



Unione Europea



Ministero dell'Istruzione
dell'Università e della Ricerca



Università degli Studi di
Palermo

Tesi Di Dottorato

**STUDIO DI SISTEMI COMPLESSI DI INTERESSE IN
FISICA APPLICATA TRAMITE DIFFERENTI
METODOLOGIE DI ANALISI**

Dottoranda

Rosita BARRACO

Tutor

Prof.ssa Maria BRAI

Coordinatore

Prof. Bernardo SPAGNOLO

Co-Tutors

Dott.ssa Dominique PERSANO ADORNO

Prof. Leonardo BELLOMONTE

SSD: Fis07

Università degli Studi di Palermo
Dipartimento di Fisica

Corso di DOTTORATO INTERNAZIONALE DI RICERCA
in FISICA APPLICATA (XXII CICLO) – 2011

A Davide

SOMMARIO

SOMMARIO.....	3
INTRODUZIONE	5
<u>CAPITOLO 1.....</u>	<u>9</u>
METODOLOGIE DI ANALISI UTILIZZATE.....	9
1.1 MODELLIZZAZIONE MATEMATICA	9
1.2 ANALISI WAVELET	12
1.2.1 DALLA TRASFORMATA DI FOURIER ALLA TRASFORMATA WAVELET	14
1.2.2 APPROCCIO TEORICO ALL'ANALISI WAVELET	18
1.3 ANALISI SPETTROSCOPICHE: XRF vs LIBS.....	25
1.4 CARATTERIZZAZIONE E RICOSTRUZIONE DI IMMAGINI	28
<u>CAPITOLO 2.....</u>	<u>31</u>
CASO STUDIO 1:L'ELETTRORETINOGRAMMA	31
2.1 CENNI DI FISIOLOGIA DELL'OCCHIO ED ELETTROFISIOLOGIA CELLULARE	32
2.2 L'ELETTRORETINOGRAMMA	34
2.2.1 MODALITÀ DI REGISTRAZIONE DELL'ERG.....	36
2.3 CARATTERISTICHE DEI FOTORECETTORI.....	38
2.4 MODELLI COMPUTAZIONALI DELL'ATTIVITÀ FOTORECETTORIALE :STATO DELL'ARTE.....	40
2.5 SIMULAZIONE NUMERICA DELL'ONDA A IN SOGGETTI SANI [28]	44
2.7 ANALISI WAVELET DELLA RISPOSTA FOTORECETTORIALE DI SOGGETTI SANI [42, 43] 57	
2.8 ANALISI WAVELET DELLA RISPOSTA FOTORECETTORIALE PATOLOGICA [48-49]	67
2.9 ANALISI WAVELET DELLA RISPOSTA FOTORECETTORIALE: CONSIDERAZIONI FINALI 77	
<u>CAPITOLO 3.....</u>	<u>79</u>
CASO STUDIO 2: MATERIALI METALLICI E LORO DEGRADO	79

3.1	LA CORROSIONE: UNA PATOLOGIA DEI METALLI	80
3.2.	PARAMETRI STRUMENTALI XRF E LIBS	82
3.3.	ANALISI DEI PRODOTTI DI CORROSIONE SU CAMPIONI BRONZEI [68-70]	85
3.4	CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE.....	94
<u>CAPITOLO 4.....</u>		96
CASO STUDIO 3: STRUTTURE POROSE E LORO DINAMICHE FENOMENOLOGICHE		96
4.1	I SISTEMI POROSI ED IL FENOMENO DELLA RISALITA CAPILLARE: I MODELLI	96
4.4	MICRO-TOMOGRAFIA COMPUTERIZZATA (μ -TC) PER LO STUDIO DI ROCCE SEDIMENTARIE [96]	110
<u>CONCLUSIONE</u>		118
RINGRAZIAMENTI		121
<u>APPENDICE 1.....</u>		122
BIBLIOGRAFIA		123

INTRODUZIONE

Molto spesso lo studio di sistemi fisici di qualsiasi natura è accompagnato dall'analisi dei segnali da essi generati, spontaneamente o in seguito ad una sollecitazione esterna. L'importanza di tali segnali, nell'ambito di ricerche mirate all'approfondimento della conoscenza dei sistemi di generazione noti o all'acquisizione di informazioni riguardanti peculiarità di funzionamento non ancora comprese, risiede nella loro potenzialità di descrivere i processi interni al sistema attraverso modalità il più possibile non invasive.

Dal punto di vista fisico, una qualsiasi grandezza, solitamente variabile nel tempo, alla quale può essere associata un'informazione, può definirsi segnale. Svariati possono esserne gli esempi, ognuno caratterizzato da peculiarità specifiche: segnali elettrici, segnali acustici (brani musicali, il suono della voce, suoni in generale di qualsiasi origine...), immagini, onde elettromagnetiche. Dal punto di vista matematico, d'altro canto, un segnale può essere rappresentato mediante una funzione di una o più variabili, continua o discreta. Questa rappresentazione conduce ad una trattazione matematica o ad una tipologia di analisi e/o *processing* mirata ad approfondire le informazioni contenute nel segnale, inquadrato nel contesto di generazione di quest'ultimo. In tal modo, "guardare dentro" le strutture di interesse si traduce nell'analizzare e processare i relativi segnali attraverso tecniche di analisi specifiche.

Le tecniche d'indagine per lo studio di segnali prodotti da strutture complesse si differenziano in funzione dalla tipologia di informazioni da acquisire. E', infatti, possibile, condurre studi sull'andamento temporale di un segnale tramite approcci di tipo analitico/matematico oppure attraverso l'uso di apparati strumentali dedicati. Svariate sono le metodologie utilizzabili. Qualora si intenda condurre delle analisi mirate la scelta e le modalità di utilizzo, condizionate fortemente dalle caratteristiche dei segnali, assumono un'importanza cruciale.

Questa tesi presenta l'applicazione di alcune di queste metodologie matematico/fisico e di spettroscopia allo studio di segnali ed immagini provenienti da sistemi complessi di interesse in fisica applicata. In particolare viene sviluppato un approccio analitico per lo studio e l'analisi di un segnale biomedico, l'elettroretinogramma (ERG), che riproduce la risposta della retina ad uno stimolo luminoso; viene, poi, affrontato lo studio di due sistemi di natura inorganica (leghe bronzee e strutture porose) attraverso lo studio di segnali spettroscopici.

Il primo capitolo è dedicato alla presentazione delle metodologie di analisi utilizzate per lo studio delle strutture complesse scelte come casi studio di questa tesi. In particolare vengono illustrate la modellizzazione numerica, la trasformata wavelet per l'estrazione di caratteristiche tempo-frequenza intrinseche al sistema, alcune tecniche spettroscopiche appropriate per la caratterizzazione composizionale dei materiali e l'analisi di immagini provenienti da Tomografia Computerizzata (TC) per lo studio di strutture porose.

Il capitolo successivo è dedicato alla trattazione del primo caso studio: l'analisi del segnale elettroretinografico di soggetti sani dal punto di vista elettro-oculare (normali) e di pazienti affetti da specifiche patologie fotorecettoriali. Vengono introdotte alcune generalità inerenti la fisiologia e riassunte le conoscenze acquisite. In particolare si accenna alle modalità di registrazione ed ai modelli più accreditati che descrivono il processo di fototrasduzione da cui il segnale ha origine. I biosegnali hanno da sempre riscosso notevole interesse nella comunità scientifica, sia perché forniscono una descrizione immediata di processi biologici e/o fisiologici, altrimenti di difficile investigazione in maniera non invasiva, sia per la crescente necessità di mettere a punto sistemi di processamento in grado fornire informazioni di valenza funzionale e diagnostica.

Le strutture biologiche e i sistemi fisiologici si differenziano dalla materia per la loro costituzione complessa e per la natura delle loro risposte a sollecitazioni esterne, caratterizzate da comportamenti dinamici interni. In particolare, segnali di natura biologica, come pure quelli di origine biomedica, hanno peculiarità complesse derivanti dalla molteplicità dei processi coinvolti nei loro meccanismi di generazione. In sintesi, un sistema biologico non è la semplice somma delle sue parti, e le sue proprietà derivano dall'integrazione combinata e non dalla sommatoria delle proprietà degli elementi che lo costituiscono, come nel caso della materia inorganica. La complessità e diversificazione dei meccanismi di generazione, che coinvolgono le svariate unità, sia spontaneamente, sia su sollecitazione, è all'origine della natura composita dei bio-segnali. Pertanto, essi contengono importanti informazioni sia sull'integrità funzionale del sistema sorgente, sia sulla modalità di generazione della risposta. A questo scopo, l'uso di un approccio matematico-simulativo, che prevede l'interpolazione dei segnali con funzioni in grado di descrivere dinamiche complesse di interazione e/o correlazione, può rivelarsi un utile strumento di analisi, permettendo l'acquisizione di informazioni utili ad approfondire le dinamiche fotorecettoriali.

Poiché la risposta a stimoli esterni è, in generale, dipendente dal tempo, l'indagine spettroscopica con le tecniche analitiche usuali (p.e. analisi di Fourier) risulta insufficiente e si rende necessario utilizzare altre tecniche in grado di processare anche segnali non stazionari.

Numerosi studi hanno proposto l'applicazione dell'analisi wavelet (WA) a diversi segnali biomedici, come l'elettrocardiogramma (ECG), l'elettroencefalogramma (EEG), l'elettromiografia (EMG). In tutti questi casi, l'uso della WA ha fornito informazioni rilevanti sulle caratteristiche tempo-frequenza del segnale e su eventuali malattie incipienti. La nostra analisi ha confermato che l'uso delle trasformate wavelet risulta il più adeguato sia nello studio dei tracciati normali, sia di quelli patologici.

Il terzo capitolo presenta il secondo caso studio: l'analisi dei prodotti di degrado, indotti su campioni bronzei. Per ottenere informazioni sulla caratterizzazione (composizionale o strutturale) della materia è necessario stimolarlo opportunamente e dopo acquisire la risposta (denominata in seguito segnale) del sistema. Anche in questo caso, sono state scelte tecniche di indagine non invasive, in grado di non alterare le dinamiche di risposta e di produrre segnali qualitativamente e quantitativamente significativi. Tali tecniche, attraverso misure dell'intensità e del tipo di interazione tra la materia e la radiazione elettromagnetica, permettono di ottenere informazioni di tipo *qualitativo* per identificare elementi o composti chimici e/o *quantitativo* per determinarne la concentrazione nei campioni analizzati.

Tale attività di ricerca, supportata dal Ministero italiano per l'Università e la Ricerca Scientifica attraverso il finanziamento del progetto PRIN 2007 "Optimization of integrated physical techniques of X-ray spectrometry, laser and electron spin for the study of corrosion processes on surface and volume of metals and alloys", è stata svolta all'interno del *Laboratorio di Tecniche Fisiche per lo studio e la caratterizzazione dei Beni Culturali* del DiFTeR. Essa è stata finalizzata alla caratterizzazione fisica di svariate tipologie di campioni, mediante l'uso integrato di due tecniche spettroscopiche: la fluorescenza a raggi X (XRF) e la spettroscopia per ablazione laser (LIBS).

Tramite la fluorescenza a raggi X, entro alcuni limiti strumentali, è possibile identificare in maniera non invasiva, sia gli elementi maggioritari ed in tracce costituenti i campioni, sia quelli derivanti da eventuali stati di degrado. Informazioni complementari possono essere acquisite grazie a indagini LIBS in grado di caratterizzare elementi chimici con basso Z, non rivelabili con la fluorescenza X, oltre che analizzare materiali anche di natura organica. Tale tecnica d'indagine è in grado di fornire dati su un'eventuale differenziazione stratigrafica della composizione dei campioni analizzati. Queste due tecniche, quindi, grazie alla complementarietà dei loro risultati, si rivelano un utile strumento d'indagine sia per il reperimento di informazioni utili per la caratterizzazione chimica di differenti tipologie di materiali, sia per lo studio diagnostico dei beni culturali. L'uso integrato dei dati ottenuti

dall'impiego delle tecniche spettroscopiche ora citate ha fornito, nell'ambito dei casi studio di seguito riportati, una chiave interpretativa degli elementi caratterizzanti i materiali indagati attraverso la messa a punto di procedure analitiche *ad hoc*.

Oggi, molti metodi fisici di diagnosi medica sono sempre più frequentemente applicati in altri settori scientifici. Tra questi la X-ray Tomografia Computerizzata (TC) sta mostrando le sue potenzialità multidisciplinari, grazie al fatto di essere una potente tecnica di indagine non distruttiva in grado di fornire informazioni morfologiche e fisiche sulla sua struttura interna di un oggetto. La TC è una tecnica che produce, attraverso l'impiego dei raggi X e con l'integrazione di un opportuno sistema elettronico di acquisizione, immagini digitali di strati a spessore variabile basate sulla misurazione della densità delle strutture analizzate. Tali immagini, recuperate come immagini 2D di sezioni trasversali o immagini 3D dell'intero volume, consentono una completa analisi volumetrica e la classificazione degli oggetti. Inoltre, mediante il trattamento dei dati tomografici, può essere ottenuto un modello numerico 3D del campione finalizzato a qualsiasi applicazioni di rappresentazione virtuale. Tuttavia sono presenti limitazioni che non permettono l'utilizzo della strumentazione TC standard ai fini della caratterizzazione morfologica di strutture con caratteristiche dimensionali alla risoluzione spaziale. Tale complicazione può essere superata solo con una la risoluzione spaziale molto inferiore alle dimensioni strutturali, condizione raggiungibile per mezzo della *micro-tomografia computerizzata* (μ -TC). L'utilizzo della microtomografia computerizzata consente di acquisire informazioni più complete sulle strutture, sia superficiali, sia interne, dando un contributo per una migliore caratterizzazione microstrutturale di tali oggetti. La microtomografia computerizzata, basata fondamentalmente sullo stesso principio della TC medica, fornisce immagini ad alta risoluzione dalla cui analisi, effettuata con un software specifico, è possibile ricavare informazioni circa la porosità, le misure di superficie e 3D, la dimensione dei pori, e la loro connessione.

Il quarto ed ultimo capitolo mostra un'applicazione di entrambe queste tecniche al terzo caso studio: l'analisi delle strutture porose. Con l'obiettivo, infatti, di studiare la dinamica di risalita capillare all'interno di rocce sedimentarie in funzione della loro caratterizzazione porosa, sono state analizzate immagini ottenute tramite Tomografia Computerizzata a Raggi X, effettuate su campioni di rocce sedimentarie prelevate da cave siciliane di interesse archeologico (Agrigento, Cusa e Noto). Tale studio è stato supportato da misure gravimetriche effettuate sui campioni in analisi. Le informazioni circa la micro caratterizzazione delle strutture porose (la dimensione dei pori e le loro connessioni) sono state ottenute da analisi microtomografiche.

CAPITOLO 1

METODOLOGIE DI ANALISI UTILIZZATE

In theory, theory and practice are the same. In practice they are not.

A. Einstein

Il presente capitolo espone le metodologie utilizzate per studiare ed analizzare le strutture complesse di interesse fisico scelte come oggetto di questa tesi. In particolare, l'attenzione è rivolta alla modellizzazione matematica attraverso la simulazione numerica, all'uso di tecniche wavelet per l'estrazione di caratteristiche intrinseche al sistema, all'uso di tecniche spettroscopiche strumentali per la caratterizzazione composizionale dei materiali, allo studio di fenomenologie fisiche attraverso l'analisi di immagini TC.

1.1 MODELLIZZAZIONE MATEMATICA

La ricerca e lo studio di modelli matematici sono ormai diventati elementi costitutivi di tutte le Scienze Applicate. Il termine *modello*¹ è infatti usato in molteplici accezioni per indicare una rappresentazione di fenomeni o processi di qualsiasi natura nei loro aspetti essenziali anche dal punto di vista quantitativo.

¹ Un modello dal latino *modulus* (diminutivo di *modus*, misura) è un oggetto o un concetto utilizzato per rappresentare qualcos'altro.

Per quanto concerne la relazione che esiste fra un modello e una teoria, i modelli vengono considerati il primo stadio di una indagine mirata ad una più approfondita conoscenza del fenomeno in esame. Per quanto riguarda i loro risvolti puramente applicativi, i modelli rappresentano la formalizzazione di opportune ipotesi di lavoro circa fenomenologie solo parzialmente comprese attraverso relazioni matematiche. In questo senso, si suole distinguere tra *modelli dinamici* che esprimono la variabilità o evoluzione nel tempo del comportamento di un sistema fisico, e *modelli statici* quali, ad esempio, la semplice Legge di Hooke in un certo istante temporale.

I modelli, dunque, possono considerarsi una rappresentazione sintetica del fenomeno, cioè una rappresentazione priva di dettagli e particolari superflui all'analisi intrapresa ma che evidenzia gli aspetti di maggiore interesse.

