha scarso effetto sulle prestazioni statiche. Il valore asintotico di $e(t)$ non viene infatti annullato. E' possibile ridurlo aumentando il guadagno K_p , ma ciò si accompagna ad un aumento delle oscillazioni dell'uscita, fino ad arrivare all'instabilità.

Contributo integrativo: la variabile di controllo è legata stavolta all'integrale di $e(t)$ (cioè di fatto al suo valore medio), allo scopo di annullare asintoticamente l'errore a fronte di segnali di riferimento o disturbi additivi costanti.

$$u_i(t) = K_i \cdot \int_{t_0}^t e(\tau) d\tau \quad [4.8]$$

L'azione integrativa non contrasta invece variazioni dell'errore eccessivamente rapide. Anche in questo caso, una costante K_i troppo elevata determina un aumento sia in ampiezza che in frequenza delle oscillazioni in uscita.

Contributo derivativo: la componente ottenuta è proporzionale alla derivata di $e(t)$, con lo scopo di "anticipare" l'andamento dell'errore negli istanti futuri. In sostanza, il blocco derivativo realizza un filtraggio passa basso delle componenti ad alta frequenza del segnale e , limitando stavolta le oscillazioni in uscita.

$$u_D(t) = K_D \cdot \frac{de(t)}{dt} \quad [4.9]$$

La variabile di controllo è infine data dalla relazione

$$u(t) = u_P(t) + u_I(t) + u_D(t) \quad [4.10]$$

E' anche possibile, a seconda delle esigenze, non utilizzare tutte e tre le azioni di controllo, realizzando regolatori di tipo P, I, PI o PD.

Per la determinazione dei coefficienti KP, KD e KI esistono in letteratura diversi metodi di taratura, sia in anello aperto che in anello chiuso. Tra questi ultimi è particolarmente diffuso quello elaborato da Ziegler e Nichols.

Inizialmente è attivata la sola azione proporzionale, innalzando il guadagno KP finché il sistema retroazionato viene portato al limite della stabilità, cioè, a fronte di variazioni a scalino del segnale di riferimento, l'uscita è in oscillazione permanente di periodo T_u .

Il KP così ottenuto è chiamato guadagno critico K_{Pu} . Noti T_u e K_{Pu} , in funzione di questi si determinano i coefficienti del PID, secondo le relazioni indicate in un'apposita tabella.

4.5.4 Realizzazione digitale del PID

Nella realizzazione digitale, è comodo esprimere la legge di controllo del PID in forma incrementale, calcolando cioè in ogni istante di campionamento l'incremento del segnale PWM rispetto al passo precedente.

Da ciò si ottiene:

$$PWM(K) = K_P \cdot e(K) + K_I \cdot \sum e + K_D \cdot (e(K) - e(K-1)) + PWM(K-1)$$

[4.11]

Un problema frequente nell'implementazione di un algoritmo PID è quello della saturazione dell'uscita. L'algoritmo in se infatti non tiene conto di eventuali limitazioni sulla variabile di controllo, e potrebbe calcolare valori non permessi. Come conseguenza, il termine integrale, che tiene conto della somma degli errori in tutti gli istanti passati, tenderebbe ad assumere valori molto elevati, col rischio di portare il sistema all'instabilità.

Nel caso in esame, la variabile di controllo può assumere soltanto valori compresi tra 0 e 19999. Viene dunque imposto che, se il PWM calcolato supera gli estremi consentiti, esso venga forzato a tali valori.

Nel sistema implementato inoltre, per non rallentare troppo i tempi di riscaldamento e di raffreddamento, il PID non è sempre attivo, ma interviene solo quando la temperatura del sensore rientra in un certo intervallo vicino al valore obiettivo.

In pratica, si fissano due soglie in corrispondenza di $(NADCref \cdot 16) \pm 200$.

.

Se la temperatura è inferiore alla soglia più bassa, il PWM è posto al valore massimo per ottenere un riscaldamento rapido. Se la temperatura supera invece la seconda soglia, il PWM è posto a zero.

Nella fascia compresa tra le due soglie agisce l' algoritmo PID.

In fase di riscaldamento, al raggiungimento della prima soglia, il PWM passa istantaneamente da 19999 ad un valore che cambia a seconda della temperatura obiettivo.

4.5.5 Scelta della frequenza di campionamento

Si è scelta una frequenza di 20 Hz per l'applicazione dell'intero algoritmo comprensivo di:

- Lettura e conversione A/D della tensione sul sensore, con annessa valutazione della corrente fornita dal generatore;
- Correzione del PWM tramite controllo PID.

La frequenza scelta rappresenta empiricamente un buon compromesso tra diverse esigenze, infatti:

- Per valori più alti, il controllo è applicato senza attendere i tempi caratteristici delle variazioni di temperatura, con il rischio di correzioni sbagliate;
- Per valori più bassi, variazioni di temperatura troppo rapide possono non essere rilevate e quindi non subire adeguata compensazione.

4.6 Lo stadio di potenza : Il convertitore Boost

I microattuatori piezoelettrici per permettere la deformazione del disco di PZT necessitano una differenza di potenziale di centinaia di Volt.

La scheda di controllo principale è alimentata ad una tensione di 12 Volt quindi.

Per poter raggiungere tensioni elevate a partire da decine di volt si è realizzato un convertitore elevatore, STEP UP (o BOOST).

Lo step-up appartiene ad una classe di alimentatori a commutazione contenenti almeno due commutatori a semiconduttore (un diodo e un transistor, nel caso di boost asincrono, due MOSFET nel caso sincrono) e almeno un elemento

accumulatore di energia (ad esempio un induttore). Filtri composti da combinazioni di induttori e capacità sono spesso aggiunti per migliorarne le caratteristiche. Il principio base di funzionamento di un convertitore boost consiste in due stati distinti:

- nello stato "on", il commutatore S (si faccia riferimento alla figura 3.3) è chiuso, provocando un aumento di corrente nell'induttore;
- nello stato "off", il commutatore è aperto e l'unico percorso offerto alla corrente dell'induttore è attraverso il diodo D, la capacità C e il carico R. Ciò provoca il trasferimento dell'energia accumulata durante lo stato "on" nella capacità.

Quando un convertitore boost opera in modo continuo, la corrente che passa attraverso l'induttore (I_L) non scende mai a zero. La figura 3 mostra le forme d'onda tipiche di corrente e tensione in un convertitore operante in questa modalità.

La tensione di uscita può essere calcolata come di seguente, nel caso di un convertitore ideale (cioè usando componenti con un comportamento ideale) operante in condizioni stazionarie

Durante lo stato di funzionamento acceso (on), il commutatore S è chiuso e la tensione di ingresso (V_i) appare ai capi dell'induttore; ciò provoca un cambiamento nella corrente (I_L) che scorre attraverso l'induttore durante il periodo di tempo (t). Questo funzionamento viene descritto dalla formula:

$$\frac{\Delta I_L}{\Delta t} = \frac{V_i}{L} \quad [4.12]$$

Alla fine dello stato di acceso, l'incremento di I_L è perciò:

$$\Delta I_{L_{On}} = \int_0^{D \cdot T} \frac{V_i}{L} dt = \frac{V_i \cdot D \cdot T}{L} \quad [4.13]$$

D è il duty cycle (o rapporto acceso/spento). Esso rappresenta la frazione del periodo di commutazione T durante la quale il commutatore S è acceso. Perciò D può variare tra 0 (S non è mai acceso) e 1 (S è sempre acceso).

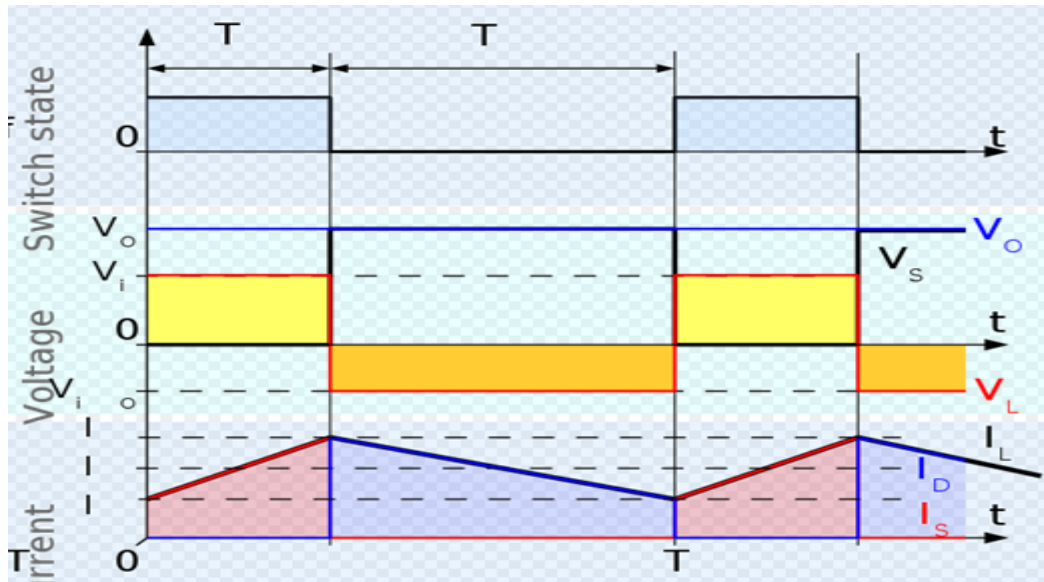


Figura 4. 10: forme d'onda della corrente e della tensione in un convertitore boost operante in modo continuo.

Durante lo stato di spento (off), il commutatore S è aperto, perciò la corrente dell'induttore fluisce attraverso il carico. Se consideriamo la caduta di tensione attraverso il diodo idealmente uguale a zero, e una capacità abbastanza grande da mantenere la sua tensione costante, l'evoluzione di I_L è:

$$V_i - V_o = L \frac{dI_L}{dt} \quad [4.14]$$

Perciò, la variazione di I_L durante il periodo di spento è:

$$\Delta I_{Loff} = \int_0^{(1-D)T} dI_L = \int_0^{(1-D)T} \frac{(V_i - V_o)}{L} dt = \frac{(V_i - V_o)(1-D)T}{L} \quad [4.15]$$

Se consideriamo che il convertitore operi in condizioni stabili, l'ammontare dell'energia accumulata in ogni suo componente deve essere la stessa all'inizio e alla fine del ciclo di commutazione. In particolare, l'energia immagazzinata nell'induttore è data da:

$$E = \frac{1}{2} L \cdot I_L^2 \quad [4.16]$$

Perciò, è ovvio che la corrente dell'induttore deve essere la stessa all'inizio e alla fine del ciclo di commutazione. Questo può essere scritto come:

$$\Delta I_{L_{On}} + \Delta I_{L_{Off}} = 0 \quad [4.17]$$

Sostituendo $\Delta I_{L_{On}}$ e $\Delta I_{L_{Off}}$ con le loro espressioni, si ottiene:

$$\Delta I_{L_{On}} + \Delta I_{L_{Off}} = \frac{V_i \cdot D \cdot T}{L} + \frac{(V_i - V_o)(1 - D) T}{L} = 0 \quad [4.18]$$

Questo può essere scritto come:

$$\frac{V_o}{V_i} = \frac{1}{1 - D} \quad [4.19]$$

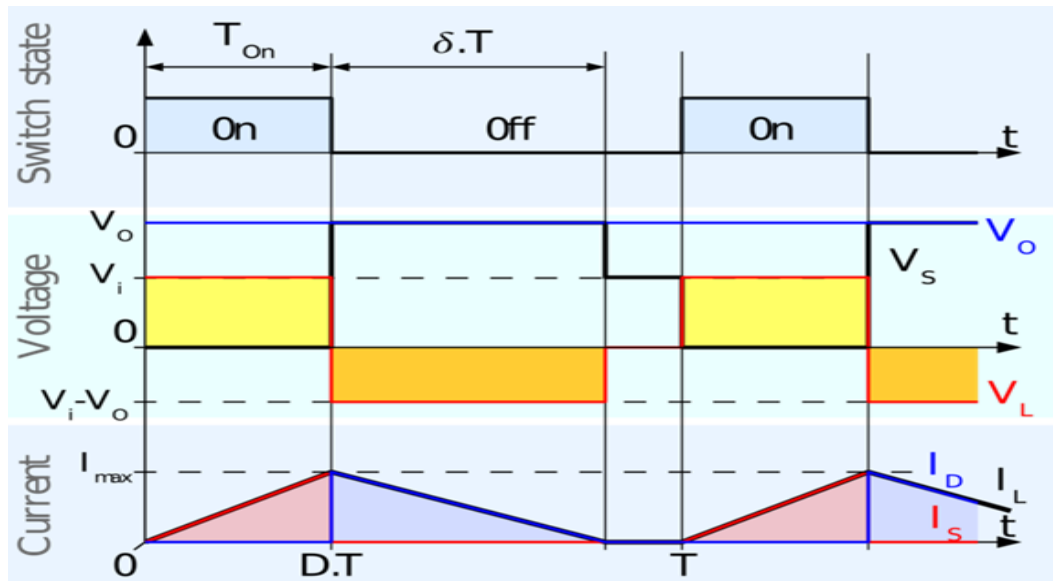


Figura 4. 11: forme d'onda di tensione e corrente in un convertitore boost operante in modo discontinuo.