Nella loro impostazione generale essi devono essere ricchi di concetti e informazioni di contenuto fisico fondamentale; ciò non solo per quanto concerne la descrizione di fatti noti ma anche per la previsione del comportamento dei sistemi complessi difficilmente o non direttamente osservabili. Generalmente, il modello dà una descrizione dell'evoluzione probabile di un sistema fisico a partire dalla conoscenza delle condizioni iniziali. Per tutte le loro caratteristiche, i modelli, dal punto di vista applicativo costituiscono gli strumenti primari per simulare tali fenomeni.

Attualmente, la simulazione computazionale è considerata un potente strumento per modellizzare quei fenomeni nei quali non solo è importante spiegare i meccanismi di base ma anche predire le risposte del sistema a differenti condizioni sperimentali.

Sebbene questo approccio matematico sia ampiamente usato in fisica ed ingegneria, dove la schematizzazione di un processo tramite il formalismo matematico è immediata, in medicina ed in biologia questo non è sempre possibile. I processi fisiologici e/o biologici, infatti, sono spesso composti a causa della complessità nascosta nelle reti di interazione esistenti tra le diverse unità attive costituenti il sistema. Per superare questo inconveniente i modelli generalmente usati sono in grado di descrivere i dati sperimentali in assenza di dati teorici. In questo contesto, la difficoltà di eseguire accurate misure e l'incompleta conoscenza degli eventi coinvolti nel processo, rendono abbastanza complessa l'implementazione del modello.

Nel caso di modelli matematici ottenuti traducendo matematicamente le leggi fisiche e chimiche coinvolte nel sistema in analisi si parla di *modelli di conoscenza*. Nel caso, invece, in cui,

ignorando i meccanismi intrinseci al sistema, vengono proposte delle equazioni da “affinare” mediante un processo di identificazione a partire dai dati sperimentali, si parla di *modelli di simulazione* (black box). Nella pratica reale ci si trova nella situazione intermedia e per questa ragione, vengono spesso utilizzati modelli statistici che implicano la costruzione di relazioni matematiche tra le variabili coinvolte, sebbene queste relazioni non siano, in generale, una descrizione ma, una rappresentazione matematica dei meccanismi di base. La formulazione di modelli in grado di descrivere questi fenomeni è di interesse generale, in quanto consente la parametrizzazione delle caratteristiche rilevanti ed evita le procedure che caratterizzano le indagini obiettive.

L’elaborazione di un modello richiede, inoltre, l’uso di metodi statistici (analisi dei dati) per mettere in evidenza le variabili significative. Tra le tecniche di caratterizzazione statistica nel caso di processi biologici la *cluster analysis* è molto importante, in quanto permette di suddividere i soggetti in gruppi (clusters) omogenei in base a prefissati parametri. La costruzione di un modello, o analogamente la scelta di una funzione in grado di simulare il fenomeno, può sintetizzarsi in alcuni steps:

1. Determinare le variabili da osservare. In un approccio di tipo classico le variabili corrispondono alle ipotesi che si devono testare, in un approccio cosiddetto *data-driven*, tali variabili sono legate al fenomeno che si vuole modellizzare.
2. Raccogliere il maggior numero di dati possibili;
3. Analizzare i dati raccolti e rimuovere quelli ritenuti non attendibili secondo i noti criteri statistici;
4. Scegliere un modello descrivente le relazioni importanti rilevate o ipotizzate nei dati;
5. Fittare i dati sperimentali con il modello o con la funzione scelta;
6. Esaminare il fit alla luce dei parametri statistici convenzionali;
7. Ripetere gli *steps* 4-6 fino ad ottenere un’ottima aderenza del modello ai dati sperimentali.

Esistono una o più funzioni che possono essere associate ad un modello e rappresentarlo, gli obiettivi della ricerca forniscono in generale i criteri per una scelta particolare. La bontà di un modello è determinata dal grado di aderenza di una di queste funzioni ai dati sperimentali. Nella scelta delle funzioni, è conveniente prendere in considerazione famiglie di funzioni che dipendono da un parametro di forma. Questa procedura ha il vantaggio di migliorare le prestazioni della funzione e la sua flessibilità: infatti, a seguito di una appropriata variazione del parametro di forma, la stessa funzione è in grado di

descrivere fenomeni governati da leggi di distribuzione diversa, come eventi casuali e/o indipendenti o addirittura eventi correlati.

Nel corso della tesi si vedrà come, la conoscenza di funzioni note in ambiti diversi della fisica, possono rivelarsi un utile ausilio per la descrizione di fenomeni di natura fisiologica che scaturiscono da una complessa interazione tra le numerosi componenti del sistema e con l'ambiente esterno. La complessità di un processo fisiologico, il fatto che la sua dinamica può essere considerata risultato di un comportamento non lineare derivante da intricate interazioni intrinseche ed esterne al sistema, richiedono per una sua adeguata descrizione formale la formulazione di modelli matematici che permettono di ridurre il campo ad un numero limitato di variabili ed interazioni. Il rischio di tale modellizzazione è quello di trascurare variabili importanti. Purtuttavia tale eventualità può essere evitata dai test di aderenza dei risultati della simulazione ai dati sperimentali e alla capacità che avrà il modello, o la funzione scelta, di fornire informazioni per guidare verso modelli sempre più attendibili.

1.2 ANALISI WAVELET

Un processo fisico descritto da una certa quantità x in funzione del tempo t , ossia $x(t)$, può essere rappresentato nel dominio delle frequenze, da una certa quantità X in funzione della frequenza f , ossia $X(f)$. In modo analogo, un processo fisico descritto dai valori assunti da una certa quantità y in funzione della posizione r , ossia $y(r)$, può essere rappresentato dai valori assunti da una certa quantità Y in funzione dell'inverso della lunghezza d'onda, ossia $Y(1/\lambda)$. Nell'ambito del *processing* ed analisi dei segnali può rivelarsi, dunque, vantaggioso “trasformare” un segnale, descritto nel dominio temporale, in uno rappresentato nel dominio delle frequenze. Lo scopo della trasformata di un segnale, strumento matematico comunemente usato, è proprio quello di tradurre una funzione matematica, o un segnale fisico, da un dominio ad un altro per rivelarne informazioni intrinseche che potrebbero, altrimenti, non essere evidenti. A questo punto resta da decidere quale delle due rappresentazioni sia la più conveniente per gli scopi prefissati dall'analisi del segnale.

Il presente paragrafo consta di una prima parte riguardante un breve excursus storico e di pensiero che ha condotto alla formulazione della trasformata wavelet a partire dalla ben

nota trasformata di Fourier. Segue una parte riassuntiva dedicata alla teoria ed alle proprietà delle funzioni wavelet.

The Fourier Transform

*One day in a land far away
Some mathematicians at play
Found a transform of convenient form
The basis of physics today.
Convolving would wreck people's brains
Still the advent of Fourier domains
for convolving in one
means multiplication
in the corresponding domain.
Got trouble with an ODE?
Fourier transforms will set you free
When once you would cry,
You now multiply,
by a constant times the frequency.
Fourier transforms backwards and forth
I hope that you now see their worth
For in every domain
Advantages reign
Fourier was the salt of the earth.*

by Luke Krieg

Posted to sci.physics, 11 Sep 2000

1.2.1 DALLA TRASFORMATATA DI FOURIER ALLA TRASFORMATATA WAVELET

La trasformata di Fourier è probabilmente, ancora oggi, la tecnica più diffusa ed applicata, in ambito scientifico e tecnologico, per analizzare segnali di qualsiasi origine e natura. Essa consiste in una trasformazione dal dominio del tempo al dominio delle frequenze. La trasformata di Fourier (FT) si basa sulla serie di Fourier, potente strumento per descrivere una funzione attraverso sommatorie di seni e coseni, il cui limite principale è l'applicabilità a funzioni periodiche. L'idea² originaria di scrivere una funzione come somma di seni e coseni nasce da Fourier³. Nella *Teoria Analitica del Calore*⁴, (*Theorie analytique de la chaleur*, 1822), Fourier studiò il problema della diffusione del calore, trovando le leggi fisiche e scrivendo l'equazione che governa il fenomeno. Per risolvere tale equazione, Fourier propose di rappresentare ogni funzione su un intervallo limitato come combinazione lineare di funzioni seno e coseno associate a frequenze multiple intere di una frequenza fondamentale. La trasformazione secondo Fourier della funzione $x(t)$ è indicata con il simbolo $FT\{x(t)\}$ o, equivalentemente, $X(f)$. Dato un segnale $x(t)$, la trasformata di Fourier è definita come:

$$FT\{x(t)\} = X(f) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t)e^{-j2\pi ft} dt \quad 1.1.1$$

e l'antitrasformata di Fourier è definita:

$$FT\{x(t)\}^{-1} = \int_{-\infty}^{+\infty} X(f)e^{j2\pi ft} df \quad 1.1.2$$

Nonostante l'evidente rivoluzione matematica nell'ambito del *processing* di segnali, l'analisi di Fourier, purtroppo non risponde a tutte le esigenze derivanti dalle diverse possibilità con cui

² Tale idea generò grande scalpore e innumerevoli controversie. In particolare, Lagrange sosteneva che fosse impossibile riprodurre segnali con angoli, ossia funzioni con punti di discontinuità, come ad esempio le onde quadre.

³ Joseph Fourier matematico francese (Auxerre 21 Marzo 1768-Parigi 16 Maggio 1830), il cognome Fourier è una deformazione di *fourrier*, che significa “furiere” in senso militare e, in senso letterario, “precursore”, anticipatore.

⁴ Nel 1807, Fourier inviò, per la pubblicazione, la sua famosa Memoria *La Théorie analytique de la chaleur* all'Istituto di Francia. Nel 1810, la ripresentò ampliata vincendo il *gran premio* per la Matematica bandito dallo stesso Istituto. La motivazione sottolineava la “*novità e importanza dell'argomento*” ma osservava anche che “*la trattazione lasciava qualcosa a desiderare per quanto attiene alla generalità e anche al rigore.*” Per la pubblicazione della Memoria, Fourier dovrà aspettare fino al 1822.

una funzione può presentarsi. In taluni casi, infatti, le sue limitazioni analitiche rendono non sempre possibile la sua applicazione in quanto:

-  Poco adeguata per analizzare funzioni poco oscillanti;
-  Non applicabile quando le proprietà statistiche di un segnale (es. valore medio) variano con il tempo;
-  Non adatta a segnali non-stazionari, spesso incontrati in applicazioni reali, perché le funzioni base (vale a dire, una serie di funzioni seno e coseno) utilizzati per la trasformata di Fourier si estendono su un intervallo infinito di tempo;
-  Riproduce gli eventuali errori locali di $x(t)$ su tutta la $X(f)$;
-  Descrive la funzione $x(t)$ solo nel dominio delle frequenze non fornendo simultaneamente informazioni tempo-frequenza;
-  Non permette lo studio di problemi non lineari poiché piccole variazioni dei valori in ingresso possono avere grandi ripercussioni in uscita.

La trasformata di Fourier è, dunque, uno strumento adatto allo studio dei segnali stazionari, in cui tutte le frequenze hanno un tempo di coerenza infinito, in quanto rivela informazioni di carattere globale, non sufficienti a determinare le caratteristiche peculiari relative a particolari istanti temporali.

Il principio alla base di questo problema può essere illustrato dal noto Principio di Indeterminazione di Heisenberg. Nel 1927, il fisico Werner Heisenberg provò che due variabili coniugate di un oggetto (es. posizione e velocità, tempo e frequenza) non possono essere misurate simultaneamente con esattezza. In termini di elaborazione di un segnale, questo implica che è impossibile determinare ad un dato istante la sua frequenza esatta. La precisione nella determinazione di un valore di frequenza aumenta all'aumentare del tempo di osservazione del segnale.

Il primo riferimento storico alle wavelet risale al XX secolo, e precisamente alla dissertazione "Sulla teoria del funzionamento dei sistemi ortogonali" scritta da Haar nel 1909 [2]. Dalle ricerche su sistemi ortogonali di funzioni ha origine un insieme di funzioni di base, di forma rettangolare. La più semplice famiglia wavelet sviluppata fino ad oggi, nota come *famiglia di Haar*, è basata su questo insieme di funzioni. Le potenzialità della funzione di base di Haar vennero ben presto scoperte dal fisico Paul Levy che, durante il suo studio del moto browniano (1930), si accorse che tale funzione era più adatta delle funzioni di base di Fourier per studiare i minimi dettagli di tale moto. La motivazione era da ricercarsi proprio nella sua

proprietà di poter essere scalata in intervalli differenti e nella sua capacità di poter fornire maggiori dettagli nella ricostruzione rispetto alle funzioni di base di Fourier caratterizzate da un solo intervallo $[-\infty, +\infty]$.

I decenni successivi furono segnati dal contributo di importanti scienziati come John Littlewood, Richard Paley, Elias M. Stein, e Norman H. Ricker, che si distinsero per aver stimolato e promosso lo sviluppo della ricerca in questo ambito. Tra questi, John Littlewood e R. Paley svilupparono un metodo di raggruppamento in ottave delle frequenze, creando un segnale ben localizzato in frequenza (il suo spettro si trova all'interno di una ottava) e anche relativamente ben localizzato nel tempo.

Nel 1946 Dennis Gabor [1] introdusse una analisi di Fourier locale, elaborando la *trasformata di Fourier a breve termine* o *Short Time Fourier Transform* (STFT), una trasformata in grado di analizzare sia il tempo sia la frequenza. L'idea di base di questa tipo di trasformata è di applicare la trasformata di Fourier a intervalli di funzioni racchiusi in una finestra che può traslare nel tempo. In tal modo, è possibile avere un'informazione sulla localizzazione temporale di una certa frequenza (risoluzione costante in frequenza). La *Short Time Fourier Transform* (STFT) è così definita:

$$\text{STFT}_x(\tau, f) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) g(t - \tau) e^{-j2\pi ft} dt \quad 1.1.3$$

La funzione “finestra” (*window*) $g(t-\tau)$, moltiplicata per il segnale $x(t)$, permette di ottenere porzioni del segnale, rendendo locale la trasformazione. Con questa nuova trasformazione si rivela lo spettro del segnale all'interno della finestra temporale definita dalla funzione $g(t-\tau)$ e si ottiene un'informazione circa il suo contenuto armonico in un intorno dell'istante di tempo τ . Questo approccio, benché molto semplice, ha un inconveniente tutt'altro che trascurabile: moltiplicare nel dominio temporale il segnale $x(t)$ per la *window* $g(t)$ equivale ad effettuare la convoluzione dei loro spettri $X(f)$ e $G(f)$ nel dominio della frequenza.

La STFT fornisce, quindi, lo spettro del segnale alterato dalla presenza della finestra. Purtroppo, tale artefatto non è eliminabile; se si vuole ridurre l'effetto di $G(f)$ occorre ridurre la banda Δf , ma ciò implica un aumento dell'ampiezza temporale Δt e quindi una diminuzione della risoluzione temporale, nel senso che due eventi separati da un valore inferiore di Δt non sono più discriminabili. Viceversa, se si riduce la finestra Δt aumenta la banda Δf e quindi si ha una diminuzione nella risoluzione in frequenza.

Tale trasformata è dunque applicabile solo a situazioni in cui il tempo di coerenza è indipendente dalla frequenza, come può essere per esempio il caso dei segnali derivanti dal “canto” che hanno il loro tempo di coerenza determinato dalla geometria della cavità orale.

Nonostante i numerosi contributi, la pietra miliare fu quella posta da Jean Morlet a metà degli anni 70, che sviluppò la tecnica di *scaling* e traslazione della finestra nell’ambito dello studio degli echi acustici, condotto per una compagnia petrolifera. Morlet, ingegnere dell'Elf-Aquitaine, sperimentò il suo modo di analizzare i segnali sismici creando componenti localizzate nello spazio, che egli chiamò "wavelet di forma costante" che successivamente sarebbero state conosciute come "wavelet Morlet." Tali componenti sia che fossero dilatate, compresse o traslate nel tempo mantenevano la stessa forma. Nacque così l’era delle wavelet. La conferma matematica che le onde potevano essere ricostruite dalle loro scomposizioni wavelet si ebbe grazie alla collaborazione di Morlet con Grossmann (fisico al Centre de Physique Teorica a Marsiglia). Nel 1984 [3], Yves Meyer [4] suggerì un nuovo tipo di wavelet, con una proprietà matematica, detta *ortogonalità*, che ha reso la trasformata wavelet semplice da elaborare e gestire quanto una trasformata di Fourier ("Ortogonalità" significa che le informazioni catturate da una wavelet sono completamente indipendenti delle informazioni acquisite da un'altra).

Nel 1986, Stéphane Mallat [5], un ex studente di Meyer, nel suo lavoro di tesi di dottorato *Digital Signal Processing* introdusse l'idea di analisi in multirisoluzione, cioè guardare i segnali in diverse scale di risoluzione, cosa già nota agli esperti in elaborazione delle immagini. La vera consacrazione della teoria delle wavelet si deve a Daubechies [6, 7], che nel 1987 scoprì una nuova classe di wavelet, che non solo erano ortogonali ma che avrebbero potuto essere implementate utilizzando semplici filtri digitali. Questa nuova classe di wavelet era quasi altrettanto semplice da programmare e utilizzare come le wavelet Haar, ma con la proprietà di essere *smooth*.

Da qui in poi, le trasformate wavelet non hanno subito rallentamenti e rappresentando uno dei più versatili approcci matematici all’analisi di segnali ed immagini di qualsiasi natura.

1.2.2 APPROCCIO TEORICO ALL'ANALISI WAVELET

L'applicazione di una trasformata matematica all'analisi di un segnale generico è una strategia utile per ottenere informazioni non direttamente desumibili dal diagramma temporale. La descrizione di un segnale nel dominio del tempo, infatti, non è sempre sufficiente per un'analisi accurata, dal momento che le informazioni riguardanti il suo contenuto di frequenza sono nascoste. La WA prevede la rappresentazione tempo-frequenza del segnale attraverso l'uso di funzioni (wavelet) localizzate sia nel tempo che in frequenza [6-11]. Tale analisi rappresenta quindi, un potente strumento per descrivere la dinamica di sistemi complessi non lineari, caratterizzati da interazioni e correlazioni nel frame spazio-tempo.

Matematicamente la trasformata wavelet può essere vista come un'estensione della trasformata finestrata di Fourier o STFT ma, a differenza di quest'ultima in cui la dimensione della finestra rimane costante, la trasformata wavelet usa una finestra a dimensioni variabili per analizzare le differenti componenti in frequenza del segnale. Più chiaramente, si può immaginare di rappresentare contemporaneamente il segnale nei due domini utilizzando una griglia di lati $\Delta\omega \cdot \Delta\tau$, che definiscono le celle di Heisenberg nel piano tempo-frequenza. Nel caso della STFT la finestra fissa obbliga le celle di Heisenberg a mantenere dimensioni costanti lungo il piano tempo-frequenza (Figura 1.2.1a) nonostante il numero di oscillazioni possa essere variabile. Una finestra di dimensioni fisse ha lo svantaggio di potersi rivelare troppo ridotta per le basse frequenze o troppo grande per alte frequenze e dunque perdere l'informazione inerente l'intero intervallo o quella relativa ad un eventuale brusco e repentino cambiamento nel segnale.

Le celle di Heisenberg, associate alla funzione wavelet, cambiano forma nel piano tempo-frequenza diventando alte e strette alle alte frequenze per catturare i minimi dettagli, e basse e larghe a frequenze più basse (Figura 1.2.1d). Come conseguenza della relazione di indeterminazione di Heisenberg, la WA dà una buona risoluzione temporale ed una scarsa risoluzione di frequenza per piccoli valori del parametro di scala (alte frequenze), mentre fornisce una buona risoluzione in frequenza ed una insufficiente risoluzione temporale a grandi scale (basse frequenze). Grazie alla variabilità della finestra, possono essere osservati dettagli non rivelabili con le metodologie d'analisi convenzionali. Infatti, la caratteristica peculiare dell'analisi wavelet è proprio quella di avere un livello di dettaglio progressivamente crescente, da una visione d'insieme ad un effetto zoom, da cui nasce la ormai diffusa definizione di microscopio matematico. Questo risultato viene ottenuto impiegando famiglie

di wavelet, generate da una singola funzione (wavelet madre), attraverso operazioni di scalatura (dilatazione o contrazione della wavelet madre) e traslazione (spostamento della wavelet madre in posizioni diverse per ogni valore di scala e senza cambiarne la forma). Ogni operazione viene controllata dal parametro di scala σ , legato alla banda di frequenza, e dal parametro di traslazione τ , legato alla posizione temporale.

Le trasformate wavelet possono presentarsi in due versioni: ed una continua (CWT) con cui è possibile analizzare segnali complessi di qualsiasi origine [11-15] per estrarne peculiarità e caratteristiche (punti di stazionarietà, singolarità, distribuzione temporale delle frequenze, etc.) ed una discreta (DWT) utilizzata spesso nel *denoising* di segnali ed immagini.

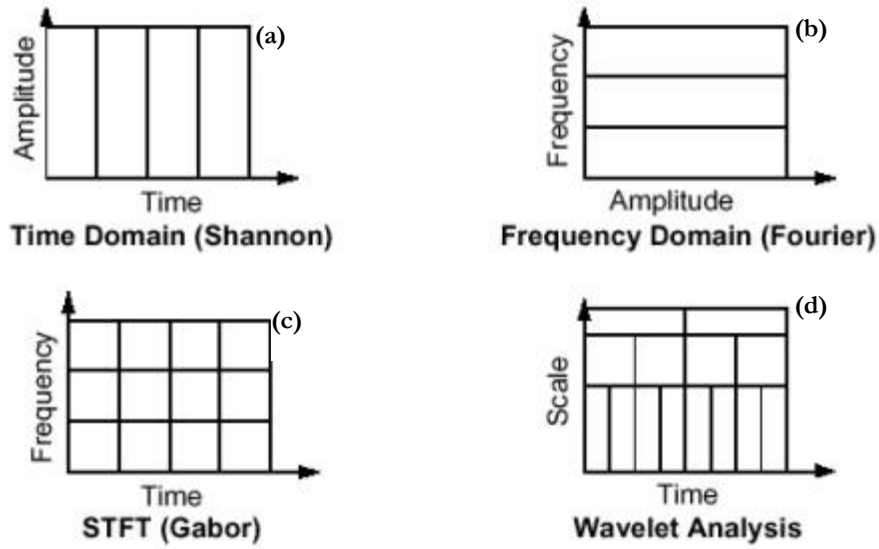


Figura 1.2.1. Celle di Heisenberg: (a) celle nel dominio temporale, (b) nel dominio della frequenza (Fourier), (c) a dimensione costante per la STFT; (d) celle alte e strette in corrispondenza di alte frequenze e basse e larghe in corrispondenza delle basse.

Nella CWT, il segnale da analizzare viene abbinato e convoluto con la funzione di base wavelet ad incrementi continui di tempo e di frequenza. Come risultato, il segnale originale è espresso come un integrale ponderato della base continua di funzione wavelet. I coefficienti della trasformata wavelet continua possono essere calcolati secondo la formula:

$$WT(\tau, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{\sigma}} \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) \psi^* \left(\frac{t - \tau}{\sigma} \right) dt \quad 1.3.1$$

dove $x(t)$ è il segnale da analizzare e ψ è la funzione wavelet scelta.

Tali coefficienti, calcolati per un certo valore di σ e τ , misurano la correlazione tra la funzione wavelet e la forma del segnale in quell'istante.

Non tutte le funzioni possono essere utilizzate nella eq. 1.3.1 come probabili wavelet; ciò è possibile solo nel caso in cui tali funzioni soddisfino alcuni criteri matematici. Di seguito sono elencate le proprietà essenziali che definiscono i requisiti necessari ad una wavelet ψ .

 Avere un'energia finita:

$$E = \int_{-\infty}^{+\infty} |\psi(t)|^2 dt < \infty \quad 1.3.2$$

 Se $\hat{\psi}(\omega)$ è la trasformata di Fourier di $\psi(t)$, cioè:

$$\hat{\psi}(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} \psi(t) e^{-j(\omega)t} dt \quad 1.3.3$$

Deve essere verificata la seguente condizione:

$$C_g = \int_0^{+\infty} \frac{|\hat{\psi}(\omega)|^2}{\omega} d\omega < \infty \quad 1.3.4$$

Ciò implica che la wavelet non ha alcuna componente di frequenza pari a zero, ovvero l'integrale della funzione wavelet su tutto il range di variabilità deve essere nullo. L'equazione 1.3.4 è nota come condizione di ammissibilità e C_g il cui valore dipende dalla wavelet scelta, è chiamata *costante di ammissibilità*.

Per le wavelet complesse, la trasformata di Fourier deve essere reale ed annullarsi per frequenze negative. Il contributo all'energia del segnale, ad una scala specifica σ ed alla locazione temporale τ , è dato dalla densità di energia wavelet bidimensionale:

$$E(\tau, \sigma) = |WT(\tau, \sigma)|^2 \quad 1.3.5$$

L'energia totale del segnale può essere ricavata dalla sua trasformata wavelet come segue:

$$E = \frac{1}{C_g} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_0^{+\infty} \frac{1}{\sigma^2} |WT(\tau, \sigma)|^2 d\sigma d\tau = \left[\int_{-\infty}^{+\infty} x(t)^2 dt \right] \quad 1.3.6$$

La distribuzione dell'energia totale contenuta nel segnale in funzione di σ è data da:

$$E(\sigma) = \int_{-\infty}^{+\infty} |WT(\tau, \sigma)|^2 d\tau \quad 1.3.7$$

La relazione precedente, nota come *varianza wavelet*, è utile per isolare le scale dominanti associate al segnale come per esempio nello studio di strutture coerenti. Una funzione di

densità di potenza spettrale, basata sulle wavelet, può essere ricavata semplicemente dalla equazione 1.3.7 ed essere confrontata direttamente alla sua omologa di Fourier, cioè:

$$P_w(\omega) = \frac{1}{T \omega_c C_g} \int_0^T |WT(\tau, \sigma)|^2 d\tau \quad 1.3.8$$

dove C_g è la costante di ammissibilità, T è il tempo totale del segnale e ω_c è una frequenza caratterizzante la wavelet madre (definita per scala $\sigma = 1$ e posizione $\tau = 0$) come il centro banda, frequenza di picco, frequenza centrale, ecc. Così la frequenza ω , corrispondente ad una wavelet di scala arbitraria σ è data da $\omega = \omega_c/\sigma$. Infine, come con la trasformata di Fourier, il segnale originale può essere ricostruito utilizzando una trasformazione inversa del tipo:

$$x(t) = \frac{1}{C_g} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_0^{+\infty} \frac{1}{\sqrt{\sigma}} \psi\left(\frac{t-\tau}{\sigma}\right) WT(\tau, \sigma) \frac{d\sigma d\tau}{\sigma^2} \quad 1.3.9$$

La Figura 1.2.2 mostra, a titolo esplicativo, un esempio di analisi wavelet condotta su un segnale sinusoidale (vedi pannello superiore) in cui le due frequenze caratteristiche (50 e 100 Hz) insorgono in tempi successivi. In particolare, la prima si mantiene fino a 140 s allorquando viene sostituita dalla seconda componente.

L'analisi wavelet, condotta calcolando i coefficienti tramite l'eq.1.3.1, produce un plot 3D (vedi pannello centrale) nel quale è mostrato l'andamento dei coefficienti WT (asse z) in funzione della scala (inversamente proporzionale alla frequenza, asse y) e del tempo (asse x). Nel pannello inferiore sono riportati le proiezioni dei coefficienti WT sul piano scala-tempo. Il pannello inferiore rappresenta un'alternativa migliore soprattutto quando i segnali sono più compositi e il plot 3D diventa uno strumento di visualizzazione non immediato da gestire per la scelta dell'angolazione visiva più efficace.

Ciò che, in generale, un'analisi wavelet di questo tipo produce è un eventuale susseguirsi di massimi e minimi (picchi nel caso del plot 3D, cluster o anelli concentrici in quello 2D) in corrispondenza di opportune scale, legate alle componenti in frequenza contenute nel segnale, e dei tempi caratteristici di insorgenza. La simmetria e la periodicità e le caratteristiche morfologiche delle “figure” presenti nei plot 3D e 2D rivelano la natura del segnale oggetto dell'analisi.

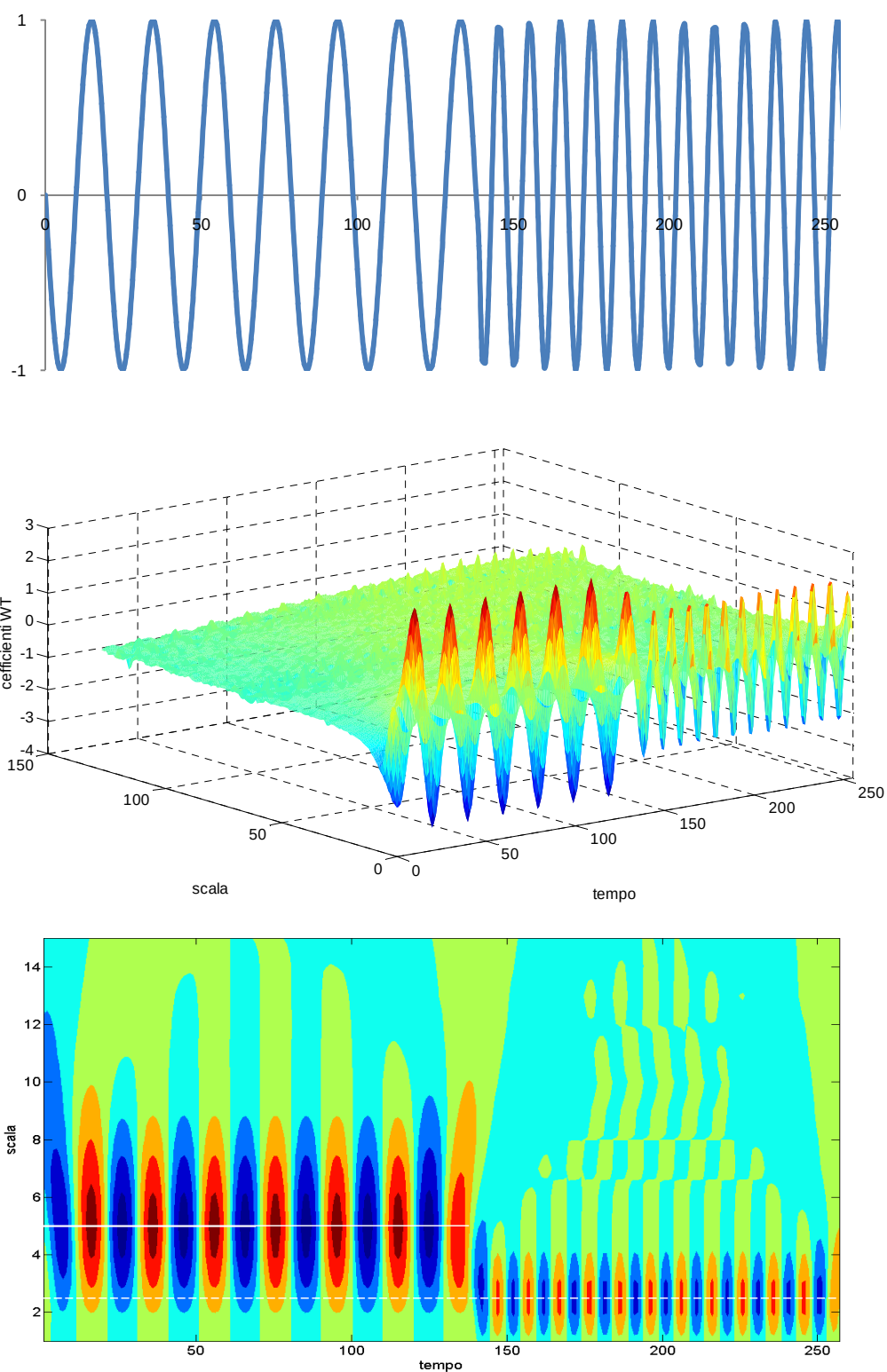


Figura 1.2.2. *Pannello superiore:* segnale sinusoidale caratterizzato da due frequenze che insorgono a tempi diversi. *Pannello centrale:* plot 3D dei coefficienti WT in funzione della scala e del tempo. *Pannello inferiore:* plot 2D dei coefficienti wavelet calcolati dalla eq. 1.3.1. Le due linee bianche individuano la scala corrispondente ai massimi.