Dall'espressione precedente si può vedere che la tensione di uscita è sempre maggiore di quella di ingresso (come il duty cycle va da 0 a 1), e che essa cresce con D, teoricamente all'infinito come D raggiunge il valore di 1. Questa è la ragione per la quale questo convertitore viene spesso chiamato convertitore *step-up*.

In molti casi, l'ammontare dell'energia richiesta dal carico è abbastanza piccola da essere trasferita in un tempo più piccolo della durata dell'intero ciclo di commutazione. In questo caso, la corrente che passa attraverso l'induttore cade a zero durante parte del periodo. L'unica differenza nel principio descritto in precedenza è che l'induttore viene completamente scaricato alla fine del ciclo di commutazione. Malgrado piccola, la differenza ha un grande effetto sull'equazione della tensione di uscita. Essa può essere calcolata nel modo seguente:

dato che la corrente nell'induttore all'inizio del ciclo è zero, il suo valore massimo I_{LMax} (a $t=DT$) è:

$$I_{LMax} = \frac{V_i \cdot D \cdot T}{L} \quad [4.20]$$

Durante il periodo di off, I_L cade a zero dopo $\delta \cdot T$:

$$I_{LMax} + \frac{(V_i - V_o) \cdot \delta \cdot T}{L} = 0 \quad [4.21]$$

Usando le due precedenti equazioni, δ è:

$$\delta = \frac{V_i \cdot D}{V_o - V_i} \quad [4.22]$$

La corrente di carico I_o è uguale alla corrente media del diodo (I_D). Come si può osservare in figura 4.r, la corrente del diodo è uguale alla corrente nell'induttore durante lo stato off. Perciò la corrente in uscita può essere scritta come:

$$I_o = \bar{I}_D = \frac{I_{Lmax} \delta}{2} \quad [4.23]$$

Sostituendo I_{Lmax} e δ con le loro rispettive espressioni si ottiene:

$$I_o = \frac{V_i \cdot D \cdot T}{2L} \frac{V_i \cdot D}{V_o - V_i} = \frac{V_i^2 \cdot D^2 \cdot T}{2L (V_o - V_i)} \quad [4.23]$$

Perciò, il guadagno di tensione in uscita può essere scritto come:

$$\frac{V_o}{V_i} = 1 + \frac{V_i \cdot D^2 \cdot T}{2L \cdot I_o} \quad [4.24]$$

Confrontata con l'espressione della tensione di uscita per la modalità continua, questa espressione è molto più complicata. Inoltre, in modalità discontinua, la tensione di uscita non dipende solo dal duty-cycle, ma anche dal valore dell'induttore, dalla tensione in ingresso e dalla corrente in uscita.

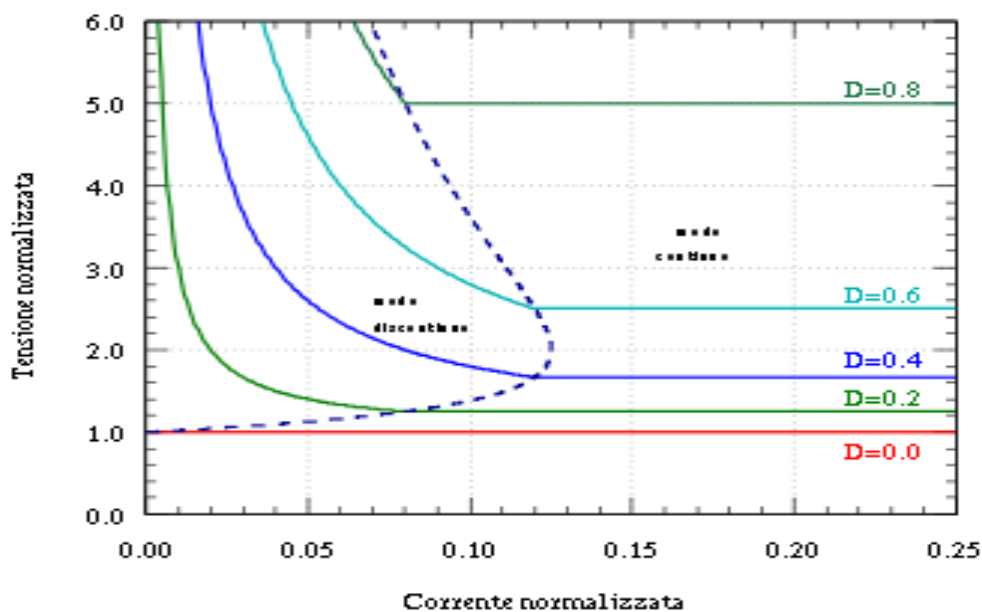


Figura 4. 12: andamento della tensione e della corrente d'uscita normalizzate di un convertitore boost ideale.

Come detto all'inizio di questa sezione, il convertitore opera in modo discontinuo quando il carico assorbe bassa corrente, e in modo continuo a regimi di corrente di carico superiori. Il limite tra i modi discontinuo e continuo viene raggiunto quando la corrente dell'induttore cade a zero esattamente alla fine del ciclo di commutazione.

Con le notazioni di figura 4, ciò corrisponde a:

$$D \cdot T + \delta \cdot T = T \quad [4.25]$$

$$D + \delta = 1 \quad [4.26]$$

In questo caso, la corrente di uscita I_{olim} (corrente di uscita al limite tra modo continuo e discontinuo) è data da:

$$I_{olim} = \bar{I}_D = \frac{I_{Lmax}}{2} (1 - D) \quad [4.27]$$

Sostituendo I_{Lmax} dall'espressione data nella sezione *modo discontinuo* si ottiene:

$$I_{olim} = \frac{V_i \cdot D \cdot T}{2L} (1 - D) \quad [4.28]$$

Dato che I_{olim} è la corrente al limite tra modo continuo e discontinuo, essa soddisfa le espressioni di entrambe le modalità. Perciò, usando l'espressione della tensione di uscita in modo continuo, la precedente espressione si può scrivere anche come:

$$I_{olim} = \frac{V_i \cdot T}{2L} \frac{V_i}{V_o} \left(1 - \frac{V_i}{V_o}\right) \quad [4.29]$$

Introduciamo altre due notazioni:

- la tensione normalizzata, definita da

$$|V_o| = \frac{V_o}{V_i} \quad [4.30]$$

Essa corrisponde al guadagno in tensione del convertitore;

- la corrente normalizzata, definita da

$$|I_o| = \frac{L}{T \cdot V_i} I_o \quad [4.31]$$

Il termine

$$\frac{T \cdot V_i}{L} \quad [4.32]$$

è uguale all'incremento massimo della corrente dell'induttore durante un ciclo, cioè l'incremento della corrente dell'induttore con un duty-cycle $D=1$. Perciò, in regime stazionario del convertitore, ciò significa che $|I_o|$ è uguale a 0 per corrente di uscita nulla, e 1 per la massima corrente che il convertitore può fornire.

Usando queste notazioni avremo che:

- in modo continuo

$$|V_o| = \frac{1}{1 - D} \quad [4.33]$$

- in modo discontinuo

$$|V_o| = 1 + \frac{V_i \cdot D^2 \cdot T}{2L \cdot I_o} = 1 + \frac{D^2}{2|I_o|} \quad [4.34]$$

la corrente al limite tra modo continuo e discontinuo è

$$I_{o_{lim}} = \frac{V_i \cdot T}{2L} D(1 - D) = \frac{I_{o_{lim}}}{2|I_o|} D(1 - D) \quad [4.35]$$

Perciò, il punto limite tra modo continuo e discontinuo viene dato da:

$$\frac{1}{2|I_o|} D(1 - D) = 1 \quad [4.36]$$

Dalla figura 4.12 è chiaramente osservabile la differenza di comportamento tra modo continuo e discontinuo. Ciò è molto importante per il dimensionamento del circuito di pilotaggio delle pompe.

Si osservi anche che in un convertitore che opera in regime continuo, si riscontra una maggior lentezza nella risposta del circuito ai transitori, caratterizzata da una costante di tempo pari a L/R .

In un convertitore che opera in regime discontinuo, invece, se il transitorio avviene nel periodo OFF la risposta del sistema è molto rapida, nonostante presenti un ritardo costante, inferiore comunque al periodo T .

E' interessante notare che, mentre nel caso di un convertitore continuo la corrente media è fissata dalla parte resistiva del carico, nel caso discontinuo è fissata solo dall'induttore di filtro.

4.7 Implementazione dello stadio di potenza

Le micropompe piezoelettriche possono essere pilotate da forme d'onda diverse: rettangolari, triangolari o sinusoidali; qualsiasi sia la forma del segnale, l'ampiezza della tensione deve raggiungere il centinaio di volt.

E' dunque necessario progettare un convertitore boost in grado di produrre le tensioni desiderate e apportare al contempo determinate modifiche per ottenere l'andamento in frequenza voluto.

Lo schematico in figura 4.13 è stato realizzato tramite software *Capture CIS* e rappresenta lo stadio di potenza implementato.

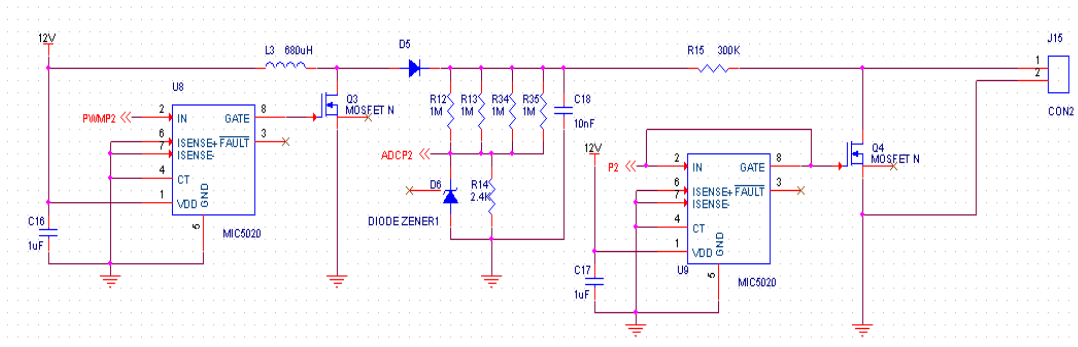


Figura 4. 13: Schematico del circuito per il controllo della micropompa mp-6; il partitore resistivo con 4 resistori in parallelo ottimizza la dissipazione di potenza.

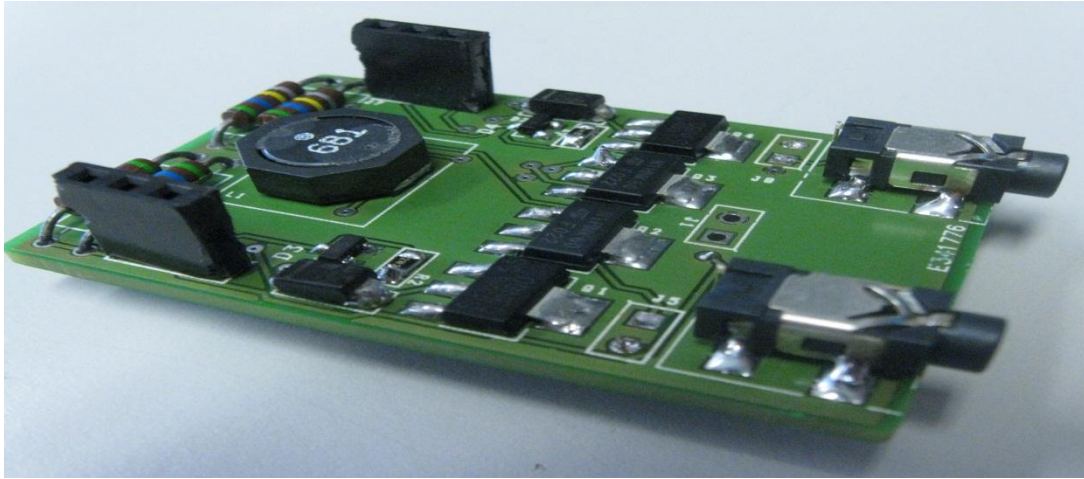


Figura 4. 14: Topview della scheda implementata per il controllo della micropoampa mp-6.