La DWT consiste nel prodotto interno del segnale originale con la funzione base wavelet calcolata a punti discreti, di solito impiegando una griglia diadica (potenza intera di 2 che scala in σ e τ) per garantire ortogonalità, e il risultato è una somma ponderata di una serie di funzioni basi. Nella sua forma base, la DWT impiega funzioni di base wavelet ortonormali e presenta ridondanza zero. Tale metodologia matematica permette di esprimere un'immagine $f(x,y)$ nella seguente forma [5-6]:

$$f(x,y) = a_{j_0} f(x,y) + \sum_{j=-\infty}^{j_0} \sum_{(i)} d_j^{(i)} f(x,y) \quad 1.3.10$$

In tale espressione, l'indice (i) , che rappresenta la direzione, può assumere i tre valori orizzontale (h) , verticale (v) e diagonale (d) ed i termini $a_{j_0} f(x,y)$ e $d_j^{(i)} f(x,y)$, detti rispettivamente coefficiente di approssimazione dell'immagine al livello di decomposizione j_0 e coefficiente di dettaglio nella direzione (i) al livello di decomposizione j , si ottengono con le seguenti relazioni:

$$a_j f(x,y) = \sum_{k,l=-\infty}^{\infty} A_{j,k,l} \Phi_{j,k,l}(x,y); \quad d_j^{(i)} f(x,y) = \sum_{k,l=-\infty}^{\infty} D_{j,k,l}^{(i)} \Psi_{j,k,l}^{(i)}(x,y) \quad 1.3.11$$

La funzione di scala bidimensionale $\Phi_{j,k,l}(x,y)$ e le funzioni *wavelet* bidimensionali nelle tre direzioni $\Psi_{j,k,l}^{(i)}(x,y)$ si ottengono a loro volta dalla combinazione delle funzioni di scala monodimensionali con le funzioni *wavelet* monodimensionali:

$$\Phi_{j,k,l}(x,y) = \phi_{j,k}(x) \phi_{j,l}(y) \quad 1.3.12a$$

$$\Psi_{j,k,l}^{(h)}(x,y) = \phi_{j,k}(x) \psi_{j,l}(y) \quad 1.3.12b$$

$$\Psi_{j,k,l}^{(v)}(x,y) = \psi_{j,k}(x) \phi_{j,l}(y) \quad 1.3.12c$$

$$\Psi_{j,k,l}^{(d)}(x,y) = \psi_{j,k}(x) \psi_{j,l}(y) \quad 1.3.12d$$

I coefficienti $A_{j,k,l}$ e $D_{j,k,l}^{(i)}$ dello sviluppo si ottengono, invece, dalle seguenti relazioni:

$$A_{j,k,l} = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x,y) \Phi_{j,k,l}^*(x,y) dx dy; \quad D_{j,k,l}^{(i)} = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x,y) \Psi_{j,k,l}^{(i)*}(x,y) dx dy \quad 1.3.13$$

Infine, le funzioni *wavelet* monodimensionali $\psi_{j,k}(x)$ e le funzione di scala monodimensionali $\phi_{j,k}(x)$ sono definite rispettivamente a partire da una *mother wavelet* ψ e da una *scaling function* ϕ attraverso le seguenti relazioni, in cui j e k sono detti parametro di scala e di traslazione, rispettivamente:

$$\psi_{j,k}(x) = 2^{-j/2} \psi(2^{-j}x - k); \quad \phi_{j,k}(x) = 2^{-j/2} \phi(2^{-j}x - k) \quad 1.3.14$$

È importante sottolineare il fatto che, nonostante le due Eq. 1.3.14 appaiano formalmente identiche tra loro, la scelta della *mother wavelet* e della *scaling function* venga effettuata in modo tale che tutte le $\psi_{j,k}(x)$ e le $\phi_{j,k}(x)$ nel loro insieme, riescano a campionare ogni segnale monodimensionale su tutto il suo dominio.

In generale la procedura per la riduzione del rumore può essere sintetizzata in: 1) calcolo della trasformata discreta (DWT); (ii) riduzione del rumore dai coefficienti wavelet e 3) ricostruzione di un'immagine *denoised* dall'applicazione della trasformata wavelet inversa.

Se è pur vero che ogni wavelet deve possedere alcune proprietà matematiche ben precise, è altrettanto vero che non sono poche le funzioni potenzialmente dotate di queste caratteristiche. Infatti, a differenza dell'analisi di Fourier, in cui la scelta ricade sulle ben note funzioni seno e coseno, l'*analisi wavelet* mette a disposizione una vasta gamma di funzioni: discrete o continue, con o senza supporto compatto, ortogonali o non ortogonali, con una funzione matematica semplice o complessa. Addirittura l'WA offre al matematico esperto la possibilità di costruire secondo le proprie esigenze una base di funzioni *ad hoc*!

Sorvolando su questa potenzialità, resta il quesito se esiste una funzione wavelet più adatta all'applicazione di interesse oppure se una scelta vale l'altra. La scelta della funzione wavelet è condizionata sia dalle caratteristiche fisiche e statistiche del fenomeno da studiare, e quindi dalla tipologia di segnale da analizzare, sia dalle informazioni che si intendono acquisire. Quindi, la conoscenza di precedenti risultati scientifici, congiuntamente alle evidenze empiriche connesse, possono rivelarsi un utile guida per risolvere il problema su come scegliere correttamente la funzione wavelet da utilizzare.

Generalmente, pur avendo la possibilità di costruirsi una base opportuna, gli studiosi utilizzano poche tipologie di wavelet, offerte dai software matematici o statistici in commercio, restringendo la loro scelta ad un numero limitato di funzioni (Haar, Daubechies, Morlet, Mexican hat, etc.).

La versatilità della tecnica wavelet ha reso questa metodologia di analisi applicabile in svariati campi, dalla finanza alla geofisica alla medicina.

1.3 ANALISI SPETTROSCOPICHE: XRF vs LIBS

Un'indagine spettroscopica permette di analizzare le componenti di un materiale o le proprietà utili per l'identificazione e/o la ricerca dei processi di trasformazione (e quindi anche di degrado) in atto. I risultati ottenibili potrebbero essere analoghi a quelli con tecniche di immagine, se non fosse che, nel caso di una tecnica spettroscopica, l'individuazione di un componente del materiale può spesso essere effettuata con maggior grado di certezza e dettaglio. Di qui il grande interesse per indagini spettroscopiche che, pur non permettendo una visualizzazione del materiale analizzato, si rivelano uno strumento indispensabili per la caratterizzazione dei suoi strati superficiali.

Tra le tecniche spettroscopiche utilizzate la spettroscopia a fluorescenza a raggi X (XRF) ricopre un ruolo fondamentale ed è sempre più frequentemente impiegata in indagini non distruttive.

L'impiego dei raggi X nell'analisi dei materiali è dovuta alla loro elevata penetrazione in molti materiali; in generale, per ottenere, con un'indagine non distruttiva, informazioni analitiche o strutturali su di un materiale, occorre che:

- a) la radiazione penetri sufficientemente nel campione in modo da attraversarlo o perlomeno da penetrare significativamente;
- b) la radiazione interagisca con gli atomi del materiale in maniera sufficientemente frequente da permettere dall'esterno di osservare ciò che è avvenuto all'interno del campione.

La XRF è una tecnica di spettroscopia in emissione di raggi X che permette l'identificazione degli elementi chimici che sono presenti, o compongono, il campione esaminato. Tale tecnica permette, quindi, di rivelare la presenza di un determinato elemento ed, utilizzando un'appropriata metodologia di misura e di analisi dei dati, stabilire la concentrazione di esso nel campione.

Nella spettroscopia XRF il campione viene colpito da un fascio di raggi X che, eccitando gli elettroni dei livelli energetici più profondi, induce la transizione ad uno stato energetico superiore. Così, all'assorbimento di un fotone X di opportuna energia consegue la formazione di una lacuna in un livello energetico profondo. La diseccitazione del sistema avviene grazie alla transizione di un elettrone da un livello energetico superiore (più esterno)

verso uno più interno (occupa la lacuna iniziale), con emissione di un fotone X di energia corrispondente alla transizione tra i due livelli. Tali radiazioni X secondarie sono monocromatiche e caratteristiche degli atomi presenti nel campione analizzato. L'uso del termine fluorescenza X o XRF (X-Ray fluorescence) deriva dal fatto che l'energia delle radiazioni emesse è minore di quella incidente. Inoltre, l'intensità delle radiazioni emesse è correlabile alla concentrazione degli elementi presenti nel campione nel punto irraggiato.

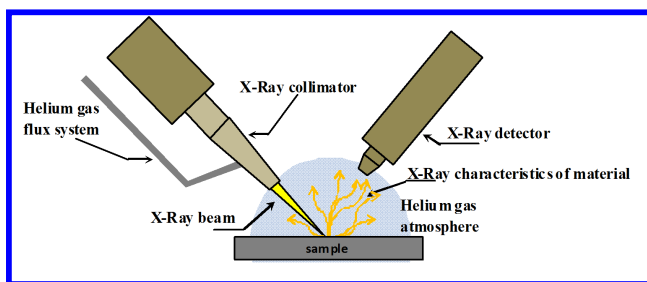


Figura 1.3.1: Schematizzazione della tecnica XRF

Nello strumento XRF (Figura 1.3.1) i fotoni X emessi interagiscono con un rivelatore cedendogli energia e dando luogo ad un impulso elettrico di ampiezza proporzionale all'energia ceduta. Tali impulsi, acquisiti ed elaborati opportunamente da un sistema dedicato, vengono successivamente memorizzati e resi disponibili sotto forma di spettro in cui, in ascissa, compare l'energia (legata all'elemento chimico) ed in ordinata il rispettivo numero di conteggi, cioè di fotoni X rivelati (connesso alla quantità dell'elemento presente). Lo spettro è costituito dai picchi (molto stretti) relativi alle emissioni caratteristiche degli elementi costituenti il campione, ma anche dalle tracce degli eventi di diffusione elastica e non elastica dei fotoni nel materiale stesso. Il numero di fotoni presenti in un determinato picco è proporzionale alla frazione in peso dell'elemento corrispondente nel volume di materiale osservato. In pratica misurando l'area del picco è possibile risalire alla presenza dell'elemento cui esso corrisponde e alla sua concentrazione.

Tale spettro di fluorescenza contiene, quindi, informazioni circa la composizione chimica superficiale elementare del campione e non sui composti formati dagli elementi chimici rivelati. Tramite la fluorescenza a raggi X, entro alcuni limiti strumentali (analisi di elementi con $Z > 11$ ed entro uno spessore di non oltre $70 \mu\text{m}$ dalla superficie) è possibile rivelare in maniera non invasiva, sia gli elementi maggioritari ed in tracce costituenti i campioni, sia quelli derivanti da eventuali stati di degrado o di restauro.

Informazioni complementari possono essere acquisite grazie alla tecnica *laser-induced breakdown spectroscopy* (LIBS) in grado di caratterizzare elementi chimici con basso Z , non

rivelabili con la fluorescenza X, oltre che analizzare materiali anche di natura organica. Tale tecnica d'indagine è in grado di fornire dati su un'eventuale differenziazione stratigrafica della composizione dei campioni analizzati.

In teoria la LIBS è in grado di analizzare ogni tipo di materia a prescindere del suo stato fisico, solido, liquido o gassoso.

La tecnica LIBS fa uso del plasma indotto da un laser per vaporizzare e dissociare un materiale bersaglio. Nello specifico, la LIBS (Figura 1.3.2) sfrutta un fascio laser, ad alta potenza, che viene focalizzato sulla superficie del campione. A seguito di ciò, la temperatura della zona localmente riscaldata aumenta così velocemente da raggiungere e superare la condizione di *break down*, il cui valore di soglia è inversamente proporzionale al quadrato della lunghezza d'onda della radiazione incidente.

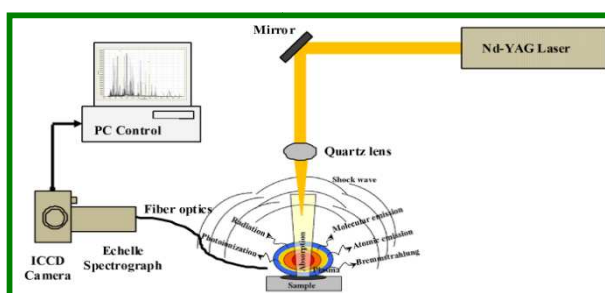


Figura 1.3.2: Schematizzazione della tecnica LIBS

A questo punto la zona di focalizzazione, ionizzandosi sempre più, comincia ad assorbire la radiazione ed ad aumentare la sua temperatura. Ciò che ne consegue, è la formazione di un plasma costituito da atomi eccitati, ioni, elettroni e frammenti di molecole. Subito dopo la formazione del plasma, si verifica emissione di radiazione continua (*Bremsstrahlung*) connessa al rallentamento degli elettroni del plasma per effetto del campo prodotto dagli ioni positivi. Dopo il raffreddamento del plasma, cominciano ad innescarsi le emissioni di riga caratteristiche delle transizioni tra stati legati e quelle connesse alle diseccitazioni delle molecole del plasma. Alla fine, la radiazione del plasma è caratterizzata da uno spettro continuo e dai picchi dovuti ai decadimenti spontanei degli ioni eccitati. La radiazione di *Bremsstrahlung* tende a ridursi velocemente in corrispondenza del raffreddamento del plasma, a vantaggio dei picchi che invece permangono più a lungo. Opportune impostazioni strumentali, inerenti il ritardo temporale (dall'impulso laser e all'apertura della finestra di acquisizione del segnale emesso) ed il gate, permettono di acquisire il segnale emesso durante il raffreddamento, a causa della ricombinazione degli elettroni prodotti e dalla diseccitazione degli atomi. Dall'analisi spettrale di tale segnale è possibile ottenere informazioni, qualitative e quantitative, sulla composizione chimica del campione.

Il confronto tra le due tecniche XRF e LIBS è particolarmente utile grazie alla loro complementarità in termini di spessore e composizione delle superfici da investigare. Tali tecniche (XRF e LIBS), rispondono bene ai requisiti di eseguire analisi veloci e di essere tecniche “non o micro-distruttive”, in modo da garantire l'integrità del campione. Entrambe le metodologie di indagine, infine, non richiedono un pre-trattamento del campione e ne permettono, pertanto, un'analisi diretta in tempi estremamente brevi.

L'analisi integrata dei dati ottenuti tramite l'uso delle tecniche spettroscopiche sopra descritte (disponibili nel Laboratorio di Beni culturali del DiFTeR) ha fornito una chiave interpretativa degli elementi caratterizzanti i materiali indagati attraverso la messa a punto di procedure analitiche *ad hoc*. I dettagli delle analisi condotte verranno esposte nei capitoli successivi.

1.4 CARATTERIZZAZIONE E RICOSTRUZIONE DI IMMAGINI

Oggi, l'uso di tecniche di diagnostica medica, supportate da metodi di elaborazione dati sempre più efficienti, sembra essere sempre più un approccio di indagine promettente per lo studio di strutture complesse di qualsiasi natura. Tra tali tecniche emerge la tecnica tomografia computerizzata (TC) a raggi X.

L'idea anticipatrice della TC si deve ad un radiologo italiano Alessandro Vallebona (1899-1987) il quale, negli anni trenta, propose una metodica, nota come stratigrafia, per riprodurre un solo strato del corpo sulla pellicola radiografica. Tale metodica, di rilevante impatto nella diagnostica radiologica fino a quasi la metà degli anni '80, fu presto sostituita dalla metodica circolare alla base della TC⁵, ideata e realizzata dall'ingegnere inglese Godfrey Hounsfield e dal fisico sudafricano Allan Cormack, che vinsero il premio Nobel per la medicina nel 1979. L'avvento della TC ha segnato, senza dubbio, una tappa di enorme rilevanza nell'ambito delle tecniche radiologiche diagnostiche fino ad allora utilizzate, stimolando i ricercatori ad ampliare il suo uso anche al di fuori del contesto medico. La TC infatti, è una tecnica fisica di diagnosi sempre più frequentemente applicata nei settori in cui è obbligatorio l'utilizzo di tecniche non distruttive, grazie alla possibilità di fornire informazioni morfologiche e fisiche sulla struttura interna del campione indagato.

⁵ Il primo tomografo computerizzato consentiva esclusivamente lo studio delle strutture del cranio e fu installato all'Atkinson Morley Hospital di Londra nel 1971. Nel 1974 furono create le prime apparecchiature per lo studio del torace e dell'addome.

La tomografia Computerizzata (TC), è un esame diagnostico avanzato che utilizza una sofisticata apparecchiatura a raggi X allo scopo di ottenere immagini radiologiche dettagliate di aree specifiche della struttura di interesse. La fonte dei raggi X ruota attorno alla struttura da esaminare che, per mezzo di dispositivo apposito, trasla all'interno di un tunnel di scansione, permettendo in tal modo l'analisi di una sezione diversa. Tale indagine, dunque, consente di ottenere immagini di sezioni (*slice*) della struttura investita da un fascio di raggi X i quali, dopo il suo attraversamento, vengono raccolti da un appropriato sistema di rivelazione.

Il risultato di tale processo è la formazione di una immagine bidimensionale (proiezione). L'immagine tomografica digitale è costituita da una serie di pixel (picture element = pixel); il cui valore corrisponde alla densità misurata dall'apparecchio TC per ciascun voxel (volume element = voxel) che compone lo strato. Ne consegue che più piccolo è il volume rappresentato da un pixel maggiore risulta la risoluzione spaziale dell'immagine.

A seguito di una rotazione del campione o del sistema di rivelazione è possibile ottenere tante proiezioni quanti sono gli angoli di rotazione. L'immagine di una sezione (*slice*) del campione viene ottenuta attraverso la composizione di tali proiezioni. Si ottiene, in tal modo, una serie di *slice* non necessariamente contigue, con spessore prefissato, l'insieme delle quali opportunamente ricostruite rappresentano i dati relativi al volume esaminato. A partire da tali slice, utilizzando un software di *rendering* tridimensionale, è possibile ricostruire immagini tomografiche di qualsiasi piano spaziale (frontale, sagittale, assiale) o, immagini tridimensionali dell'intero campione permettendo la completa visualizzazione delle sue strutture interne.

La visualizzazione delle strutture interne di oggetti opachi, e/o dei processi che hanno luogo contestualmente, avviene attraverso la ricostruzione di immagini sulla base di coefficienti di attenuazione dei raggi-X. Infatti, l'intensità della radiazione X emessa in seguito all'attraversamento della viene tradotta da opportuni dispositivi in un segnale elettrico proporzionale all'intensità del fascio uscente. Per un fascio di intensità I_0 , l'intensità I_1 trasmessa attraverso un piccolo elemento di volume di campione, avente spessore x e coefficiente di attenuazione μ_1 , è data dalla seguente relazione:

$$I_1 = I_0 e^{-\mu_1 x} \quad 1.4.1$$

Considerando che il fascio viene attenuato da tutti i *voxel* che attraversa, si ottiene:

$$I = I_0 e^{-x \sum_{i=1}^n \mu_i} \quad 1.4.2$$

Da cui si ha
$$\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = x \sum_{i=1}^n \mu_i \quad 1.4.3$$

Il fascio uscente è dunque correlato con il coefficiente di attenuazione μ della materia attraversata, pertanto risulta tanto più attenuato quanto più sono dense le strutture che esso attraversa. Ne consegue che, poiché l'attenuazione è direttamente proporzionale alla densità elettronica delle strutture presenti nel voxel, la sua misura può essere considerata di tipo densitometrico e permette di ricavare una “mappa” delle densità dell’oggetto analizzato.

Nella ricostruzione delle immagini TC le sezioni dell’oggetto vengono dunque suddivise in una serie di voxels, a ciascuno dei quali viene assegnato un numero intero proporzionale al suo coefficiente di attenuazione μ del fascio di raggi X.

Tale numero, detto “numero TC” è dato in un scala Hounsfield, standardizzata a livello internazionale (i valori di TC sono espressi in unità Hounsfield HU), che rappresenta l'attenuazione μ dei raggi X del campione rispetto a quella dell'acqua pura μ_w [16]. Per l'aria il valore di attenuazione TC è -1.000 HU, per l'acqua vale 0 HU mentre per l'osso compatto vale +1000 HU. Il valore di attenuazione TC è dato dalla seguente relazione:

$$TC = \frac{\mu_{voxel} - \mu_w}{\mu_w - \mu_{air}} \times 1000 \quad 1.4.4$$

La gamma di densità rappresentate (finestra) può essere localizzata in qualsiasi punto della scala numerica Hounsfield; il valore su cui viene centrata la finestra è detto centro, la dimensione della finestra è detta ampiezza. L'analisi delle immagini, così ottenute, consente di distinguere i volumi analizzati in funzione del differente valore di TC.

Questa potenzialità della tomografia, ampiamente sfruttata in ambito medico, è essenziale anche in altri campi di ricerca dove la visualizzazione delle strutture interne ricopre un ruolo fondamentale.

CAPITOLO 2

CASO STUDIO 1: L'ELETTRORETINOGRAMMA

The grand aim of all science is to cover the greatest number of empirical facts by logical deduction from the smallest number of hypotheses or axioms.
Sir Humphrey Davy

In questo capitolo viene proposto un iter metodologico per l'analisi di un segnale spesso fuori dalla routine clinica, che può rivelarsi di fondamentale importanza nella pratica di clinica diagnostica: l'elettroretinogramma (ERG). Questo segnale biomedico è in grado di fornire la visualizzazione del segnale elettrico di risposta temporale della retina a uno stimolo luminoso.

A differenza degli altri organi, l'occhio è l'unico la cui struttura e funzionamento, notoriamente complessi, possono essere indagati anche in maniera non invasiva permettendo così, immediate valutazioni sulla sua fisiologia e sulle sue possibili alterazioni. Ciononostante, i tracciati elettroretinografici sono spesso necessari in quanto coadiuvano le informazioni ottenute per via clinica e si rivelano di cruciale importanza sia nel caso di eventuali incertezze diagnostiche, sia nella diagnosi precoce, poiché tali biosegnali subiscono alterazioni prima che lo stato patologico si evidenzia nelle indagini cliniche obiettive.

Questo capitolo offre una panoramica delle nozioni generali della fisiologia dell'occhio, ed introduce il segnale elettroretinografico generato dalla retina in risposta a sollecitazione luminosa.

Allo scopo di fornire un quadro quanto più esaustivo dell'argomento, vengono riportati anche i modelli più accreditati per le prime fasi della fototrasduzione, il processo fisiologico legato all'attività fotorecettoriale.

Lo scopo di questo capitolo è quello di studiare gli effetti delle interazioni tra i centri fotosensibili nella retina umana attraverso la simulazione computazionale della risposta retinica con funzioni scelte *ad hoc* ed di rivelare le caratteristiche tempo-frequenza per mezzo dell'analisi wavelet. Le tecniche di analisi utilizzate hanno fornito informazioni utili circa i processi coinvolti nella generazione dell'ERG, grazie alla loro applicazione sia allo studio di tracciati appartenenti a soggetti oculisticamente sani, sia a quelli appartenenti a soggetti affetti da patologie specifiche dei fotorecettori ed allo studio comparativo delle alterazioni morfologiche del segnale elettroretinografico. In tale ambito sono state determinate le eventuali interdipendenze di tali parametri, formulando progetti di simulazione e utilizzando procedure wavelet per lo studio del comportamento retinico in soggetti affetti da specifiche patologie fotorecettoriali, allo scopo di elevare l'ERG a strumento di diagnosi precoce.

2.1 CENNI DI FISIOLOGIA DELL'OCCHIO ED ELETTROFISIOLOGIA CELLULARE

Tra le componenti del sistema oculare, la retina ricopre un ruolo fondamentale nella visione degli esseri viventi superiori in quanto è sede dei recettori veri e propri, che ricevono e traducono l'impulso luminoso nell'impulso elettrico responsabile della visione. La retina, considerata come un'estensione del tessuto cerebrale, è ritenuta la parte più importante dell'organo visivo in quanto essa costituisce la sua pellicola fotosensibile. Su di essa, infatti, si formano le immagini reali, capovolte e rimpicciolite degli oggetti.

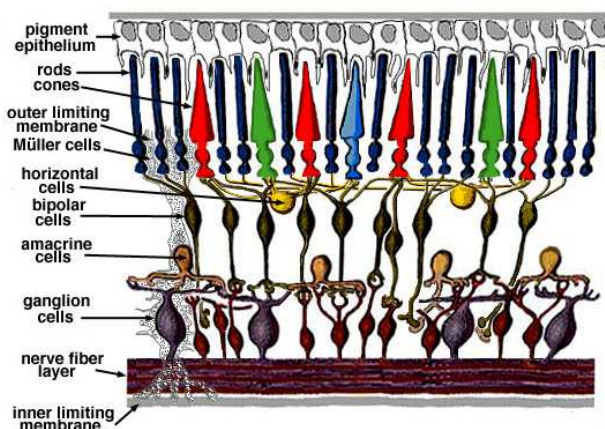


Figura 2.1.1 Sezione della retina. Sono indicati 10 strati, compreso quello pigmentato (http://www.rvscny.com/simple_retina2.jpg)

Nella *retina*, costituita da dieci strati (Figura 2.1.1), risiedono i fotorecettori, stimolati in relazione all'energia del segnale luminoso. Al buio essi sono polarizzati con una differenza di potenziale di circa -40 mV rispetto all'esterno associata ad un gradiente di concentrazione ionica (soprattutto di ioni K^+ e Na^+) che dà luogo ad una corrente (*dark current*) dovuta al moto degli ioni attraverso i segmenti interni ed esterni dei fotorecettori. Questa condizione è alterata dall'assorbimento di radiazione luminosa.

La visione si sviluppa attraverso sei processi diversi:

-  rifrazione delle radiazioni luminose attraverso i mezzi diottrici;
-  formazione delle immagini sulla retina messe a fuoco dai sistemi diottrici;
-  reazioni fotochimiche a livello dei fotorecettori;
-  *trasduzione* cioè trasformazione dell'energia luminosa in eccitamento nervoso;
-  trasmissione in codice dell'eccitamento nervoso attraverso i vari strati della retina e il nervo ottico ai centri della corteccia celebrale;
-  decodifica a livello della corteccia celebrale con insorgenza delle sensazioni visive.

Le reazioni fotochimiche che avvengono a livello fotorecettoriale sono alla base del processo della fototrasduzione. In una reazione fotochimica, l'assorbimento dei fotoni da parte degli elettroni determina delle transizioni di questi ultimi a livelli energetici superiori, non occupati. I segmenti esterni dei fotorecettori hanno un'elevata capacità di captare la luce poiché posseggono una elevata concentrazione di pigmenti visivi, in grado di assorbirla. Se la molecola del pigmento assume un'energia superiore a quella di legame, la molecola si separa in due parti (scissione). La scomposizione fotochimica del pigmento presente nelle cellule dell'epitelio sensoriale provoca uno spostamento delle cariche elettriche, generando una variazione di potenziale di membrana dei fotorecettori che racchiude l'informazione trasmessa alle cellule sottostanti ed, infine, al cervello mediante il nervo ottico. Un fotorecettore è in grado di tradurre l'energia di un singolo fotone ($\sim 4 \times 10^{-12}$ erg) in una riduzione pulsata della corrente assiale di circa 1 pA della durata di circa 1 s con un'energia equivalente di 2×10^{-7} erg. In tal modo un fotorecettore si comporta come un fotomoltiplicatore con un guadagno di energia di circa 10^5 volte [17].

Le reazioni fotochimiche avvengono quando opportune condizioni fisiche sono state soddisfatte.

-  L'interazione tra fotoni ed il pigmento di un recettore avviene soltanto se l'energia dei fotoni corrisponde alla distanza tra due livelli energetici. In altri termini ogni recettore possiede una lunghezza d'onda caratteristica (alla quale corrisponde un'energia denominata *energia di soglia*): fotoni di lunghezza d'onda maggiore (e quindi di energia minore della soglia) non vengono assorbiti e, pertanto non danno luogo a processi di fotototrasduzione (legge di Draper).
-  In condizioni normali una molecola assorbe un fotone alla volta per portare un elettrone allo stato di eccitazione (legge di Stark-Einstein). Sotto particolari condizioni, ad esempio in casi di utilizzazione di luce laser, possono avvenire processi bifotonici.
-  L'attività fotochimica di una radiazione è proporzionale alla sua frequenza (ν) ed al numero n di fotoni incidenti, questa legge deriva dalla relazione $W = nh\nu$ dove W indica l'energia incidente ed h la costante di Planck. Ne consegue che un processo di trasformazione molecolare è tanto più probabile quanto maggiori sono l'energia fornita ed il tempo di esposizione (legge di Bunsen-Roscoe).

Lo studio delle correnti elettriche a livello delle vie ottiche riveste un duplice interesse: i) il è indispensabile per comprendere il meccanismo della visione, ii) è utile nella diagnosi di numerose patologie del sistema oculare. L'attenzione verso tale ambito di ricerca, risale al XIX secolo (Dubois-Reymond 1849), ma notevoli passi avanti sono stati compiuti grazie alla miniaturizzazione degli elettrodi ed ai progressi dell'elettronica che hanno facilitato l'acquisizione e l'amplificazione di piccolissime differenze di potenziale prodotte da variazioni di deboli correnti biologiche innescate dalla foto-trasduzione.

2.2 L'ELETTRORETINOGRAMMA

Fra la cornea e il fondo oculare esiste una differenza di potenziale, nota come potenziale di riposo (*standing potential*). La stimolazione della retina con luce di varia intensità sia naturale, sia artificiale (flash), produce rapide variazioni di questo potenziale che, opportunamente acquisite, costituiscono l'elettroretinogramma (ERG).

La possibilità di registrare l'attività elettrica della retina grazie all'ERG divenne realtà già nel 1865. L'avvento di questo nuovo esame clinico rappresentò un grande passo verso la

comprensione, a tutt'oggi ancora incompleta, dei processi che si innescano nella retina in risposta ad uno stimolo luminoso. L'elettroretinogramma rappresenta una *risposta di massa* del tessuto retinico, essendo un effetto cumulativo dei potenziali retinici, non solo fotorecettoriali, ma anche quelli dovuti ad altre componenti più interne della retina.

A causa della complessità della struttura retinica, il segnale raccolto dall'ERG è di difficile interpretazione, essendo il risultato delle attività di tutte le cellule *in loco*. In generale, seguendo l'opinione comune, si può considerare l'ERG principalmente come una sequenza di quattro onde *a*, *b*, *c*, *d* [18-19], le cui ampiezze e durate relative dipendono dalle peculiarità dello stimolo luminoso. La Figura 2.2.1 riassume le principali componenti dell'ERG, indicandone le rispettive sedi di origine.

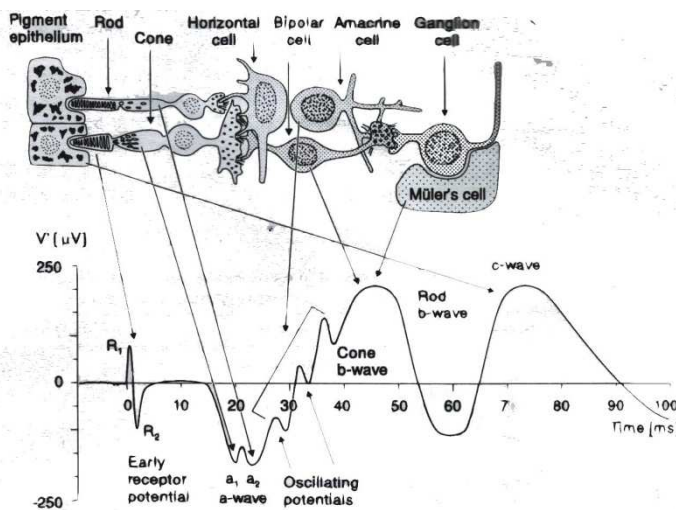


Figura 2.2.1. Schematizzazione delle componenti dell'ERG e delle relative origini [17].

La prima a manifestarsi è l'onda *a* (negativa e di modesto voltaggio $V_a \sim -200\mu V$, e di durata $t_a \sim 20-30$ ms), prodotta dalla risposta iniziale dei fotorecettori. Tale onda è generata extracellularmente lungo un cammino radiale che va dal corpo della cellula del fotorecettore all'interno della membrana del segmento esterno dello stesso. La sua rilevanza è, dunque, notevole poiché misura l'integrità funzionale dell'attività dei fotorecettori.

L'origine dell'onda *b* risiede nelle cellule dello strato nucleare interno, probabilmente in quelle bipolari, gangliari e di Müller, e pertanto, descrive l'attività neuronale di tale strato. A differenza dell'onda *a*, è positiva, ampia e molto netta ($V_b \sim 480\mu V$, durata $t_b \sim 20$ ms). L'onda *b* è, di solito, la componente dell'ERG di maggiore intensità. Nel caso in cui la risposta ad alta frequenza non venga eliminata (mediante filtraggio digitale), è possibile notare delle rapide oscillazioni sul fronte di salita dell'onda *b*, note come *potenziali oscillatori* e attribuite all'attività delle cellule amacrine.

La successiva onda c ($V_c \sim 200\mu V$, durata $t_c \sim 30ms$) nasce dalla corrente extracellulare prodotta dalla iperpolarizzazione della faccia apicale dell'epitelio pigmentato, in risposta alla diminuzione del potassio extra-cellulare. Anche l'onda c è positiva ma molto lenta e per la sua origine, misura l'integrità dell'epitelio pigmentato.

Infine, l'onda d rappresenta un effetto di *off*: compare, infatti, solo in seguito allo spegnimento dello stimolo luminoso.

Gli studiosi hanno prestato particolare attenzione alle onde a e b sia perché la misura della loro ampiezza e durata temporale risulta semplice dal punto di vista operativo, sia perché forniscono informazioni di rilevante importanza. Le onde successive, sono considerate solamente degli indicatori di spegnimento.

Attualmente, l'ERG è considerato fondamentale ed insostituibile per ottenere una misura obiettiva e quantitativa della funzione retinica. È largamente impiegato nella diagnosi di alcune patologie quali la retinite pigmentosa, le neuropatie tossiche, la difficoltà nella visione notturna e dei colori. E', inoltre, importante, in caso di degenerazioni retiniche ereditarie, per escludere l'occorrenza della patologia in altri componenti del nucleo familiare e per valutare eventuali soggetti di sesso femminile portatrici di patologie legate al cromosoma X. L'ERG ricopre anche un ruolo cruciale nella valutazione della funzionalità retinica nei soggetti con cataratta e/o opacità anche parziale della cornea prima di un eventuale intervento chirurgico, poiché in questi casi l'opacità dei mezzi diottrici impedisce l'esame diretto del fondo oculare. L'ERG è, infine, uno strumento utile per indagare su eventuali anomalie funzionali e biochimiche della retina ancor prima che un'alterazione patologica possa essere rilevata dal medico con un'indagine obiettiva. Infatti, un altro campo applicativo di questo segnale è quello della diagnosi precoce delle malattie retiniche ereditarie (PRA; "Progressive Retinal Atrophy" e SARD; "Sudden Acquired Retinal Degeneration"), in quanto all'esame oculare diretto non può, in questi casi, essere rilevata nessuna lesione. Cosicché, per queste retinopatie, questo esame è al giorno d'oggi l'unico strumento diagnostico attualmente disponibile.