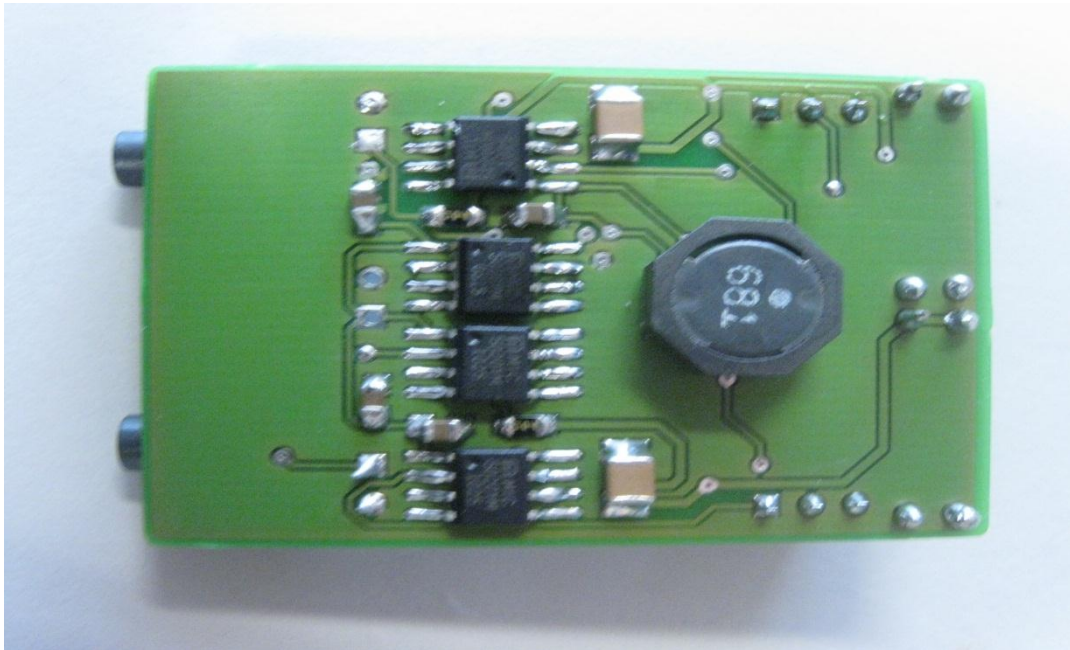


Figura 4. 15: Bottomview della scheda implementata per il controllo della micropoampa mp-6.

La tensione di alimentazione del circuito è ricavata direttamente da quella della scheda di controllo ed è pari a 12V. Come si vede dalla topologia si è scelto d'implementare un boost asincrono, che risulta più semplice da realizzare, e decisamente migliore per quanto riguarda ingombro, semplicità di realizzazione e controllo.

Questo modello necessita infatti di un solo segnale di controllo, poiché il diodo che regola il flusso di cariche in uscita, viene innescato automaticamente dalla corrente forzata tramite l'induttanza, senza alcun bisogno di fornire al componente un segnale reciproco a quello di accensione del MOSFET, come contrariamente avviene nel caso sincrono.

In accordo con quanto spiegato nel paragrafo precedente, date le basse correnti assorbite dal carico capacitivo del piezoelettrico il regime di funzionamento adottato sarà di tipo discontinuo (DCM).

4.8 Analisi dei componenti circuitali

L'induttanza scelta è una Coilcraft da 680 μH dalla resistenza serie equivalente molto bassa (qualche centinaio di $\text{m}\Omega$) in modo da abbattere il più possibile le perdite di tensione.

L'interruttore scelto per commutare l'induttanza è un MOS di potenza.

Le caratteristiche cercate sono un'alta tensione di bloccaggio, che arrivi fino ad almeno 300V; avere una resistenza di accensione più bassa possibile in modo da rendere minime le perdite di potenza; ed avere una capacità di gate C_g contenuta in modo da non limitare la velocità di commutazione.

L'STQ1NK60ZR di STMicroelectronics soddisfa tutti i requisiti richiesti presentando una tensione di breakdown di 600 V, una resistenza in zona ohmica di 13 ohm e una capacità di gate di 12 nF.

I tempi di transizione tra stato ON e stato OFF permettono al Mosfet di commutare anche a frequenze di qualche MHz.

La corrente massima è di 800 mA che, benché sia un valore basso, è più che sufficiente per l'applicazione.

Electrical ratings

Table 2. Absolute maximum ratings

| Symbol | Parameter | Value | | | Unit |
|--------------------|---|------------|-------|---------|------|
| | | IPAK | TO-92 | SOT-223 | |
| V_{DS} | Drain-source voltage ($V_{GS} = 0$) | 600 | | | V |
| V_{GS} | Gate-source voltage | ± 30 | | | V |
| I_D | Drain current (continuous) at $T_C = 25^\circ\text{C}$ | 0.8 | 0.3 | 0.3 | A |
| I_D | Drain current (continuous) at $T_C = 100^\circ\text{C}$ | 0.5 | 0.189 | | A |
| $I_{DM}^{(1)}$ | Drain current (pulsed) | 3.2 | 1.2 | | A |
| P_{TOT} | Total dissipation at $T_C = 25^\circ\text{C}$ | 25 | 3 | 3.3 | W |
| | Derating factor | 0.24 | 0.25 | 0.26 | W/°C |
| $V_{ESD(G-D)}$ | Gate source ESD(HBM-C=100pF, R=1.5K Ω) | 800 | | | V |
| $dv/dt^{(2)}$ | Peak diode recovery voltage slope | 4.5 | | | V/ns |
| T_J T_{stg} | Operating junction temperature Storage temperature | -55 to 150 | | | °C |

1. Pulse width limited by safe operating area
2. $I_{SD} \leq 0.3\text{A}$, $di/dt \leq 200\text{A}/\mu\text{s}$, $V_{DD} = 80\%V_{(BR)DSS}$

Table 3. Thermal resistance

| Symbol | Parameter | Value | | | Unit |
|----------------|--|-------|-------|----------------------|------|
| | | IPAK | TO-92 | SOT-223 | |
| $R_{thj-case}$ | Thermal resistance junction-case Max | 5 | -- | -- | °C/W |
| R_{thj-a} | Thermal resistance junction-ambient Max | 100 | 120 | 37.87 ⁽¹⁾ | °C/W |
| $R_{thj-lead}$ | Thermal resistance junction-lead Max | -- | 40 | -- | °C/W |
| T_l | Maximum lead temperature for soldering purpose | 275 | 260 | | °C |

($T_{CASE}=25^{\circ}C$ unless otherwise specified)

Table 5. On/off states

| Symbol | Parameter | Test conditions | Min. | Typ. | Max. | Unit |
|---------------|--|--|------|------|----------|--------------------|
| $V_{(BR)DSS}$ | Drain-source breakdown voltage | $I_D = 1mA, V_{GS} = 0$ | 600 | | | V |
| I_{DSS} | Zero gate voltage drain current ($V_{GS} = 0$) | $V_{DS} = \text{Max rating},$ $V_{DS} = \text{Max rating} @ 125^{\circ}C$ | | | 1 50 | μA μA |
| I_{GSS} | Gate body leakage current ($V_{DS} = 0$) | $V_{GS} = \pm 20V$ | | | ± 10 | μA |
| $V_{GS(th)}$ | Gate threshold voltage | $V_{DS} = V_{GS}, I_D = 50\mu A$ | 3 | 3.75 | 4.5 | V |
| $R_{DS(on)}$ | Static drain-source on resistance | $V_{GS} = 10V, I_D = 0.4A$ | | 13 | 15 | Ω |

Table 6. Dynamic

| Symbol | Parameter | Test conditions | Min. | Typ. | Max. | Unit |
|-------------------------------------|---|--|------|-------------------|------|----------------|
| $g_{fs}^{(1)}$ | Forward transconductance | $V_{DS} = 15V, I_D = 0.4A$ | | 0.5 | | S |
| C_{iss} C_{oss} C_{rss} | Input capacitance Output capacitance Reverse transfer capacitance | $V_{DS} = 25V, f = 1 \text{ MHz}, V_{GS} = 0$ | | 94 17.6 2.8 | | pF pF pF |
| $C_{oss \text{ eq}}^{(2)}$ | Equivalent output capacitance | $V_{GS} = 0, V_{DS} = 0V \text{ to } 480V$ | | 11 | | pF |
| Q_g Q_{gs} Q_{gd} | Total gate charge Gate-source charge Gate-drain charge | $V_{DD} = 480V, I_D = 0.8A$ $V_{GS} = 10V$ (see Figure 21) | | 4.9 1 2.7 | 6.9 | nC nC nC |

1. Pulsed: pulse duration=300 μs , duty cycle 1.5%

2. $C_{oss \text{ eq}}$ is defined as a constant equivalent capacitance giving the same charging time as C_{oss} when V_{DS} increases from 0 to 80% V_{DSS}

Tabella 4: Caratteristiche elettriche del Mos di potenza STQ1NK60ZR di STMicroelectronics.

Data la natura di dispositivo di potenza, l'STQ1NK60ZR necessita un driver di pilotaggio che garantisca una V_{gs} di almeno 5 V.

Si è utilizzato il MIC5020, un low side driver della Micrel , alimentato con una tensione di 12 V, in grado di fornire la tensione di accensione al MOS e di operare a frequenze superiori al MHz.

Electrical Characteristics

$T_A = 25^\circ\text{C}$, Gnd = 0V, $V_{DD} = 12\text{V}$, Sense +, - = 0V, Fault = Open, $C_T = \text{Open}$, Gate $C_L = 1500\text{pF}$ unless otherwise specified

| Symbol | Parameter | Condition | Min | Typ | Max | Units |
|---------------------|---------------------------------|---|-----|------|------|---------------|
| | D.C. Supply Current | $V_{DD} = 12\text{V}$, Input = 0V | | 0.8 | 2 | mA |
| | | $V_{DD} = 50\text{V}$, Input = 0V | | 2 | 10 | mA |
| | | $V_{DD} = 12\text{V}$, Input = 5V | | 0.8 | 2 | mA |
| | | $V_{DD} = 50\text{V}$, Input = 5V | | 4 | 25 | mA |
| | Input Threshold | | 0.8 | 1.4 | 2.0 | V |
| | Input Hysteresis | | | 0.1 | | V |
| | Input Pull-Down Current | Input = 5V | 10 | 20 | 40 | μA |
| | Fault Output Saturation Voltage | Fault Current = 1.8mA Note 1 | | 0.15 | 0.4 | V |
| | Fault Output Leakage | Fault = 50V | -1 | 0.01 | +1 | μA |
| | Current Limit Threshold | Note 2 | 30 | 50 | 70 | mV |
| | Gate On Voltage | $V_{DD} = 12\text{V}$ | 10 | 11 | | V |
| | | $V_{DD} = 50\text{V}$ | 14 | 15 | 18 | V |
| $t_{G(\text{ON})}$ | Gate On Time, Fixed | Sense Differential > 70mV | 2 | 5 | 10 | μs |
| $t_{G(\text{OFF})}$ | Gate Off Time, Adjustable | Sense Differential > 70mV, $C_T = 0\text{pF}$ | 10 | 20 | 50 | μs |
| t_{DLH} | Gate Turn-On Delay | Note 3 | | 400 | 800 | ns |
| t_R | Gate Rise Time | Note 4 | | 700 | 1500 | ns |
| t_{DLH} | Gate Turn-Off Delay | Note 5 | | 900 | 1500 | ns |
| t_F | Gate Fall Time | Note 6 | | 500 | 1500 | ns |
| f_{max} | Maximum Operating Frequency | Note 7 | 100 | 150 | | kHz |

Note 1 Voltage remains low for time affected by C_T .

Note 2 When using sense MOSFETs, it is recommended that $R_{\text{SENSE}} < 50\Omega$. Higher values may affect the sense MOSFET's current transfer ratio.

Note 3 Input switched from 0.8V (TTL low) to 2.0V (TTL high), time for Gate transition from 0V to 2V.

Note 4 Input switched from 0.8V (TTL low) to 2.0V (TTL high), time for Gate transition from 2V to 10V.

Note 5 Input switched from 2.0V (TTL high) to 0.8V (TTL low), time for Gate transition from 11V (Gate ON voltage) to 10V.

Note 6 Input switched from 2.0V (TTL high) to 0.8V (TTL low), time for Gate transition from 10V from 2V.