2.2.1 MODALITÀ DI REGISTRAZIONE DELL'ERG

L'acquisizione del segnale retinico avviene per mezzo di un elettrodo attivo, posto sulla cornea del paziente rispetto ad un altro posto a terra (cute dell'orecchio, della guancia, o sulla fronte). Tali elettrodi stabiliscono un contatto elettrico con la retina, e permettono di misurare

i potenziali retinici in quanto i liquidi dell'occhio sono relativamente buoni conduttori di elettricità. Uno stimolo adeguato induce variazioni in questi potenziali che vengono registrati dagli elettrodi. Trattandosi di voltaggi molto deboli è necessario amplificare considerevolmente il segnale elettrico per poterlo visualizzare su un oscilloscopio elettronico oppure memorizzare su supporto magnetico per l'analisi *off-line*. I potenziali retinici sono di per sé affetti da rumore biologico; nel caso di segnali registrati con flash luminosi di piccolissima intensità la necessità di una grande amplificazione comporta l'aggiunta di disturbi elettrici di varia natura che, riducono notevolmente il rapporto segnale/rumore. Questo inconveniente può essere parzialmente evitato mediando varie acquisizioni o utilizzando amplificatori computerizzati dotati di memoria. Il tracciato così ottenuto viene definito *elettroretinogramma*.

Per la stimolazione luminosa si usano dei flash, analoghi a quelli usati dai fotografi, con filtri di attenuazione di diversa densità o filtri colorati per stimolare selettivamente i vari fotorecettori. Il segnale elettroretinografico varia con la durata, l'intensità, il colore dello stimolo e con lo stato di adattamento retinico. L'acquisizione del segnale elettroretinografico avviene tramite opportune apparecchiature gestite da un software dedicato.

I dati di interesse (ERG scotopici), oggetto di questo lavoro, sono stato registrati presso la clinica oculistica dell'Università di Palermo e acquisiti indipendentemente da questo contesto, nel rispetto della Legge sulla privacy n. 675 del 31 dicembre 1998.

Gli esami elettroretinografici sono stati registrati attraverso elettrodi corneali Henke's. Il segnale è stato opportunamente filtrato ed amplificato. L'impedenza degli elettrodi è stata mantenuta sotto i 5k Ω . Gli stimoli erano flash stroboscopici di luce bianca ottenuti in una sfera di integrazione di Ganzfeld di 40 cm di diametro. La luminanza standard era 1.7 cd s m⁻² e la durata del flash di 50 μ s. Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad una dilatazione massima pupillare (≥ 7 mm) con Nethyl-(α -picolyl) tropicamide 1%, e anestetizzazione della cornea con oxybuprocaine hydrochloride 4%. Le pupille di tali soggetti sono state dunque adattate al buio per 30 minuti in accordo con i protocolli standard dell'elettroretinografia clinica. Ogni tracciato della durata temporale di 500 ms è stato ottenuto mediando almeno 3 risposte. Per quanto possibile, si è tentato, comunque, di separare le anomalie morfologiche, indicative di possibili stati patologici, dal rumore elettrico derivante da vari fattori compresi i movimenti oculari involontari del paziente (nistagmi).

2.3 CARATTERISTICHE DEI FOTORECETTORI

Nella retina sono presenti due di fotorecettori, coni e bastoncelli, ai quali corrisponde una duplicità funzionale [16]. I primi (circa 7-8 milioni nell'uomo), responsabili della visione diurna, rispondono alla luce intensa ed in particolare ai colori, mentre i secondi, di gran lunga più numerosi (120 milioni), rendono possibile la visione notturna. La loro differenziazione funzionale è da attribuirsi alla presenza di differenti sostanze chimiche, la rodopsina per i bastoncelli e la iodopsina per i coni. Inoltre la differente posizione dei coni e dei bastoncelli all'interno della retina fa sì che la visione diurna sia massima in corrispondenza della *fovea centralis*, esclusivamente sede dei coni, mentre le aree extrafoveali (periferiche), sede propria dei bastoncelli, sono più sensibili.

Una delle differenze cruciali tra bastoncelli e coni è relativa alla loro sensibilità: un bastoncello è in grado di rispondere all'assorbimento di un singolo fotone, ed è circa 100 volte più sensibile di un cono. Inoltre, poiché i bastoncelli possiedono un solo tipo di pigmento sensibile alla luce sono funzionalmente indipendenti dalla lunghezza d'onda della radiazione incidente ed indistinguibili nella risposta ad uno stimolo luminoso. Differente è il caso dei coni che richiedono invece decine di centinaia di fotoni per essere attivati. Evidenze sperimentali suggeriscono l'esistenza di tre tipi di coni per la visione a colori vengono indicati con le lettere **L**, **M** e **S**, che indicano le lunghezze d'onda a cui i coni sono sensibili:

L, *long*, coni sensibili alle lunghezze d'onda maggiori, cioè la zona spettrale del rosso;

M, *medium*, coni sensibili alle onde intermedie, cioè la zona spettrale del verde;

S, *short*, coni sensibili alle onde più corte, cioè la zona spettrale del blu.

Circa il 64% dei coni sono di tipo L, circa il 32% sono di tipo M e circa il 2% sono di tipo S. Coni M ed L sono per lo più localizzati all'interno della zona centrale della retina; i coni S hanno la più alta sensibilità e si trovano principalmente in regioni periferiche. Inoltre, i coni S sono distribuiti in maniera semi-regolare differentemente dei coni M ed L che lo sono in modo casuale [20].

La retina umana contiene, dunque, un solo tipo di bastoncelli (per la visione notturna) e tre tipi di coni per la visione diurna (a colori). Nell'occhio *normale* i coni e i bastoncelli si integrano tra loro e permettono di vedere in qualunque condizione d'illuminazione. Il *tricromate*

normale è un soggetto che non ha alcuna anomalia funzionale o numerica dei coni e quindi vede normalmente tutti i colori.

Uno dei problemi principali, nello studio dell'onda *a*, è la distinzione, in essa, dei contributi forniti dalle due famiglie di fotorecettori. In maniera generale, si può dire che la percentuale del loro contributo è funzione del tipo di adattamento luminoso (intensità luminosa, luce,

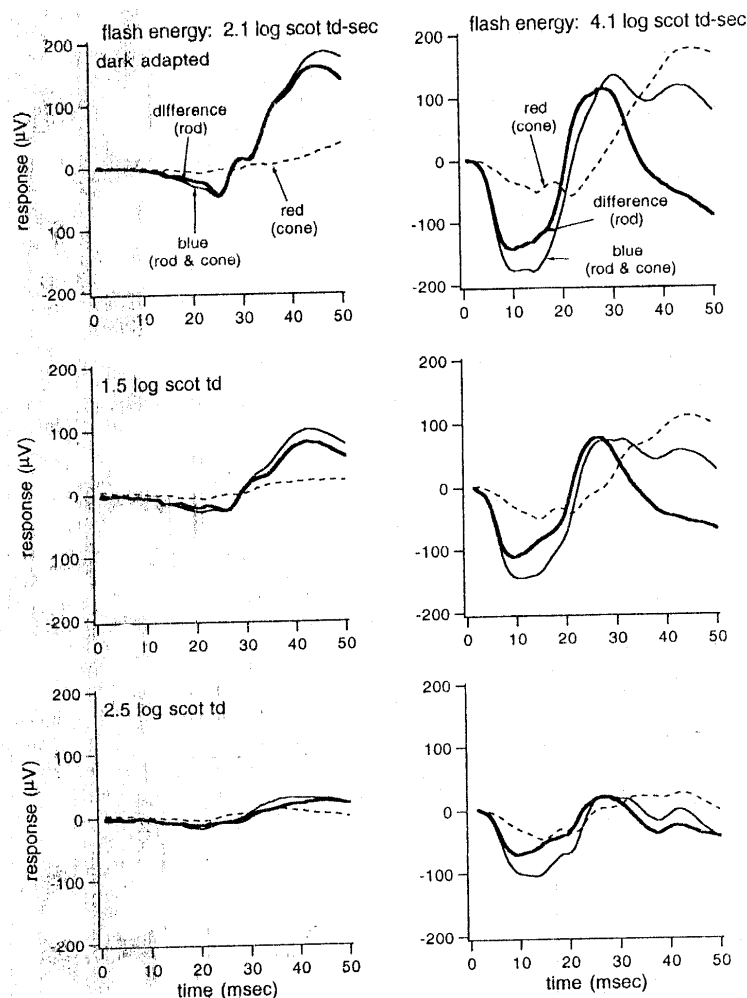


Figura 2.3.1. Da [21] Sopra: Risposte del bastoncello adattato al buio. Le curve sottili sono ERG registrati con flash di intensità 2.1(colonna di sinistra) o 4.1 (colonna di destra) log scot td. Le curve tratteggiate sono ERG registrati con flash luminosi di lunghezza d'onda lunga (rosso) di intensità tale da ottenere, per i coni, una stessa risposta. La curva più evidente è una stima della risposta pura del bastoncello a flash di lunghezza d'onda corta derivata dalla sottrazione computazionale della risposta al flash rosso da quella al flash blu. Centro: Come sopra ma in presenza di un campo statico di 1.5 log scot td.

Sotto: Come sopra ma in presenza di un campo statico di 2.5 log scot td.

buio). La Figura 2.3.1, mostra in che modo questi due contributi convivono e come si opera per distinguerli. La luce blu produce una risposta cooperativa di entrambi i recettori. Si può supporre che l'ammontare del contributo dei coni sottoposti alla luce blu sia paragonabile a quello suscitato da un flash di luce rossa. Per questo motivo, nella figura (2.3.1) è mostrata la

risposta fotopica dei coni in presenza di luce rossa. E' interessante notare, a tal proposito, come la risposta alla luce rossa non è influenzata dall'adattamento a campi più intensi (curve tratteggiate in Fig.2.3.1), poiché questi campi non influenzano la sensibilità dei coni; a differenza di quanto accade alla risposta alla luce blu che (curve sottili in Fig.2.3.1) appare apprezzabilmente ridotta. La risposta esclusivamente a carico dei bastoncelli (curve spesse in Fig.2.3.1) si ottiene sottraendo dalla risposta alla luce blu quella relativa alla luce rossa. Tale metodo di discriminazione è attuabile, nei dati relativi all'adattamento al buio dei recettori, poiché, in questi casi (p.e. risposta alla luce blu), il contributo all'onda *a* da parte dei coni è stato stimato [22] all'incirca al 20% e considerato relativamente costante a differenti flash luminosi.

2.4 MODELLI COMPUTAZIONALI DELL'ATTIVITÀ FOTORECETTORIALE :STATO DELL'ARTE

Secondo il modello di Granit [18], primo studioso dell'ERG, il *leading edge* dell'onda *a* è la somma dell'attività elettrica dei recettori. Più precisamente, l'ERG (Fig.2.4.1) si considera il

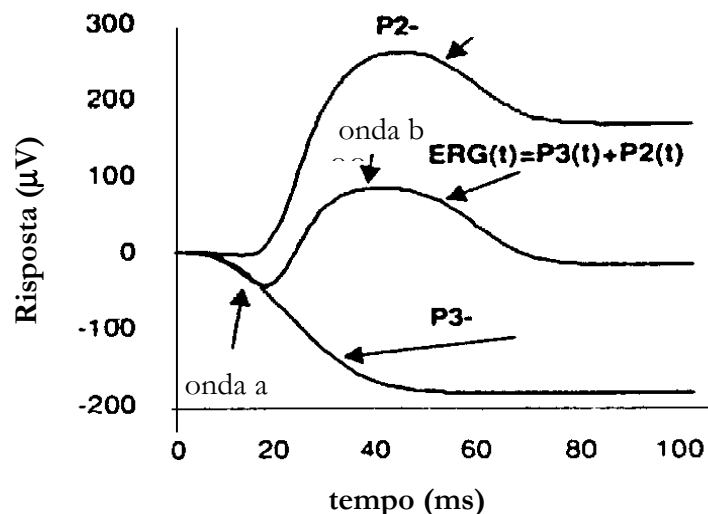


Figura 2.4.1 Schema delle componenti dell'ERG basato sul modello di Granit

risultato della somma del potenziale P3, prodotto dai fotorecettori e del potenziale, P2, prodotto dalle cellule dello strato nucleare più interno (INL). Nonostante questa ipotesi sia accettata dalla maggior parte degli studiosi, rimangono al riguardo ancora molte questioni insolte. Una fra tutte è l'esatta relazione tra l'ampiezza della risposta recettoriale e l'ampiezza

dell'onda a , un'altra concerne la possibilità di associare ai difetti specifici della funzione recettoriale le alterazioni nel *leading edge* dell'onda a .

Nel tentativo di trovare risposte a tali quesiti, alcuni studiosi hanno formulato alcuni modelli computazionali in grado di simulare la risposta recettoriale. Poiché l'ampiezza del *leading edge* dell'onda a è funzione sia del tempo sia dell'intensità luminosa, i modelli proposti evidenziano questo tipo di dipendenza. I due modelli più accreditati sono:

- 🖼 il modello di Baylor et al [23], basato sull'analisi della risposta ad un flash luminoso dei fotorecettori della retina della scimmia;
- 🖼 il modello di Penn e Hagins [24], basato sulla registrazione della risposta retinica di un gatto.

Sebbene queste due “scuole” seguano differenti tecniche di approccio e studino differenti specie di retina, anche se di mammiferi, entrambe concordano nel descrivere la risposta del recettore, sottoposto ad illuminazione, con un modello costituito da due componenti: un processo lineare statico (istantaneo) ed uno non lineare di saturazione (Fig.2.4.2).

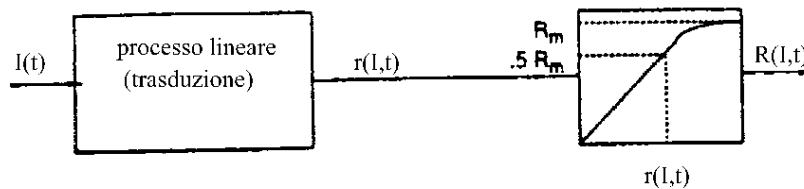


Figura 2.4.2. Schema del modello a due componenti: (una lineare e una non lineare). Da [25]

Il processo lineare, che descrive la trasduzione nel caso di flash luminosi di bassa intensità, è rappresentato da un filtro passa-basso con n stadi. Tale filtro, noto con il nome di *filtro di Poisson*, è costituito da una catena di filtri passa-basso RC con n stadi di ritardo. L'output del *filtro di Poisson* è l'input della componente non lineare del modello, costituita da un numero limitato di generatori pari al numero di canali di sodio che possono essere chiusi dal processo della trasduzione. Per brevi flash luminosi, l'uscita del filtro lineare (prima componente) è (vedi Fig.2.4.2) [25]:

$$r(I, t) = I \cdot c \cdot r^*(t) \quad 2.4.1$$

dove I è l'intensità espressa in scot td-sec (le unità di misura fotometriche sono riportate nell'Appendice 1), c è una costante e $r^*(t)$ l'impulso di risposta del filtro definito dalla relazione:

$$r^*(t) = [(t / t_p) \exp(1 - t / t_p)]^{(n-1)} \quad (2.4.2)$$

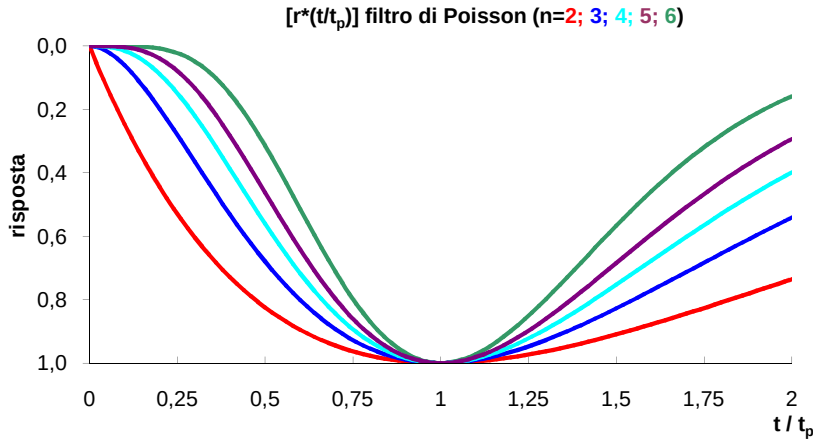


Figura 2.4.3. Grafico della risposta del filtro di Poisson in funzione di t / t_p per diversi stadi di *delay*.

La relazione (2.4.2) esprime la funzione di risposta normalizzata (Fig.2.4.3) in cui t è il tempo in secondi, $t_p = (n-1)\tau$ ($\tau = \text{costante di tempo}$ del filtro) è il tempo al picco della risposta ed n è il numero di stadi. E' naturale evidenziare che la linearità del primo processo deriva dalla linearità dell'uscita del filtro: raddoppiando l'intensità del flash raddoppia la risposta.

Fin qui i due modelli proposti da Baylor e da Penn e Hagins si equivalgono; le differenze sostanziali si riscontrano nei valori di t_p : rispettivamente 190 ms per l'uno e 173 per l'altro e nel numero di stadi: 6 per Baylor e 4 per Penn ed Hagins.

Per ciò che concerne la risposta $R(I, t)$ della componente lineare Baylor propone:

$$R(I, t) = IR_{\max} / [I + (K_a / r^*(t))] \quad 2.4.3$$

e Penn e Hagins:

$$R(I, t) = [1 - \exp(-I \ln 2 r^*(t) / K_a)] R_{\max} \quad 2.4.4$$

In entrambe le equazioni K_a è la costante di semisaturazione per la funzione di risposta e di solito si misura in scot td-sec^7 . Nonostante la diversità funzionale, le eqq. (2.4.3) e (2.4.4) risultano, dal punto di vista grafico, funzioni con andamento simile, con valori di K_a poco differenti. La Figura 2.5.4 mostra gli andamenti delle funzioni $R(I, t)$ descritte dalle eqq.(2.4.3) e (2.4.4).

Una modellizzazione più recente dell'attività recettoriale è frutto degli studi di Lamb e Pugh [26-27]. Tale modello descrive la risposta di un singolo bastoncello in funzione del numero di isomerizzazioni e del tempo, come è espresso dalla relazione:

$$R(\Phi, t) \cong [1 - \exp(-\Phi / 2[(t - t_{\text{eff}}) / t_\Phi]^2)] R_{\max} \quad 2.4.5$$

⁷ Per le unità di misura si rimanda all'Appendice 1.

valida per $t > t_{\text{eff}}$ dove Φ è il numero di isomerizzazioni per bastoncello, t_{eff} è il tempo effettivo di ritardo t_{Φ} è la costante di tempo caratteristico della trasduzione. t_{Φ} è il risultato del prodotto di tre parametri caratteristici che rappresentano, in questo modello, il guadagno dei tre step primari della trasduzione.

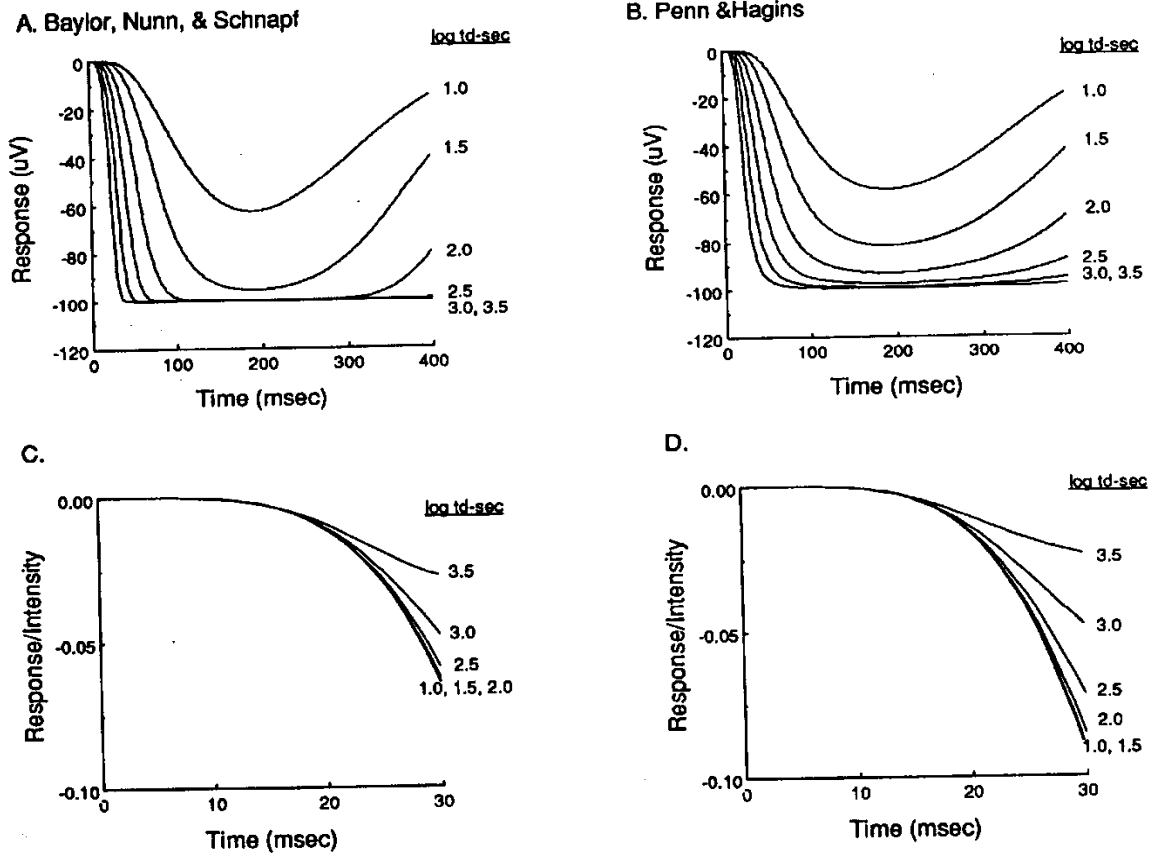


Figura 2.4.4 Risposte recettoriali predette dai modelli di Baylor (A,C) e di Penn e Hagins (B,D). (A,B) descrivono $R(I,t)$ per 400 ms per 6 flash di intensità diversa; (C,D) i primi 30 ms di $R(I,t)$ diviso l'energia del flash. Per un flash di 10 μsec , l'ordinata dovrebbe essere moltiplicata per 10^{-5} per essere in termini di intensità [25].

Anche in quest'ultimo modello la funzione R di risposta è rappresentata da una funzione esponenziale che satura in funzione dell'intensità luminosa. Lamb e Pugh forniscono solamente la descrizione del *rising edge* dell'onda a . In riferimento all'eq. (2.4.2), è possibile notare che, con particolari sostituzioni, le eqq. (2.4.2) e (2.4.5) sono praticamente indistinguibili per i primi 20 ms circa.

Una teoria emergente, la *cyclic GMP cascade theory*, coinvolge gli eventi molecolari che intervengono tra l'isomerizzazione della molecola del pigmento a causa dell'assorbimento di un quanto di luce e la variazione della conduttanza della membrana prodotta da un potenziale recettoriale. In questo contesto i modelli precedenti possono essere inseriti. Infatti la

componente lineare può rappresentare la catena di processi biochimici innescati dall'assorbimento del quanto luminoso; mentre quella non lineare rende conto delle non-linearità dovute al numero limitato di canali sensibili alla luce.

Uno dei limiti dei modelli citati è la sovrastima della risposta recettoriale per tempi brevi ed alte intensità. Gli studiosi collegano questo allontanamento dalle previsioni del modello alle proprietà elettriche della membrana recettoriale, cioè alle limitazioni propriamente cinetiche nell'evoluzione dei processi biochimici che alterano la conduttanza della membrana causando un comportamento sempre più non lineare ad alte intensità.

2.5 SIMULAZIONE NUMERICA DELL'ONDA A IN SOGGETTI SANI [28]

La risposta dei fotorecettori viene descritta da un modello che descrive i passaggi biochimici della fototrasduzione come un processo ad n-fasi. Il primo componente di questo modello è un processo lineare, con un impulso di risposta (filtro a cinque-sei-stadi), seguito da una funzione statica non lineare. Una forma semplificata di questo modello, è rappresentata da una funzione gaussiana ritardata nel tempo [26, 29]. Tuttavia, il modello gaussiano, adatto a descrivere l'evoluzione temporale della risposta dei bastoncelli, diventa inefficiente all'aumentare dell'intensità luminosa. Vari studi biologici hanno spiegato questo fatto con possibilità di interazioni e/o correlazioni tra i fotorecettori o con modelli alternativi della fototrasduzione [30-32]. Infatti, ad elevata luminanza il numero di coni coinvolti nel processo fototrasduttivo non è più trascurabile e la risposta della retina comincia ad avere contributi sia dai bastoncelli che dai coni [33]. Quest'ultimo punto è stato oggetto di innumerevoli studi biologici riguardanti la possibilità dell'esistenza di un'interazione diretta cellula-cellula tra coni e bastoncelli [30-32]. Queste interazioni giocano un ruolo rilevante nell'abbassamento della soglia della risposta che consente la visione anche in presenza di scarsa illuminazione [28].

Negli ultimi anni sono stati proposti molti metodi non tutti applicati al contesto umano [34, 33, 35], per isolare il contributo delle varie popolazioni cellulari della retina: 1) l'esame della parte molto precoce della risposta ad un flash al fine di analizzare la fotocorrente; 2) l'applicazione di flash ad alta energia per estrarre l'onda *a* che è solo parzialmente oscurata dalla successiva onda *b*; 3) la soppressione farmacologica delle risposte di gruppi cellulari selezionati; 4) il blocco selettivo farmacologico della trasmissione del segnale; 5) l'analisi degli

effetti del blocco delle attività delle cellule gangliari; 6) l'adattamento della popolazione di cellule retiniche tramite backgrounds stazionari; 7) la modellizzazione dell'andamento temporale della risposta al flash.

Nel simulare la risposta della retina umana di soggetti sani è anche stata ipotizzata la possibilità di una cascata di attività fotorecettoriali casuali e/o correlate [28]. Ciò implica che coni e bastoncelli possano interagire gli uni con gli altri attraverso connessioni intracellulari. Per questo motivo, il set di funzioni, considerate a tal fine, include funzioni in grado di descrivere anche processi con una distribuzione di probabilità *non gaussiana*, cioè in grado di descrivere attività che sono inizialmente indipendenti e correlate in tempi successivi.

Per descrivere interazioni tra eventi di diversa natura un mixing, una convoluzione di funzioni di distribuzione o l'uso di funzioni di funzioni complesse può rivelarsi una valida alternativa. Il fatto che alcune di queste funzioni (distribuzione logistica, *extreme value*, log normale, loro combinazioni) siano in ottimo accordo con i dati sperimentali dimostra che questi sono il risultato di fenomeni complessi. Le conclusioni derivanti dalla modellizzazione numerica hanno rappresentato un ulteriore passo verso la comprensione di un aspetto peculiare dei processi sottostanti le prime fasi della fototrasduzione.

I risultati delle simulazioni hanno evidenziato che le correlazioni sono efficaci nei segmenti iniziali dell' *onda a* mentre, quando viene considerato un intervallo di tempo più esteso, i processi casuali tendono a stabilirsi ed a predominare. In conclusione si può affermare che nel segmento iniziale dell' *onda a* e nel suo segmento temporale più lungo si innescano fenomeni di diversa natura statistica.

Le correlazioni nella porzione iniziale dell' *onda a* costituiscono la misura di una risposta pronta e sensibile ad un impulso luminoso. Quando la risposta si è stabilizzata, le correlazioni tra i centri di ricezione non sono più necessarie e la risposta assume un carattere casuale.

Ulteriori indagini sono necessari al fine di acquisire una conoscenza migliore della connessione tra le implicazioni fisiologiche racchiuse nelle funzioni proposte, i modelli relativi e gli esperimenti sulle fasi iniziali della fototrasduzione.

2.6 SIMULAZIONE NUMERICA DELL'ONDA A PATOLOGICA

[36, 37]

Al fine di chiarire i ruoli dei coni e dei bastoncelli nell'evoluzione temporale della risposta retinica, un buon approccio consiste nell'uso di luce monocromatica come stimolo luminoso [34, 33, 35]. Tuttavia, questo metodo permette di isolare la risposta di un singola componente fotorecettoriale, ma non è esente da difficoltà oggettive. Le principali sono riassunte dai punti seguenti.

-  Il protocollo per isolare i contributi dei coni da quelli attribuiti ai bastoncelli è efficace solo se i dati disponibili sono sufficienti per una derivazione rigorosa delle variabili della fototrasduzione dei coni e dei bastoncelli. Per raggiungere questo obiettivo, infatti, sono necessarie almeno otto differenti intensità del flash.
-  L'analisi della risposta a luce monocromatica non implica che l'altra famiglia di fotorecettori, anche se non eccitata, non possa interferire.
-  I valori di riferimento per le variabili della fototrasduzione dei coni e dei bastoncelli sono ottenuti mediando e sottraendo la componente dei coni dalle risposte mixate coni-bastoncelli.

Un approccio alternativo per isolare ed individuarne le peculiarità delle singole risposte fotorecettoriali è rappresentato dall'analisi di tracciati di pazienti con patologie selettive a carico di una delle due famiglie di fotorecettori. Gli obiettivi principali di tale analisi sono: a) verificare che la poca aderenza del modello gaussiano a livelli elevati di luminosità è dovuta al fatto che il contributo dei coni è non trascurabile, b) ottenere parametri caratteristici per i tracciati patologici, c) estrarre informazioni utili per la diagnosi e per la individuazione dello stadio di evoluzione di patologie progressive della retina.

Esistono degli individui ai quali manca (o comunque non funziona) un tipo di coni o anche due, o addirittura tutti e tre. Il *tricromate anormale* è un soggetto nella cui retina sono presenti tutti e tre i tipi di coni, ma un tipo di coni presenta delle anomalie, il soggetto *dicromate* o *daltonico* è un soggetto caratterizzato dall'assenza di funzionalità di un tipo di coni, ed infine il soggetto *monocromate* è afflitto da cecità cromatica totale o *Acromatopsia* (ACR)⁸. Il termine *Acromatopsia*⁹ (dal greco: *a* privativa, *croma* colore e *opsis* vista) letteralmente “impossibilità di

⁸ In Italia esiste una Associazione Acromati Italiani, il sito web ufficiale www.acromatopsia.it

⁹ Curiosità: il neurologo Oliver Sacks ha scritto un libro sugli abitanti di un'isola della Micronesia colpiti da una strana forma di acromatopsia, dal titolo *L'isola dei senza colore*.

vedere i colori”, è una malattia ereditaria dovuta ad una perdita della funzionalità dei coni. Quest’ultima anomalia è molto rara¹⁰, interessa 3 soggetti su 100.000. Soggetti affetti da ACR sono quasi completamente daltonici¹¹ (vedono tonalità di grigio) e hanno acutezza visiva molto ridotta (scarsa visione dei dettagli da lontano). I loro occhi non si adattano in maniera *normale* ad alti livelli di illuminazione dato che la visione è affidata ai bastoncelli che “saturano” in conseguenza di una forte esposizione alla luce.

In generale, l’ACR si distingue in: acromatopsia congenita (presente fin dalla nascita e non degenerativa), distrofia dei coni (o acromatopsia degenerativa con progressiva perdita della funzione dei coni), acromatopsia cerebrale (causata da lesioni della corteccia visiva, per traumi o patologie). In particolare, l’ acromatopsia congenita, oggetto dell’analisi di questo capitolo, può presentarsi in varie forme.

Acromatopsia completa (monocromatismo dei bastoncelli totale): la forma più grave in cui i coni non funzionano completamente.

Acromatopsia incompleta (monocromatismo dei bastoncelli parziale): una forma in cui una parte dei coni funziona ancora. Il numero dei coni residui può variare moltissimo da un soggetto all’altro.

Monocromatismo dei coni blu: una parte dei coni funziona e sono tutti del tipo sensibile al blu.

La varietà e variabilità dei sintomi insieme alle differenti origini genetiche richiede, per verificare l’ipotesi diagnostica di un eventuale acromatopsia congenita, oltre i normali esami oculistici anche alcuni esami specifici. Tra questi, l’ERG assume un ruolo decisivo grazie alla sua potenzialità di registrare la funzionalità fotorecettoriale

La *Congenital Stationary Night Blindness* (CSNB) è una rara malattia retinica, ereditaria non-progressiva (stazionaria) a carico dei bastoncelli. Esistono tre modelli di trasmissione ereditaria: autosomica dominante, recessiva e recessiva legata all’X. I pazienti CSNB hanno una nitidezza ridotta della visione, cecità notturna e difficoltà di adattamento alle condizioni di scarsa luminosità a causa della compromissione della trasmissione fotorecettoriale.

¹⁰ Secondo una stima effettuata negli Stati Uniti d’America viene colpita una persona ogni 33.000, pertanto secondo questo dato in Italia stimiamo circa 2.000 persone affette da acromatopsia.

¹¹ *Daltonico* deriva dal nome del chimico inglese John Dalton (1766-1844) che nel 1794 diede una descrizione scientifica della propria visione alterata dei colori nell’articolo “Extraordinary facts relating to the vision of colors”.

Allo scopo di dimostrare che l'analisi di un'onda a patologica può fornire informazioni utili per valutare sia la corretta attività di ognuna delle due popolazioni fotorecettoriali sia per testare le ipotesi circa le loro risposte caratteristiche, è stato esteso il precedente studio [28]. a pazienti affetti dalle patologie fotorecettoriali testé descritte.

La Figura 2.6.1 riporta ERG appartenenti a tre gruppi di soggetti, registrati secondo le modalità già esposte nel paragrafo 2.2.1. Il pannello superiore mostra sei ERG di soggetti non affetti da patologie oculari (soggetti normali), utilizzati per il confronto con sei soggetti affetti da ACR (pannello centrale) e otto pazienti CSNB (pannello inferiore).