Note 7 Frequency where gate on voltage reduces to 10V with 50% input duty cycle.

Tabella 5: Caratteristiche elettriche del driver MIC5020 della Micrel.

Le basse resistenze parassite dell'induttore e del MOS consentono di poter approssimare il boost con un circuito ideale; infatti considerando correnti medie di 100 mA si otterrebbero cadute di tensione sul MOSFET e sull'induttanza del tutto trascurabili rispetto alla tensione di alimentazione.

Al fine di ridurre al minimo le perdite, è preferibile scegliere poi un diodo rapido nello switching e che presenti, inoltre, una tensione di breakdown superiore ai 250 V; si è scelto secondo questi criteri l'impiego dell'STTH2R06, un diodo shottky con tensione VRRM (Repetitive peak reverse voltage) di circa 600 V, molto rapido (un centinaio di nanosecondi di forward recovery time) e con bassa resistenza parassita.

Table 3: Absolute Ratings (limiting values)

| Symbol | Parameter | | Value | Unit | |
|--------------|---|-----------|---------------------------|------------------|---|
| V_{RRM} | Repetitive peak reverse voltage | | 600 | V | |
| $I_{F(RMS)}$ | RMS forward current | | 7 | A | |
| $I_{F(AV)}$ | Average forward current $\delta = 0.5$ | DO-41 | $T_I = 70^\circ\text{C}$ | 2 | A |
| | | SMA | $T_I = 85^\circ\text{C}$ | 2 | |
| | | SMB | $T_I = 100^\circ\text{C}$ | 2 | |
| I_{FSM} | Surge non repetitive forward current | DO-41 | $t_p = 10\text{ms}$ | 40 | A |
| | | SMA / SMB | sinusoidal | 30 | |
| T_{stg} | Storage temperature range | | -65 to +175 | $^\circ\text{C}$ | |
| T_J | Maximum operating junction temperature | | 175 | $^\circ\text{C}$ | |

Table 5: Static Electrical Characteristics

| Symbol | Parameter | Test conditions | | Min. | Typ | Max. | Unit |
|------------|-------------------------|---------------------------|-------------------|------|-----|------|---------------|
| I_R^* | Reverse leakage current | $T_J = 25^\circ\text{C}$ | $V_R = V_{RRM}$ | | | 2 | μA |
| | | $T_J = 150^\circ\text{C}$ | | | 12 | 85 | |
| V_F^{**} | Forward voltage drop | $T_J = 25^\circ\text{C}$ | $I_F = 2\text{A}$ | | | 1.7 | V |
| | | $T_J = 150^\circ\text{C}$ | | | 1.0 | 1.25 | |

Pulse test: * $t_p = 5\text{ms}$, $\delta < 2\%$
 ** $t_p = 380\ \mu\text{s}$, $\delta < 2\%$

Tabella 6: Caratteristiche elettriche del diodo shottky STTH2R06 di STMicroelectronics.

Il partitore resistivo fornirà la frazione di tensione d'uscita adatta ai valori gestibili dal microcontrollore, il quale si occuperà della sua stima ad anello chiuso.

In parallelo al resistore R14 è posto un diodo zener per evitare sovratensioni e conseguenti danni al microcontrollore; in corrispondenza di R14 è presente l'ingresso all'ADC: se la tensione dovesse superare il limite ultimo di 3.3 V accettabili il diodo si accende e porta a 0 V la tensione ai capi di R14.

La capacità inserita dopo l'induttanza ed in parallelo al partitore è di 10 nF ed il suo scopo è quello di diminuire il ripple stabilizzando la tensione in uscita.

Per convalidare il funzionamento del sistema si sono svolte prove sperimentali facendo uso di generatori di segnale e misuratore di tensione (oscilloscopio) della Agilent verificando che, a pari frequenza, ad un incremento del duty cycle si ha una risposta in tensione direttamente proporzionale.

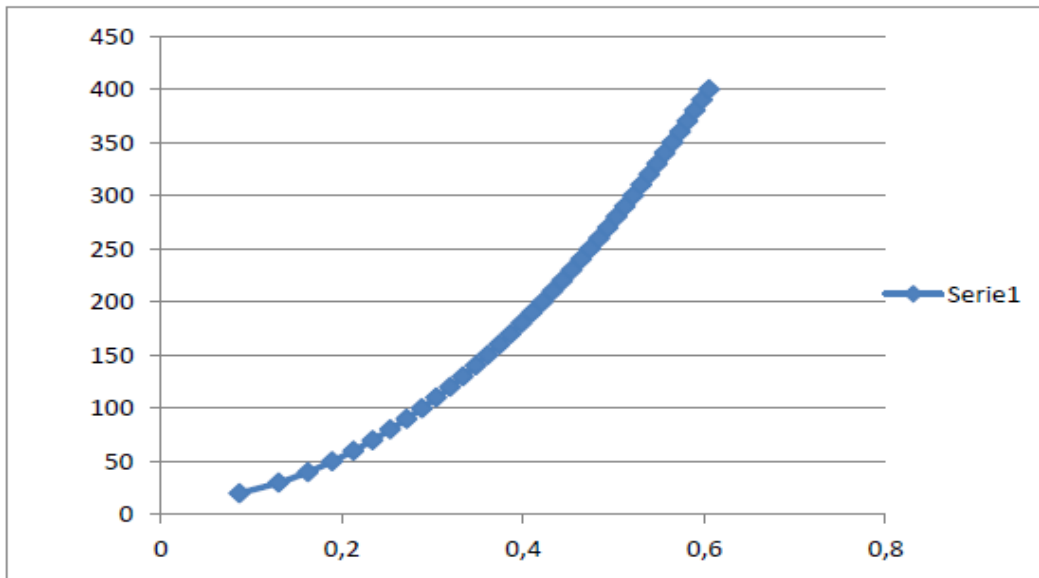


Grafico 3: Andamento della tensione in funzione del dutycycle; basta un ciclo di funzionamento minore di 0.4 per raggiungere le tensioni di pilotaggio dei microattuatori PZT.

Dal momento che il comportamento del boost è approssimabile con un andamento lineare si è scelta una frequenza di pilotaggio dell'interruttore MOS che potesse essere facilmente gestibile dai componenti utilizzati, precedentemente descritti: 100 KHz.

Quindi si fornisce al gate driver e, quindi, al MOSFET un segnale di commutazione con un duty-cycle variabile nel tempo, che controlli il boost in modo da ottenere la forma d'onda desiderata. Questo avviene all'interno di un anello di retroazione, in modo che il microcontrollore riesca in ogni istante a controllare la tensione ai capi dell'attuatore.

Per implementare un feedback è necessario fornire delle tensioni coerenti con il range di lavoro dall'ADC, e cioè da 0V a 3.3V (ovvero la tensione di alimentazione dell'integrato); bisogna dimensionare il partitore costituito da R14 e il parallelo di R12, R13, R34, R35 in modo da riportare all'ingresso del sistema di acquisizione un voltaggio proporzionale, ad esempio, in scala 1:10, alla caduta di tensione ai capi del boost.

Il dimensionamento del partitore è fondamentale per il corretto funzionamento del circuito; esso, infatti, svolge una duplice funzione: innanzitutto, come appena enunciato, fornisce all'ADC un voltaggio direttamente proporzionale a quello che si ritrova in uscita dal convertitore; inoltre determina la corrente di carico del boost e quindi il regime di funzionamento; assumendo di raggiungere la tensione voluta impiegando meno del 50% di duty cycle, si calcola tramite le equazioni descritte nei paragrafi precedenti che la corrente limite di uscita per non entrare in regime CCM deve essere inferiore ai 120 mA, che equivale ad una resistenza minima di 2 k Ω .

Infine esso può concorrere alla generazione di forme d'onda alternative, intervenendo nella scarica del condensatore C18 e quindi nella creazione di pendenze negative del segnale d'uscita, e dunque fornendo una grande versatilità al circuito.

Il valore del partitore deve pertanto essere abbastanza grande da evitare uno sforzo eccessivo da parte del boost, permettendogli il raggiungimento delle tensioni di funzionamento (si ricordi che la resistenza equivalente deve essere maggiore di 2 k Ω per evitare di entrare in regime CCM quando opero a 250 V). Una resistenza troppo bassa, infatti, si tradurrebbe in transitori positivi di carica più lenti e in una dissipazione di potenza maggiore. Tuttavia, l'impedenza equivalente deve risultare sufficientemente ridotta per minimizzare i tempi di scarica del condensatore C18, con un conseguente aumento dell'inclinazione dei fronti di discesa. Pertanto il partitore sarà dimensionato usando quattro resistenze da 1M Ω e una da 2,4K Ω .

Tuttavia il sistema circuitale implementato è inadatto per produrre fronti di discesa sufficientemente ripidi, soprattutto se ci si trova a bassi valori di tensione. Infatti la pendenza del fronte dipende, oltre che dal partitore, dalla differenza di potenziale ai capi della capacità e quindi delle resistenze: più questo valore è piccolo, più la scarica rallenta.

Quindi si avranno fronti più ripidi di discesa quando il condensatore C18 si trova caricato ad alte tensioni e fronti più morbidi quando l'uscita del boost si trova a tensioni di poche decine di Volt. Lo stesso problema di generazione dei fronti si può osservare specularmente anche nella fase di carica.

Questo inconveniente è risolvibile però mediante un opportuno controllo del boost: si supponga ad esempio di voler creare un fronte di salita di 40 V partendo dalla situazione iniziale in cui il sistema è scarico (0 V).

L'uscita avrà un transitorio la cui costante di tempo dipende dal carico (10 nF), dalla resistenza equivalente introdotta dal partitore e dalla corrente media fornita dall'induttanza: si potrebbe immaginare come un circuito RC parallelo in cui viene forzata una corrente continua.

Man mano che ci si avvicina alla tensione da raggiungere, la pendenza ovviamente diminuisce. Se invece si imponesse al boost il raggiungimento di una tensione di 100 V, la soglia dei 40 V verrebbe raggiunta nella zona del transitorio a maggior pendenza.

Si raggiunge la soglia dei 40 V in circa 300 μ s a fronte dei circa 5 ms impiegati in quello precedente: tra i due valori c'è un ordine di grandezza.

Tuttavia un controllo che riesca a creare sovraelongazioni nella maniera sopra descritta, deve essere brusco, molto reattivo, per poi riuscire a riportare repentinamente l'uscita al valore desiderato; un sistema con queste caratteristiche porterebbe all'introduzione di numerose fluttuazioni indesiderate: a questo scopo è stato introdotto l'ultimo modulo del circuito, costituito fondamentalmente da una resistenza che, congiunta alla capacità del piezoelettrico, opera un filtraggio su tutte le componenti spurie del segnale.

Bisogna però dimensionare tale resistore in modo tale che filtri bene la zona lineare del segnale, senza rallentarlo eccessivamente smussandone i fronti. Dai risultati ottenuti e rappresentati nelle figure 4.x, si deduce che una resistenza di qualche centinaio di k Ω è sufficiente allo scopo. Per esempio si potrebbe adottare una 300 k Ω .

È da notare inoltre che, in questo modo, quando il MOSFET Q4 è acceso, la parte di generazione del segnale è separata dal carico: questo facilita ancor di più la generazione del fronte. Infatti, si può sfruttare questo periodo per scaricare la capacità del boost C18 fermandosi al valore di tensione del primo fronte (anzi, ad un valore adeguatamente superiore per agevolare la rapidità del transitorio di carica), evitando così di scaricarla completamente per poi doverla ricaricare nuovamente.

Il fronte è ora limitato esclusivamente dal polo introdotto da R15 e dalla capacità equivalente del piezoelettrico; la costante di tempo del sistema vale circa 300 μ s, che

su un segnale di poche decine di Hz, è sufficientemente piccola da non distorcere la forma d'onda.

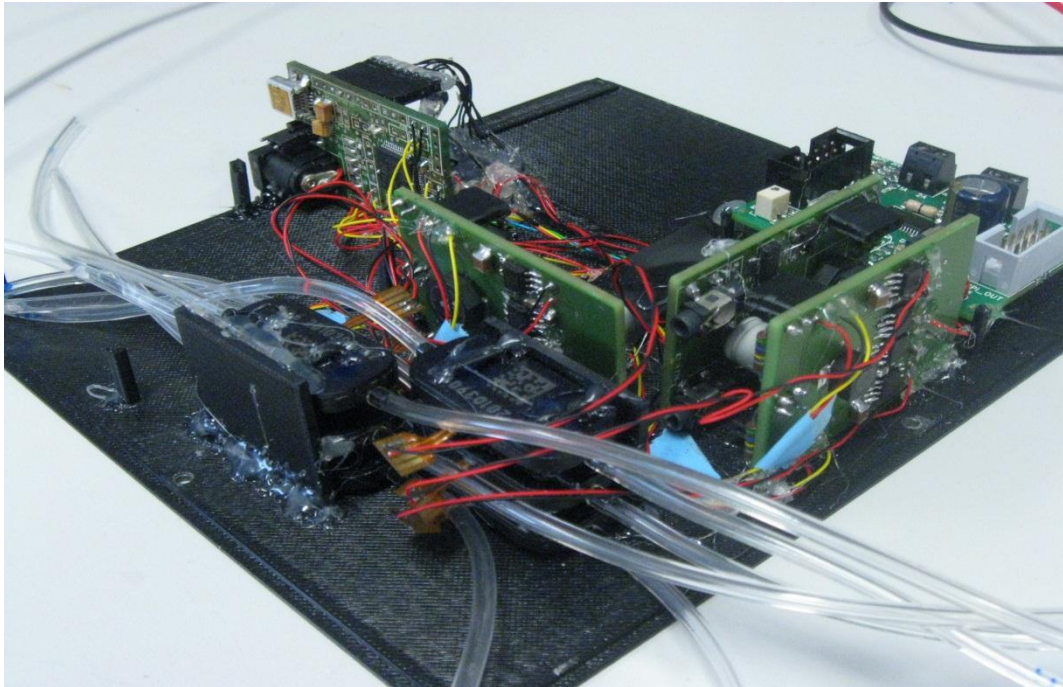


Figura 4. 16: Interno dello strumento; si possono osservare le tre schede dello stadio di potenza ognuna delle quali pilota due micropompe.

4.9 Consumi

Conoscendo le tensioni di comando l'entità del carico e la corrente che scorre in uscita è possibile fare una stima dei consumi dello stadio di potenza progettato.

Si consideri che il microcontrollore con firmware operante consuma una corrente di circa 45mA.

Si consideri che il boost produca un'onda rettangolare con tensione di picco di 250V. Equivale ad una tensione media in uscita pari a:

$$V_{rms} = \sqrt{\frac{1}{T} \int_{-\frac{T}{2}}^{\frac{T}{2}} [V(t)]^2 dt}$$

[4.37]

In questo caso corrisponde semplicemente alla metà dell' ampiezza di picco, ovvero 125V. La corrente in uscita sarà dunque stimabile considerando come carico resistivo il partitore (R12, R13, R34, R35) /R14, valutato, in maniera conservativa, essere equivalente ad un solo resistore di valore 240 kΩ; la corrente di carico sarà pertanto dell'ordine di 0.5mA, decisamente non influente rispetto ai consumi del microcontrollore (45 mA circa).

In realtà si è visto nei capitoli precedenti che le micropompe in funzione contemporaneamente per ogni ciclo sono due, quindi il consumo effettivo è di 1mA.

La resistenza R15 da 300kΩ verrà considerata trascurabile, dal momento che essa vede ai suoi capi alte tensioni esclusivamente durante i brevi periodi di accensione del MOSFET Q4. Quindi in uscita viene richiesta una potenza di circa 125 mW.

Riportata in ingresso determina un assorbimento da parte del generatore di tensione(a 12V)di una corrente d'alimentazione media di circa 10 mA.

Bisogna inoltre aggiungere al conto complessivo, il consumo dovuto ai gate driver ed alle non idealità dei componenti utilizzati che risultano essere dell'ordine della decina di mA.

A fronte dei precedenti calcoli e dalle prove sperimentali, è possibile stimare una corrente totale assorbita, in media, di circa 65 mA durante il funzionamento a pieno regime (cioè con l'ampiezza dell'onda generata che raggiunge il valore massimo di 250 V), che equivale ad una potenza dissipata di circa 800mW.

Se si considerassero solo i consumi dovuti allo stadio di potenza è possibile calcolare un'efficienza pari a circa l' 85%.



Figura 4. 17: Topview dello strumento.

4.10 Il firmware

Il firmware di controllo ha il compito di gestire i sensori ed i riscaldatori del chip di silicio tramite segnale PWM, controllare il movimento del motore passo-passo e regolare la tensione ai capi delle micropompe in uscita al boost ad anello chiuso.

Per la scrittura si è utilizzato il software compilatore Keil mentre per l'invio dei comandi al microcontrollore si è fatto uso del software Docklight.

I comandi che L'STM32 deve eseguire sono codificati in stringhe di byte espressi in esadecimale. Ogni byte inviato ha un preciso significato: può contenere informazioni relative ad un valore da assegnare ad una variabile o richiamare una funzione che il microcontrollore deve svolgere.

Tramite Docklight i byte sono trasmessi ad un'apposita funzione in grado di assegnare le informazioni presenti sul buffer dell'USB a tutte le variabile che figurano nella funzione richiamata dal comando inviato.

Una volta ricevuti tutti i dati la funzione innesca una Callback, scandita dal Real Time Clock (RTC) del microcontrollore e determina istante per istante la tensione che si richiede in uscita tramite il comando inviato; la reiterazione della funzione è impostato a 500Hz.

Consideriamo, ad esempio, il comando di controllo del boost:

```
unsigned char Boost control[21]={0x53, 0x54, 0x12, 0x01, 0x43, 0x05, 0xC8, 0x00, 0x03, 0x00, 0x20, 0x1C, 0x03, 0x20,0x00,0x00,0x00,0x0A, 0xAA, 0x4F, 0x50};
```

Il numero totale di byte è 21; i primi 5 byte sono di servizio e contengono informazioni di controllo, come i byte 3 e 5; il byte 2 indica il numero totale di byte che compongono il comando mentre il byte 4 indica il comando vero e proprio che in microcontrollore è chiamato ad eseguire: il byte 0x43 richiamerà il case Boost Control all'interno del firmware; questo tramite un puntatore assegnerà i valori contenuti nei byte dal 6 al 17 alle variabili corrispondenti:

```
VOLT=( pboost_cont->Volt);  
D_C_up= (pboost_cont->Dc);  
SALTO= (pboost_cont->Salto);  
FREQUENZA= (pboost_cont->Frequenza);
```

...

e farà partire la callback per la determinazione della tensione ai capi della micropompa

```
STM32_RTC_Init();  
STM32_RTC_Configure(500, &MyApp_SEGA_CallBack);
```

Dal momento che gli attuatori possono essere pilotati con diverse forme d'onda dapprima si è sviluppato un controllo derivativo per la creazione di denti di sega e segnali triangolari e sinusoidali, successivamente si è snellito il corpo del firmware considerando esclusivamente segnale di controllo ad onda quadra che oltre a

richiedere meno linee di codice permette il pilotaggio delle pompe con ottima efficienza.

Sia nel caso di segnali triangolari che ad onda quadra è necessario effettuare il sensing sul nodo di uscita ed anello chiuso generare il giusto segnale PWM da inviare al gate driver e quindi al MOS che funge da interruttore:

```
#define BANCO_POMPA_1          GPIOC
#define PIN_POMPA_1            GPIO_Pin_6
#define ADC_POMPA_1           15
#define TIM_POMPA_1            TIM1
#define CHANNEL_POMPA_1       1

ADC_Mean_Value= ADC_Mean_Value*16;
V=((VOLT_P1)*65535/(140*3));
    if (VOLT_P1>0)
    {
        If (ADC_Mean_Value<65500)
        {
            if (ADC_Mean_Value<(V-100))
            {
                D_C_P1=D_C_P1+((V-ADC_Mean_Value)/250);
                STM32_PWMO_Set(TIM_POMPA_1, CHANNEL_POMPA_1 ,
D_C_P1);
            }
            if (ADC_Mean_Value>(V+100))
            {
                D_C_P1=D_C_P1-((ADC_Mean_Value-V)/250);
                STM32_PWMO_Set(TIM_POMPA_1,
CHANNEL_POMPA_1 , D_C_P1);
            }
        }
    }
```

};

Sono due stralci del codice: tra le define si identifica il timer della pompa 1 col timer 1 del microcontrollore, il canale scelto è il primo; allo stesso modo il pin che farà clampare il MOSQ4 a massa sarà il 6 del banco C dei GPIO.

La tensione misurata dall'ADC (che per comodità viene moltiplicata per 16) è espressa da `ADC_Mean_Value`, un numero che va da zero a 65536 (numero decimale equivalente alla sedicesima potenza di 2), dove la quantità massima rappresenta una tensione misurata pari 3.3 V. Il dato contenuto in `VOLT_VERO` dovrà quindi essere convertito in questa scala, per renderlo paragonabile ad `ADC_Mean_Value` tramite l'operazione:

$$ADC_Mean_Value = ADC_Mean_Value * 16;$$

$$V = ((VOLT_P1) * 65535 / (140 * 3));$$

Al microcontrollore è impostata la generazione di un segnale PWM con duty cycle variabile in uscita dal primo canale del timer 1. L'STM-32 mette infatti a disposizione 16 canali, 4 canali per ciascuno dei 4 timer, dai quali si può ottenere un onda quadra di ampiezza 3.3 V della frequenza e duty-cycle desiderati.

Il duty cycle del segnale generato da questo canale, per l'appunto, quello di controllo del transistor Q3, è incrementato o diminuito di una quantità proporzionale alla differenza tra il valore di tensione misurato e quello da raggiungere (con una risoluzione di circa 2 V): subisce cioè un incremento o una diminuzione di maggior rilevanza nel caso in cui il valore da ottenere sia molto distante dal punto di lavoro, in modo da rendere più rapida la risposta del boost.



Figura 4. 18: Tensione di pilotaggio a dente di sega; la rampa presenta pochissimo rumore grazie al filtraggio effettuato.

Durante la procedura di setting dell'ADC, viene impostato un timer (a scelta tra i timer disponibili nel microcontrollore: si è optato per il timer 4), il quale avrà il compito di scandire la frequenza con cui l'ADC stesso esegue le misure. Va inoltre fornito un numero di campioni da cui estrapolare il valore medio; la variabile `ADC_Mean_Value` ha questo nome, infatti, perché il valore ad esso associato viene estratto dalla media campionaria dell'impostato numero di misure.

Una volta compiuto un numero sufficiente di acquisizioni per calcolare l'`ADC_Mean_Value`, il valore di questa variabile viene restituito ad un task, che può essere sfruttato dal programmatore per inserire al suo interno delle linee di codice che verranno quindi ripetute periodicamente.

Quindi la frequenza di ripetizione del codice dipende dal numero di acquisizioni che deve compiere l'ADC per calcolare la media: più questo valore è basso, più frequentemente sarà eseguito il task.

Nel caso che si sta analizzando, sarebbe opportuno che la velocità del controllo sul boost (ovvero quante volte viene ripetuto il task di cui sopra) sia di circa una decina di kHz, in modo da assicurare sufficienti variazioni del duty-cycle per garantire il raggiungimento della tensione voluta ad ogni cambio della tensione di uscita impostata e per evitare di sovraccaricare di lavoro il microcontrollore.

Questo è un aspetto molto importante dal momento che la modalità di funzionamento dello strumento implica il pilotaggio parallelo di 2 micropompe per ciclo.

Infatti l'STM-32 dispone di un solo ADC; se quindi si volessero compiere più acquisizioni simultaneamente attraverso canali diversi, questi si dovrebbero spartire la capacità del canale. Per calcolare la frequenza con cui impostare l'ADC, occorre quindi moltiplicare il rate di acquisizione che si vuole associare a ciascun canale per il numero di canali coinvolti nella misura, assicurandosi però che il microprocessore abbia sufficiente tempo, tra un'acquisizione e quella successiva, da poter completare l'esecuzione di tutte le operazioni presenti nei task associati.

Essendo, inoltre, il controllo scelto di per sé molto rumoroso ma veloce, non ci si preoccupa di ottenere valori precisi: infatti, in seguito i segnali generati verranno mediati dal polo introdotto dal filtro passabasso costituito dalla capacità del piezoelettrico e dalla resistenza R15; si predilige dunque la velocità di funzionamento, in modo da sfruttare tutta la banda assegnata all'ADC per lo svolgimento delle operazioni inserite nel task associato, evitando ogni misura superflua sulla media; si è impostato pertanto un valore di campioni uguale ad 1 ed una frequenza di acquisizione dell'ADC di 10 kHz.

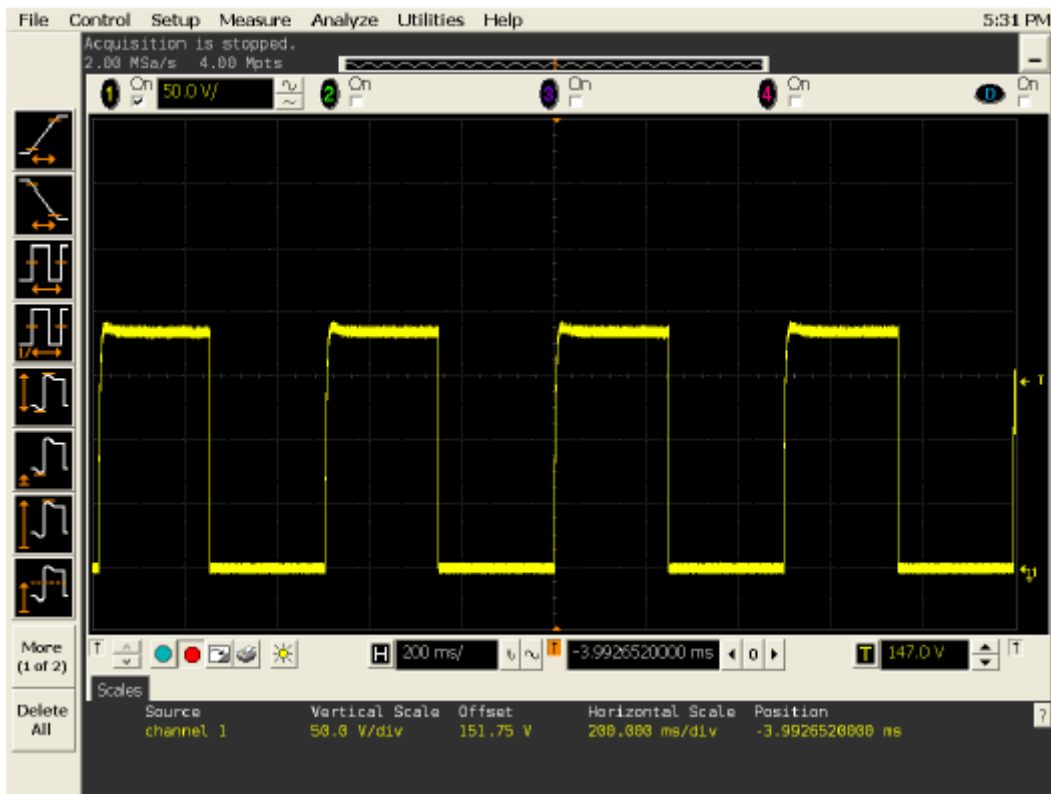


Figura 4. 19: Tensione di comando ad onda quadra; è il pilotaggio che permette di avere maggiore portata ma anche maggior rumore acustico dei buzzer PZT.

4.11 Il software

Lo scopo del software è quello di raccogliere i dati inseriti dall'utente e trasferirli al microcontrollore; l'unica differenza rispetto Docklight è la possibilità di poter usufruire di un'interfaccia grafica semplice ed intuitiva e quindi accessibile ad una larga utenza.

Il programma è compilato in linguaggio Visual C++ sfruttando l'applicazione Visual Studio.

Si sono realizzate due versioni: una per il test dello strumento con funzionalità indirizzate alla verifica del funzionamento corretto delle parti; la seconda e definitiva integra la gestione delle pompe e del motore per il movimento del magnete e, soprattutto, consente di effettuare tutte le operazioni necessarie per la purificazione del DNA.

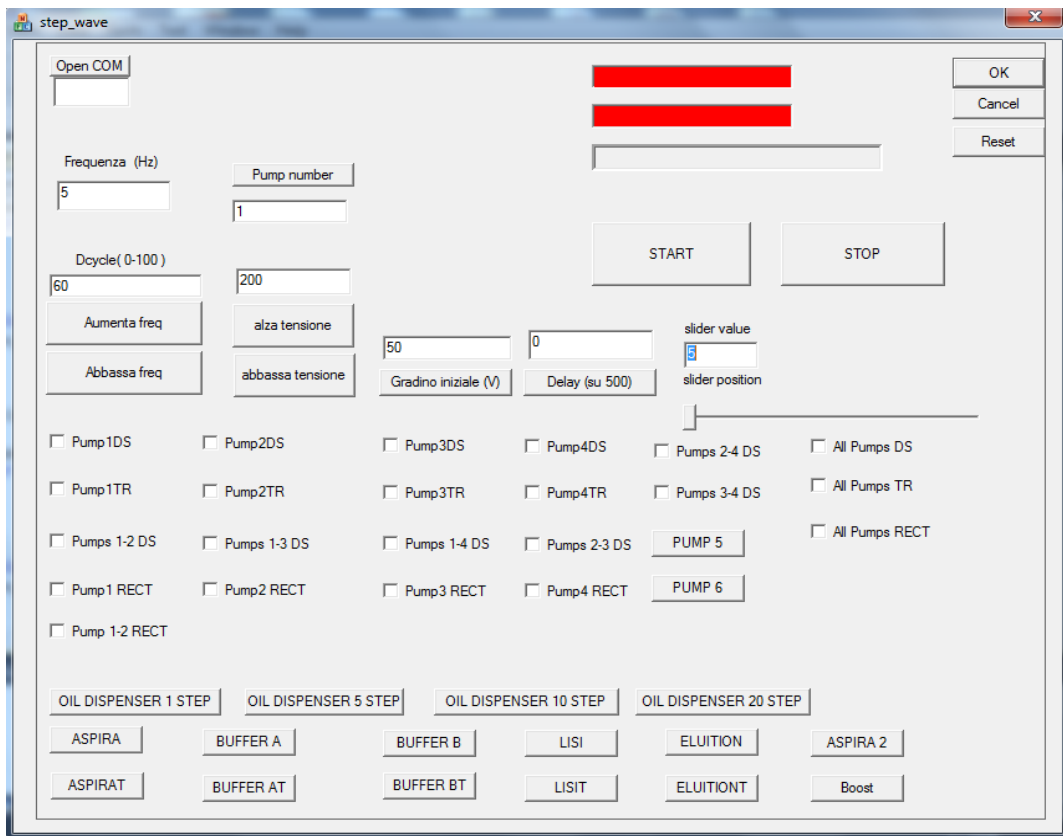


Figura 4. 20: Interfaccia di servizio per il setup dello strumento.

Come si vede in figura l'interfaccia di servizio permette la gestione delle singole micropompe oppure combinazioni a coppie; inoltre la versatilità del software permette di poter eseguire più operazioni contemporaneamente, quindi è possibile attivare anche tutte e 6 le pompe nello stesso momento, nel caso in cui fosse necessario. Le forme d'onda di comando selezionabili sono il dente di sega, la triangolare e la rettangolare; la tensione massima, la frequenza, il ritardo e il duty-cycle si impostano attraverso l'apposito riquadro.

E' da notare che grazie alla realizzazione dello slider, la frequenza della forma d'onda è variabile senza dover necessariamente bloccare la micropompa; questo ha permesso di valutare con semplicità la variazione di alcuni fattori come la portata determinando con precisione le frequenze di risonanza di diversi fluidi.

La UI definitiva integra il comando del motore passo-passo e la scrittura del codice contiene le frequenze ideali per il pilotaggio delle pompe in ogni fase della purificazione.

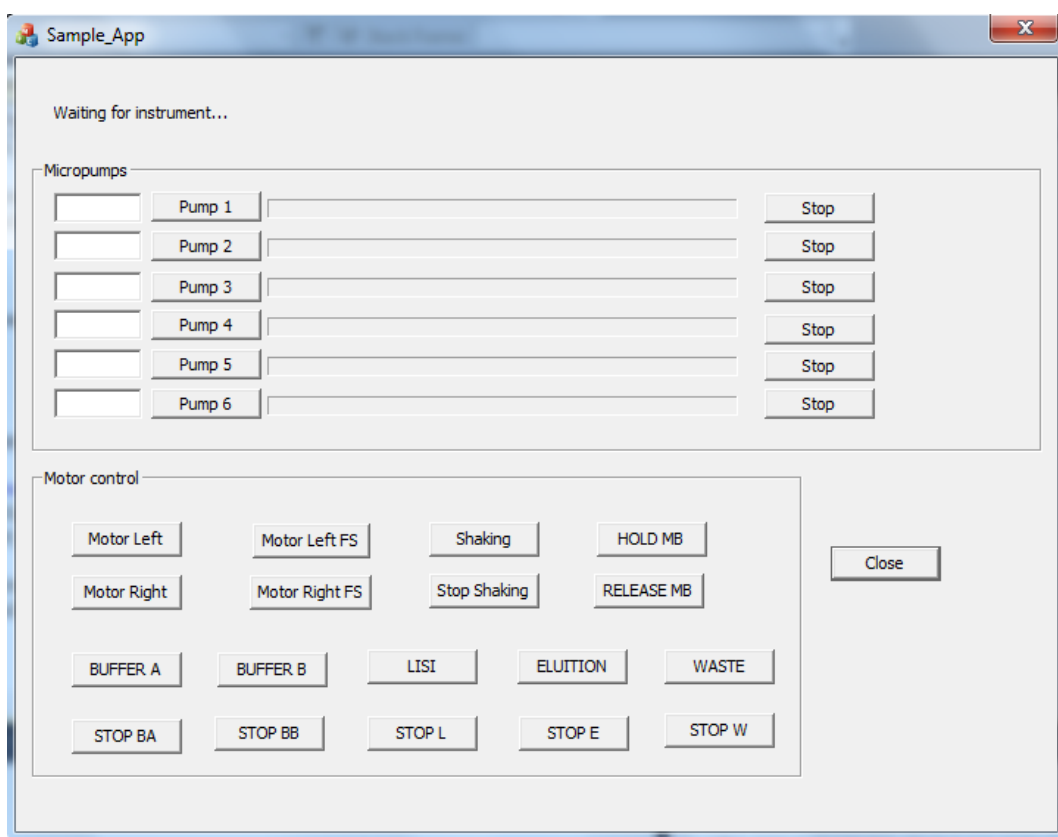


Figura 4. 21: Interfaccia utente per il controllo dello strumento.

Dal momento che ogni fase è scandita da una propria tempistica, si è introdotto il timer per ogni pompa con unita base il millisecondo.

Adesso è possibile poter muovere il motore in entrambi i sensi di rotazione; sono presenti 3 pulsanti per effettuare la movimentazione delle microbiglie, trattenerle e rilasciarle.

Si ha il totale controllo su ogni fase dell'estrazione, dalla lisi all'eluizione, tramite gli appositi comandi; e se qualcosa dovesse andare diversamente da come l'utente si aspetta è possibile arrestare il sistema grazie ai pulsanti di blocco riferiti ad ogni fase. Lo strumento è gestibile in ogni sua parte da pc attraverso comunicazione USB.

CAPITOLO 5

Validazione strumento e risultati

5.1 Introduzione

In questa sezione del lavoro di tesi verranno mostrate le prove effettuate con lo strumento ed i risultati ottenuti.

Il processo di validazione e sperimentazione ha riguardato sia l'aspetto fluidico inerente al corretto funzionamento delle micropompe e del *disposable microfluidico*, sia l'aspetto funzionale di estrazione e purificazione del DNA: si è potuto valutare la reale efficacia del sistema progettato mediante l'amplificazione del materiale genomico attraverso reazione di PCR.

5.2 Prove di estrazione e purificazione del DNA

Per poter verificare il corretto funzionamento dello strumento e quindi la bontà del processo di estrazione si sono considerati tre campioni di saliva da tre diversi donatori.

Per ogni campione si è realizzata una doppia prova di purificazione per potere osservare il grado di ripetibilità delle operazioni dello strumento e per poter riscontrare eventuali anomalie di funzionamento.

Per garantire un confronto corretto tra le diverse prove realizzate, viene utilizzato sempre lo stesso protocollo di reazione. In particolare il protocollo è scandito dalle seguenti operazioni:

- 110 ul di buffer di Lisi + 15ul di microbiglie magnetiche (miscelare per 2 minuti)
- Introduzione di 60 ul di sangue e 430 ul di buffer di Lisi;
- Attivazione del magnete per 30 secondi;
- Estrazione del sovrantante;

- 360 ul di buffer di Lisi;
- Attivazione del magnete per 30 secondi;
- Estrazione del sovrantante;
- Ripetere le fasi 5, 6, 7;
- 680 ul di alcol(fenolo);
- Attivazione del magnete per 30 secondi;
- Estrazione del sovrantante;
- Ripetere le fasi 9, 10, 11 per 2 volte;
- 210ul di buffer di Eluizione(etanolo) alla temperatura di 80 °C per 10 minuti;
- Recupero del sovrantante dopo 1 minuto di applicazione del magnate.

Una volta estratto, il DNA è prelevato ed introdotto in un termociclatore standard per poter verificare il reale contenuto del materiale genomico attraverso amplificazione per reazione di PCR

5.3 La Real-Time PCR

La Real-Time PCR, denominata anche PCR quantitativa in tempo reale, è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanea di DNA. Come accade per la PCR qualitativa, l'azione di amplificazione è svolta dall'enzima DNA-polimerasi e, di conseguenza, i processi alla base della fase di amplificazione sono regolati da protocolli molto simili: cicli termici caratterizzati da temperature e durate molto precise.

Tuttavia la possibilità di seguire istante per istante il numero crescente di molecole di DNA nel campione biologico, offre vantaggi notevoli.

In primo luogo non sono più necessarie le tecniche elettroforetiche per poter valutare l'effettiva amplificazione della sequenza target di DNA; oltre ad una riduzione dei tempi di analisi, questo comporta anche una diminuzione del rischio di contaminazione del materiale genomico trattato.

Il secondo vantaggio consiste nella possibilità di risalire alla concentrazione iniziale del materiale genomico di interesse, nota la quantità del segnale di fluorescenza emesso dal campione biologico.

Infine, l'utilizzo di marcatori ad emissione di fluorescenza e di sensori di rilevazione molto sensibili, consente di ottenere una migliore sensibilità di rilevazione del materiale genomico rispetto alla tecnica di elettroforesi, accompagnata dalla possibilità di distinguere molecole di DNA che differiscono anche di poche basi.

Il monitoraggio in tempo reale dell'andamento del numero delle molecole di DNA amplificate, è, infatti, garantito dalla presenza di coloranti fluorescenti che si intercalano nella doppia elica di DNA, come il SYBR Green, o dall'ibridazione di sonde specifiche che emettono un segnale di fluorescenza.

L'emissione di fluorescenza, proporzionale al numero di molecole di DNA target amplificate, viene infine catturata da uno specifico sistema ottico che, mediante l'utilizzo di un PC, permette di seguire in tempo reale l'andamento del segnale luminoso nel tempo.

5.4 Il termociclatore

Il principio di funzionamento del termociclatore (figura 5.1) si basa su un blocco metallico su cui sono presenti delle cavità per l'inserimento delle provette che contengono la mix di reazione.

Il materiale di cui è costituito il blocco deve avere un'elevata conducibilità termica per minimizzare i tempi di riscaldamento e raffreddamento e massimizzare l'uniformità.

Per questi motivi le migliori macchine sono quelle che utilizzano l'argento, che presenta la conducibilità termica in assoluto più alta tra tutti i metalli. La temperatura del blocco è generalmente controllata tramite elementi Peltier, che consentono di muoversi all'interno di range di temperature non troppo elevati, ma con un'ottima precisione.

Il raffreddamento è inoltre coadiuvato dalla presenza di ventole al fine di aumentarne l'efficienza. I moderni termociclatori presentano anche un coperchio riscaldato, posto a contatto con i coperchi delle singole provette di reazione.



Figura 5. 1: Termociclatore Biorad CFX-96

Grazie a questo, l'acqua presente nella mix di reazione non si condensa sulla parete interna del coperchio della provetta, quindi si può evitare di ricoprire la mix con olio minerale (accorgimento tipicamente usato per limitare l'evaporazione).

I termociclatori per real-time PCR sono inoltre dotati di sistemi di rilevamento ottico basati su sensori CCD, CMOS o array di fotodiodi, e consentono l'eccitazione a diverse lunghezze d'onda tramite sistemi a LED.

Un esempio commerciale è dato dal CFX96 prodotto da Bio-Rad (Fig. 5.1).

Date le sue dimensioni di 33x46x36 cm, e il suo peso di 21,4 kg, questo è chiaramente un strumento da banco, non destinato ad applicazioni point-of-care.

Si ricava dal datasheet che l'accuratezza termica è di ± 0.2 °C a 90°C, mentre l'uniformità all'interno del blocco riscaldante è di ± 0.4 °C entro 10 secondi dal raggiungimento dei 90 °C. E' presente un coperchio riscaldabile fino a 105°C. La massima velocità di riscaldamento è di 5°C/sec, mentre la velocità media è di 3°C/sec.

L'utilizzo di LED con picchi di emissione a diverse lunghezze d'onda consente PCR multiplex con un massimo di cinque target amplificabili contemporaneamente. La rivelazione ottica avviene tramite fotodiodi, con un sistema di scanning automatico dell'intera matrice di pozzetti. E' possibile inserire un massimo di 96 campioni, con un volume di mix variabile da 1 a 50 μ l per ciascuno. Il caricamento delle provette deve essere fatto manualmente tramite pipetta.

5.5 Le prove fluidiche

I risultati delle prove descritte nel presente paragrafo, sono ottenuti a seguito di numerose ottimizzazioni riguardanti principalmente la realizzazione della camera di reazione e dei microcanali.

Uno degli aspetti più critici inerenti alla progettazione e alla realizzazione di una camera di reazione per contenere la soluzione biologica da cui estrarre il DNA, ha riguardato il tentativo di evitare la creazione di bolle d'aria responsabili del fallimento del processo di purificazione stesso.

Come si vede in figura 5.2 la realizzazione di particolari strutture alle imboccature della microcamera ha permesso di poter determinare un andamento dei fluidi regolare favorendo un corretto andamento delle varie fasi di estrazione.

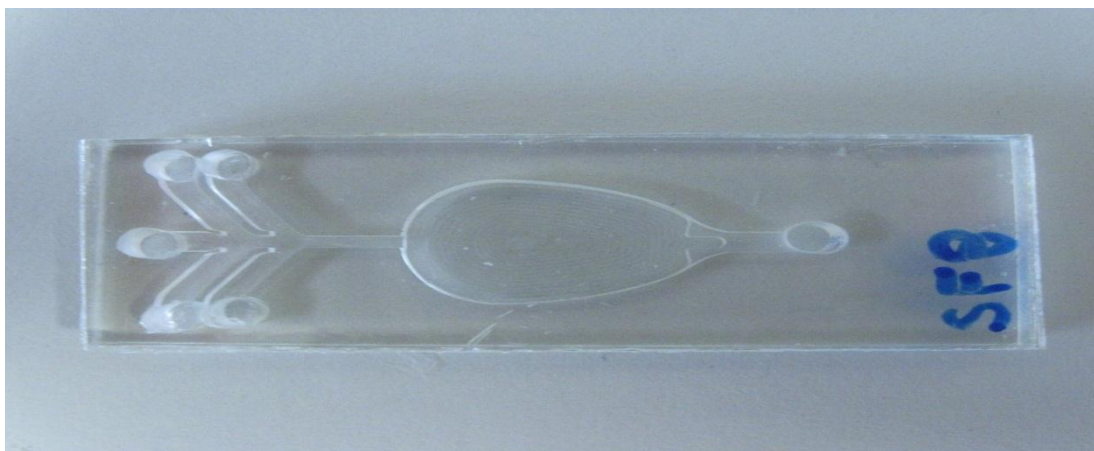


Figura 5. 2: La struttura all'imboccatura della microcamera permette di rompere le bolle d'aria.

Come si può notare dalle figure 5.3-5.11 il sistema funziona bene sia in riempimento sia in svuotamento della camera e i tempi di tali operazioni si attestano tra i due e i tre secondi. Inoltre le connessioni microfluidiche tra *disposable* e strumento hanno un'ottima tenuta.



Figura 5. 3: Riempimento microcamera fase 1/5; la camera è vuota.



Figura 5. 4: Riempimento microcamera fase 2/5.

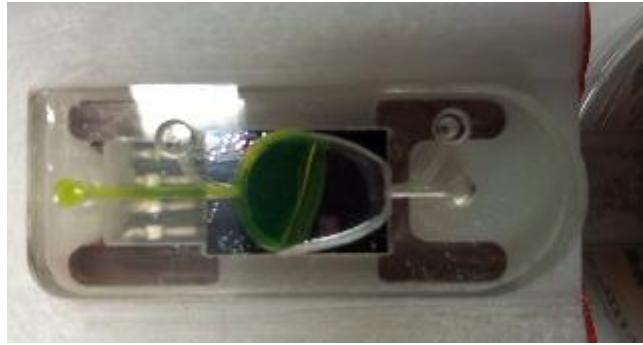


Figura 5. 5: Riempimento della microcamera fase 3/5.



Figura 5. 6: riempimento della microcamera fase 4/5; la struttura evita la formazione di bolle.

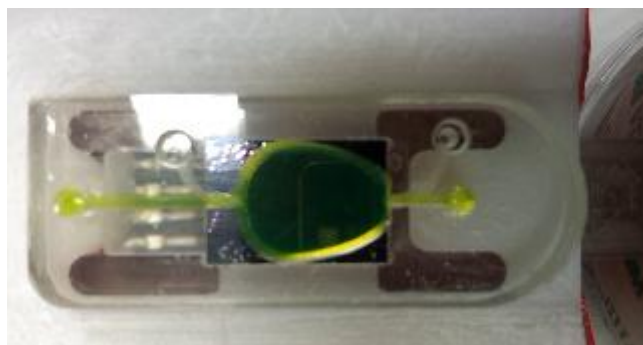


Figura 5. 7: riempimento della microcamera fase 5/5; la camera di reazione è totalmente piena senza alcuna bolla d'aria.

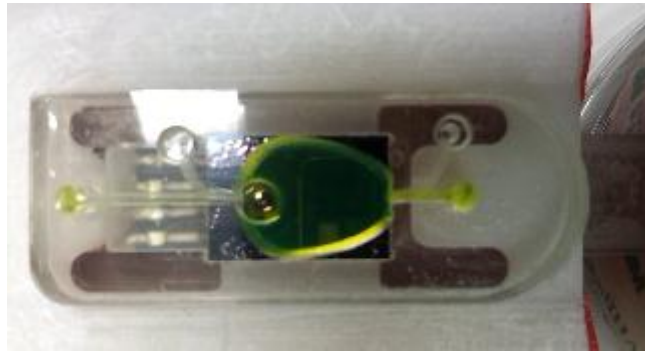


Figura 5. 8; svuotamento fase 1/4.

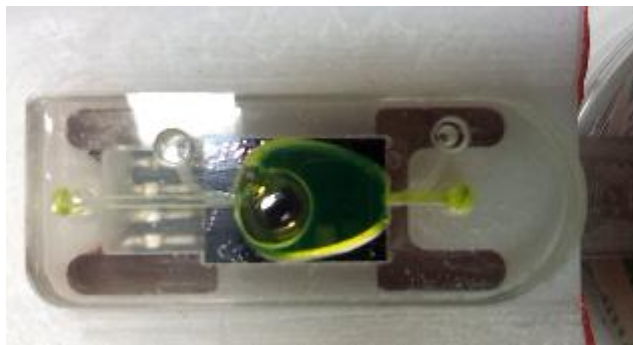


Figura 5. 9: svuotamento fase 2/4.



Figura 5. 10: svuotamento fase 3/4



Figura 5. 11: svuotamento fase 4/4; la microcamera è totalmente svuotata.

5.6 Risultati ottenuti

Nel presente paragrafo sono riportati i risultati ottenuti da una delle diverse prove realizzate per studiare il comportamento del dispositivo realizzato.

Per meglio comprendere le differenze tra l'estrazione ottenuta mediante metodi standard validati e quella ricavata per mezzo dello strumento sono riportate sia le curve dei tre campioni di saliva analizzati con il sistema progettato sia la curva che in egual modo rappresenta l'amplificazione del materiale genomico dei tre campioni la cui estrazione è avvenuta mediante kit commerciale.

In figura 5.12 sono osservabili le curve dei diversi campioni di saliva derivanti da estrazione mediante strumento (in blu, azzurro e rosso) e come termine di paragone la curva ottenuta dall'amplificazione di materiale genomico la cui estrazione è avvenuta mediante kit commerciale (in verde).

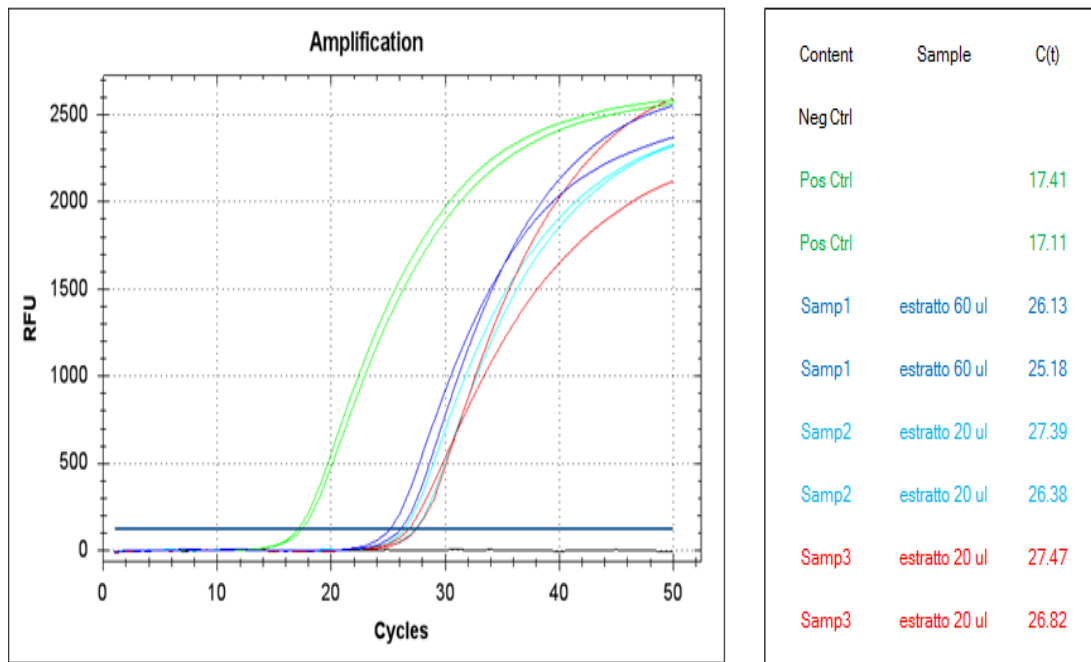


Figura 5. 12: Reazione di Real-Time PCR sui tre campioni di saliva ottenuti tramite lo strumento (blu, azzurro, rosso) e tramite kit di estrazione (verde).

Per il campione 1 si sono utilizzati 60ul di saliva mentre per i campioni 2 e 3, 20ul di saliva; in questo modo si può osservare la relazione tra quantità di DNA e ciclo di salita delle curve: infatti mentre il campione 1 in blu sale intorno al venticinquesimo ciclo, gli altri 2 in azzurro e rosso salgono due cicli dopo; in ogni caso la resa non cambia significativamente tra 20ul e 60ul.

Osservando la figura 5.12, sono possibili alcune considerazioni relative ai risultati ottenuti.

In generale è possibile valutare un'efficienza di amplificazione leggermente inferiore rispetto a quella ottenuta attraverso i metodi standard di estrazione.

Una ragione potrebbe essere data dagli effetti dovuti al contatto diretto tra la superficie in silicio del chip e il campione biologico. Il silicio potrebbe, infatti, interagire con i reagenti, determinando una parziale inibizione del processo di estrazione dell'acido nucleico, danneggiandolo. Per ovviare al problema si potrebbe trattare la superficie del chip esposta alla miscela biologica mediante un processo di ossidazione, ricoprendola di biossido di silicio SiO_2 .

Un secondo aspetto da valutare è la ripetitività dei diversi processi di estrazione ottenuti a partire dagli stessi campioni e dalle stesse quantità. Come si nota per ogni campione di saliva si sono considerate due reazioni di PCR a seguito di due diverse purificazioni dello stesso campione. Osservando i cicli di salita, l'efficienza delle due reazioni di PCR è sufficientemente simile per stabilire una buona ripetitività dei risultati.

Conclusioni e sviluppi futuri

Il sistema implementato si è dimostrato un valido dispositivo per la realizzazione del processo di estrazione e purificazione del DNA su chip microfluidico.

La sostituzione di strumenti di laboratorio quali micropipette, cuvette e soprattutto la centrifuga è garantita da metodi di purificazione che sfruttano microbiglie magnetiche rivestite di silice, sostanza affine alla molecola dell'acido nucleico.

La scelta di utilizzare microattuatori a piezoelettrico per pilotare i flussi all'interno del chip microfluidico permette di evitare l'utilizzo di classici apparati per la fluidica come la syringe pump consentendo di avere vantaggi sia in termini d'ingombro sia economici, dato il basso costo dei buzzer.

La necessità di comandare l'attuazione del PZT comporta la progettazione di uno stadio di potenza; però, le ridotte dimensioni di quest'ultimo non ostacolano l'integrazione di sei micropompe.

Infatti ogni board sintetizza due convertitori elevatori boost, quindi ne bastano solo tre per gestire il doppio di attuatori.

La movimentazione delle biglie è ottenuta mediante un magnete dalle ridotte dimensioni che, grazie ad un braccio a cui è ancorato, svolge due funzioni: si comporta da centrifuga nel momento in cui si deve provocare la rottura della membrana cellulare; ed in fase di svuotamento della microcamera di reazione mantiene immobile il pellet di microbiglie a cui è agganciato il DNA.

La realizzazione del *disposable* fluidico ha visto lo sviluppo di diversi prototipi al fine di trovare le giuste geometrie e compromessi spaziali; il chip definitivo risponde alle esigenze di compattezza, basso costo e biocompatibilità che la filosofia del *point of care* richiede.

Sfruttando la laminarità del flusso si è evitato l'impiego di valvole: sebbene alcune soluzioni, come le CAM, presentassero una buona efficienza non si prestavano ad essere integrate nello strumento.

La scheda di controllo permette l'interfacciamento con personal computer tramite comunicazione seriale USB consentendo un controllo dello strumento via software.

Una semplice interfaccia realizzata con Visual Studio gestisce le funzionalità delle pompe e del motore lasciando all'utente le scelte di protocollo di purificazione del campione: infatti la tempistica delle diverse fasi di estrazione è configurabile.

Come qualsiasi sistema in fase di prototipazione si possono apportare modifiche su più fronti.

La finezza della lavorazione del *disposable* potrebbe migliorare se le incisioni fossero eseguite mediante laser anziché incisione da fresa; questo garantirebbe superfici migliori e imperfezioni quasi nulle riducendo il rischio di formazioni di menischi tra liquido e aria causando la formazione di bolle indesiderate. Parallelamente si potrebbero realizzare microcanali più piccoli di quelli dell'attuale chip (500um) e quindi ridurre ulteriormente le dimensioni.

Il pilotaggio delle micropompe è effettuato utilizzando un segnale ad onda quadra; la scelta deriva dall'aver privilegiato i tempi di esecuzione delle fasi; infatti questo controllo permette una portata maggiore a parità di tensione applicata rispetto un segnale triangolare o sinusoidale.

Il PZT produce un suono (fastidioso) in modo direttamente proporzionale al fronte del segnale di pilotaggio dovuto alla velocità di deformazione del piezoelettrico.

Per evitare eccessivo rumore durante il funzionamento dello strumento si potrebbe pensare di utilizzare un segnale di comando delle pompe con un fronte più dolce come una senoide. Questo a discapito della velocità del processo.

Lo stadio di potenza è stato progettato inizialmente con scopi generici (general purpose) implementando solo due convertitori sulla stessa board; in realtà si potrebbero realizzare tutti e sei i boost sulla medesima scheda riducendo l'area di occupazione.

Nell'ottica dell'analisi effettuata sul campo al di fuori dei centri specializzati, un ulteriore sviluppo dello strumento sarebbe l'integrazione con uno altro dispositivo capace di effettuare l'analisi del campione di DNA.

Quindi il primo step riguarderebbe l'estrazione del campione puro dalla sostanza grezza (sangue o saliva); il secondo, sempre sullo stesso strumento interesserebbe la manipolazione dell'acido nucleico.

STMicroelectronics, azienda leader nel campo della microelettronica, lavora attualmente alla messa a punto di un sistema per la realizzazione della Real Time PCR su chip microfluidico utilizzando lo stesso principio di *disposable* trattato nel presente lavoro di tesi partendo, però, dal campione puro.

Pensando alla somma dei compiti svolti dallo strumento progettato per purificazione e da quello per analisi di DNA si può ipotizzare la realizzazione del sistema completo.

Bibliografia

Pubblicazioni e articoli

- [1] C. Zhang, D. Xing (2007) “*Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends.*” , Nucl. Acids Res., 2007, 35, 4223-4237.

- [2] Neuzil P., Pipper J., Hsieh T.M., “*Disposable real-time microPCR device: lab-on-a-chip at a low cost*”. *MolecularBioSystems*, 2, 292-298, 2006.

- [3] Fuchs, H. Jeanson, P. Claustre, J. A. Gruss, F. Revol-Cavalier, P. Caillat, U. Mastromatteo, M. Scurati, F. Villa, G. Barlocchi, P. Corona, B. Grieco, “*A silicon lab-onchip for integrated sample preparation by PCR and DNA analysis by hybridization*” , 2nd Annual International IEEE Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology, May 2-4 2002, Madison, Wisconsin USA.

- [4] Zhu W., Zhang W., “*Design and simulation of active biochip system*”. *Biomed Microdevices*, 7,157-160, 2005.

- [5] D J Laser and J G Santiago,” *A review of micropumps*” , Department of Mechanical Engineering, Stanford University, Stanford, CA 94305, USA

- [6] *Strain behavior of thin film PbZr_{0.3}Ti_{0.7}O₃ (30/70) examined through piezoforce microscopy* Nanotechnology, Cranfield University, Cranfield MK43 0AL, United Kingdom ,Dunn
- [7] Liu R.H., Yang J., Lenigk R., Bonanno J., Grodzinski P., "Self-Contained, Fully Integrated Biochip for Sample Preparation, Polymerase Chain Reaction Amplification, and DNA Microarray Detection", *Microfluidics Laboratory, Motorola Labs, Tempe, AZ 85284, United States; Ctr. for Appl. NanoBioscience Center, Arizona State University, Tempe, AZ 85287, volume 76, issue 7, 1824-1831.*
- [8] Travis Eichhorn, "Boost converter efficiency through accurate calculations", National Semiconductor, Grass Valley, California, 2008 September
- [9] Giovanni Privitera, "Power Mosfet Technical Training", STMicroelectronics, 2008.
- [10] L.J. Thomas, S.P. Bessman, "Micropump powered by piezoelectric disk benders", United States Patent, Jan. 1975
- [11] Ralph Locher, "Introduction to Power Mosfet and their application", National Semiconductors Application Note 558 December 1988.
- [12] Vrej Barkhordarian, "Power Mosfet's Basics, International Rectifier", El Secundo, CA,1990.

- [13] Tabeling, P. (2005). "*Introduction to Microfluidics*", Oxford University Press
- [14] Chang, H.C., Yeo, Leslie ,” *Electrokinetically Driven Microfluidics and Nanofluidics*”, Cambridge University Press.
- [15] Herold, KE; Rasooly, A., ”*Lab-on-a-Chip Technology: Fabrication and Microfluidics*”, Caister Academic Press.
- [16] Kirby, B.J, “*Micro and Nanoscale Fluid Mechanics: Transport in Microfluidic Devices*, Cambridge University Press.

Testi

- [17] F. Zappa, R. Zappa, “*Complementi di elettronica*” , Progetto Leonardo
- [18] S. Focardi, I. Massa, A. Uguzzoni, “*Fisica generale – Termodinamica e fluidi*”, Casa Editrice Ambrosiana.
- [19] Jacob Millman, Arvin Grabel, “*Microelettronica*”, McGraw-Hill.
- [20] P. Mazzoldi, M. Nigro, C. Voci, “*Fisica – Elettromagnetismo*” , EdiSES.

- [21] P. Bolzern, R. Scattolini, N. Schiavoni, “ *Fondamenti di controlli automatici* ” , McGraw-Hill.
- [22] Nguyen, N.T., Wereley, S. (2006), “ *Fundamentals and Applications of Microfluidics* ”. Artech House
- [23] Geschke, Klank & Telleman, “ *Microsystem Engineering of Lab-on-a-chip Devices* ”, 1st ed, John Wiley & Sons.
- [24] William P. Robbins, Ned Mohan, Tore M. Undeland,” *Elettronica di Potenza*”, Hoepli.
- [25] J.W. Gardner, V.K. Varadan, O.O. Awadelkarim, “ *Microsensors, MEMS and Smart devices* ” , Wiley
- [26] Karniadakis, G.M., Beskok, A., Aluru, N.,” *Microflows and Nanoflows*”. Springer Verlag

Risorse web

www.st.com

www.dolomite-microfluidic.com

www.bartels-mikrotechnik.de

www.channelindustries.com

www.microjet.com

www.debiotech.com

www.microrun.de

www.supermagnete.it

www.takasago-elec.com

www.microbase.com

www.scriba-nanotec.com

www.micronit.com

www.powerelectronics.com