Le differenze principali tra un ERG normale ed uno patologico possono essere così riassunte:

-  I due dips, presenti nell'ERG normale, sono sostituiti da un solo minimo il cui tempo di occorrenza è successivo a quello relativo al primo dip dei normali. L'assenza del secondo dip e il ritardo temporale dell'unico presente, sono indicativi di una risposta più lenta causata dal mancato funzionamento di una popolazione fotorecettoriale.
-  Per i soggetti normali, la parte finale delle onde *a* è influenzata dall'onset della successiva *onda b*. Quest'ultima è assente nei tracciati dei pazienti CSNB a causa del comportamento anomalo dei bastoncelli, che non permette la trasmissione del segnale verso gli strati interni della retina, mentre nei pazienti ACR subisce una riduzione evidente.

La Figura 2.6.1 permette, inoltre, di dedurre informazioni circa il range di variabilità interindividuale per ciascuna categoria. In particolare, la variabilità degli ERG *normali* è maggiore di quella dei patologici dal momento che, in quest'ultimo caso, il numero e la diversificazione dei centri attivi è minore. Il range dei parametri normali è quindi più ampio di quello dei pazienti patologici.

Poiché la componente iniziale dell'ERG (*onda a*) è una combinazione delle attività elettriche dei fotorecettori essa può essere considerata una mappatura statistica dello stato funzionale generale della retina. Seguendo quest'ultima assunzione, i tracciati patologici sono stati interpolati con un set di funzioni già utilizzate per interpolare *onde a* normali a differenti valori di luminanza [28].

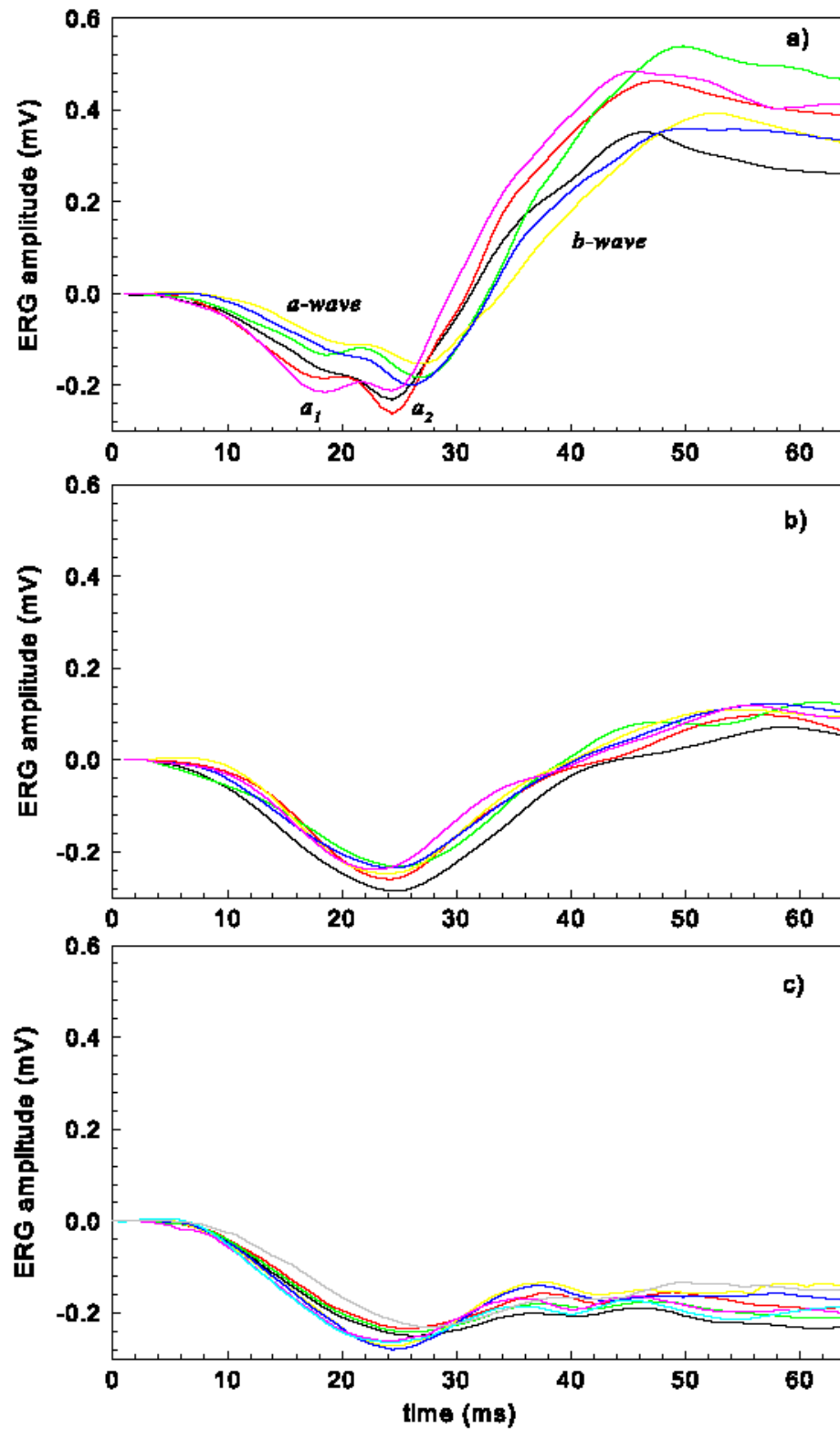


Figura 2.6.1. ERG di soggetti differenti registrati nelle medesime condizioni sperimentali. (a) ERG appartenenti a 6 soggetti non affetti da patologie oculari; (b) ERG appartenenti a 6 soggetti affetti da ACR e (c) ERG appartenenti a 8 soggetti affetti da CSNB.

Inoltre, per descrivere la forma caratteristica dell'onda a CSNB, i tracciati sono stati anche interpolati con una funzione del tipo *Landau-Symon-Vavilov* (LSV, vedi Tavola 2.6.1) [40, 41], che può essere considerata un'estensione asimmetrica di una funzione gaussiana. In effetti, se $(t - t_{\min})$ è prossimo allo zero, il profilo della LSV è simile a quella di una Gaussiana¹²; invece, quando $(t - t_{\min})$ diventa apprezzabile, i due profili tendono a differenziarsi. Normalmente, la LSV, funzione asimmetrica, è utilizzata per descrivere la perdita di energia quando la radiazione colpisce un mezzo assorbente sottile. La lunga coda presente nella parte alta della distribuzione di probabilità della perdita di energia, a cui si deve il profilo asimmetrico, deriva dalla possibilità, anche se rara, di trasferimenti di grande energia in una singola collisione. In questo caso, come conseguenza della presenza di fluttuazioni nel numero di collisioni subite, nonché della quantità di energia trasferita in ogni collisione, la perdita di energia più probabile può differire significativamente dal valore medio.

Tavola 2.6.1: Set di funzioni utilizzate per fittare i dati sperimentali: $R(t)$ è il potenziale misurato sulla cornea, t il tempo dopo l'onset dello stimolo, $R_{\max}$ l'ampiezza massima della risposta, $t_{\min}$ il tempo di insorgenza del dip nella risposta. Il parametro t_A (costante temporale caratteristica della fototrasduzione), rappresenta il guadagno degli stadi nella trasduzione e prende in considerazione la luminanza retinica.

Gaussian	$R(t) = R_{\max} \exp \left[-\frac{(t - t_{\min})^2}{2t_A^2} \right]$
Logistic amplitude	$R(t) = \frac{2R_{\max} \exp \left[-\frac{(t - t_{\min})}{t_A} \right]}{1 + \exp \left[-\left(\frac{t - t_{\min}}{t_A} \right)^2 \right]}$
Sigmoid	$R(t) = \frac{2R_{\max}}{1 + \exp \left[-\frac{(t - t_{\min})}{t_A} \right]}$
Extreme value	$R(t) = R_{\max} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{(t - t_{\min})}{t_A} \right] - \left[\frac{t - t_{\min}}{t_A} \right] + 1 \right\}$
LSV-type	$R(t) = R_{\max} \exp \left\{ \frac{1}{2} \times \left[1 - \frac{(t - t_{\min})}{t_A} - \exp \left(-\frac{(t - t_{\min})}{t_A} \right) \right] \right\}$

Ogni funzione utilizzata per l'interpolazione è caratterizzata da tre parametri (vedere Tavola 3.6.1) che consentono di minimizzare la distanza tra il modello da essa rappresentato e i dati sperimentali.

¹² Un'espansione di Taylor del secondo ordine di $\exp [-(t - t_{\min})/t_A]$ permette di recuperare il comportamento gaussiano quando $(t - t_{\min})$ è vicino a zero.

Tutte le procedure di interpolazione sono state eseguite grazie a programmi implementati *ad hoc* in grado di interpolare i dati sperimentali minimizzando la radice dell'errore quadratico medio (RMS) e fornire i valori dei parametri caratteristici dei best fit. I punti dei tracciati sperimentali fino a 1,95 ms sono stati esclusi dall'analisi in quanto sono di solito disturbati dagli effetti del flash sull'elettronica di acquisizione.

Nell'interpolazione, il tempo di cut-off è stato fissato approssimativamente a 30 ms. Questo valore, adeguato al valore di luminanza usato nell'acquisizione dati, è anche un compromesso tra la necessità di ridurre il contributo dell' *onda b* e quello di analizzare una porzione temporale *di onda a* quanto più possibile estesa.

Per testare la bontà dei tracciati nell'intervallo temporale di interesse è stato utilizzato il criterio Statfit [35], che conferma che i dati non sono rumorosi. L'errore RMS è definito come la media degli errori RMS calcolata individualmente per ogni tracciato in una serie [33]. In tal modo, questo approccio statistico fornisce un peso uguale a ogni risposta. La stessa procedura è stata applicata anche per valutare i valori dei parametri del modello.

Dal momento che nella patologia ACR, i bastoncelli sono i soli fotorecettori attivi correttamente, appare opportuno interpolare la risposta con l'approssimazione gaussiana del modello fototrasduzione [26-29] e infatti la Figura 2.6.2, relativa ai pazienti affetti da ACR, mostra che i tracciati sono ben interpolati da una gaussiana. Il pannello (a) riporta la serie dei dati sperimentali (rappresentati dai simboli) e i loro best fit (linea continua). La statistica dei parametri ACR (media $\pm$ deviazione standard, DS) è riportata nella Tavola 2.6.2.

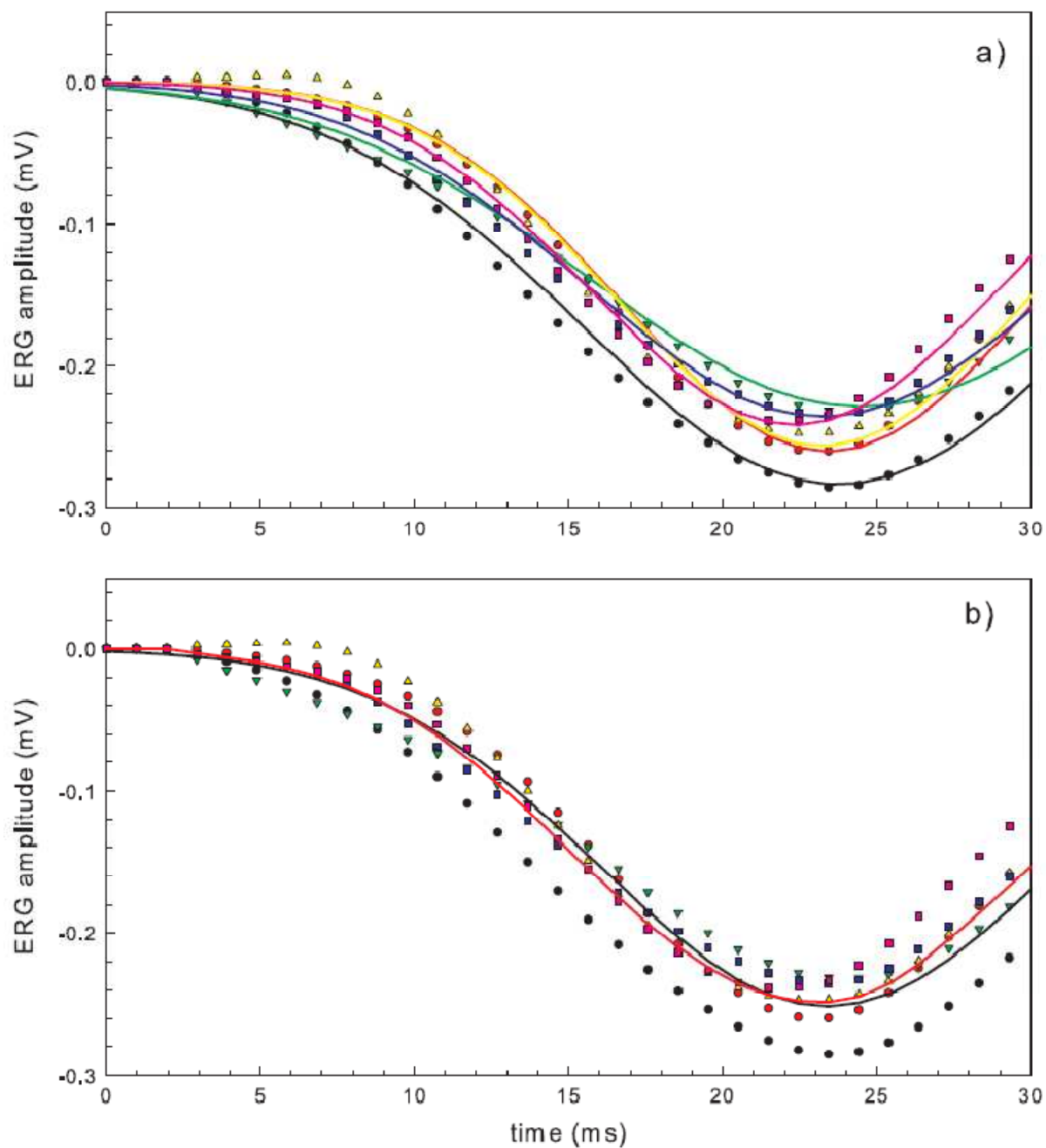


Figura 2.6.2. (a) ERG (troncati a 30 ms), appartenenti a sei soggetti ACR (simboli) e le loro corrispondenti curve di interpolazione ottenute con una funzione gaussiana (linea continua), (b) punti sperimentali (simboli), curva calcolata con la media dei migliori parametri di best fit (linea nera continua) e curva rappresentante la media dei tracciati sperimentali (linea rossa).

Tavola 2.6.2 Valori medi e deviazioni standard dei parametri ottenuti dall'interpolazione di *onde a* ACR

Parametro	media $\pm$ DS	Unità
$R_{\max}$	-0.252 ± 0.021	mV
t_{Λ}	7.42 ± 0.97	Ms
$t_{\min}$	23.41 ± 0.71	Ms
RMS	$0,0043 \pm 0,0024$	mV

Per visualizzare l'effettiva bontà dell'interpolazione, il pannello (b) di Figura 2.6.2 permette di confrontare la curva calcolata con questi parametri (linea nera) con la curva che rappresenta la media delle tracciati sperimentali (linea rossa). Il modello fornisce un'appropriata valutazione dei valori dei parametri riguardanti l'intensità ed il ritardo temporale del dip.

La Figura 2.6.3 si riferisce ai pazienti affetti da CSNB. L'analisi condotta dimostra che la funzione che meglio si adatta questi tracciati non è più una gaussiana, dal momento che l'interpolazione con una funzione tipo LSV produce valori di RMS minori di quelli trovati sia con la gaussiana, sia con altre tipologie di funzioni. La curva continua riportata nel pannello (a) rappresenta l'interpolazione dei dati sperimentali con una funzione del tipo LSV. I parametri statistici relativi ai tracciati patologici CSNB (media $\pm$ DS) sono riportati nella Tavola 2.6.3. L'efficacia dell'interpolazione è mostrata nel pannello (b) che mette a confronto la curva calcolata con questi parametri (linea nera) con la curva che rappresenta la media dei tracciati sperimentali (linea rossa).

Tavola 2.6.3 Valori medi e deviazioni standard dei parametri ottenuti dall'interpolazione di *onde a* CSNB

Parametro	media $\pm$ DS	Unità
$R_{\max}$	$-0,250 \pm 0,015$	mV
t_{Λ}	$8,59 \pm 0,65$	Ms
$t_{\min}$	$26,30 \pm 1,71$	Ms
RMS	$0,0036 \pm 0,0019$	mV

Per evidenziare la migliore aderenza ai dati sperimentali della funzione LSV, in Figura 2.6.4 si confronta il best fit di un tracciato rappresentativo dei CSNB ottenuto con la LSV (linea continua) con quello ottenuto utilizzando l'approssimazione gaussiana (linea tratteggiata). Con il modello gaussiano, i parametri CSNB (media $\pm$ DS) sono molto simili a quelli ottenuti con la funzione LSV, vedi Tavola 2.6.4, ad eccezione del fatto che l'errore RMS è circa il doppio del valore ottenuto con la funzione LSV.

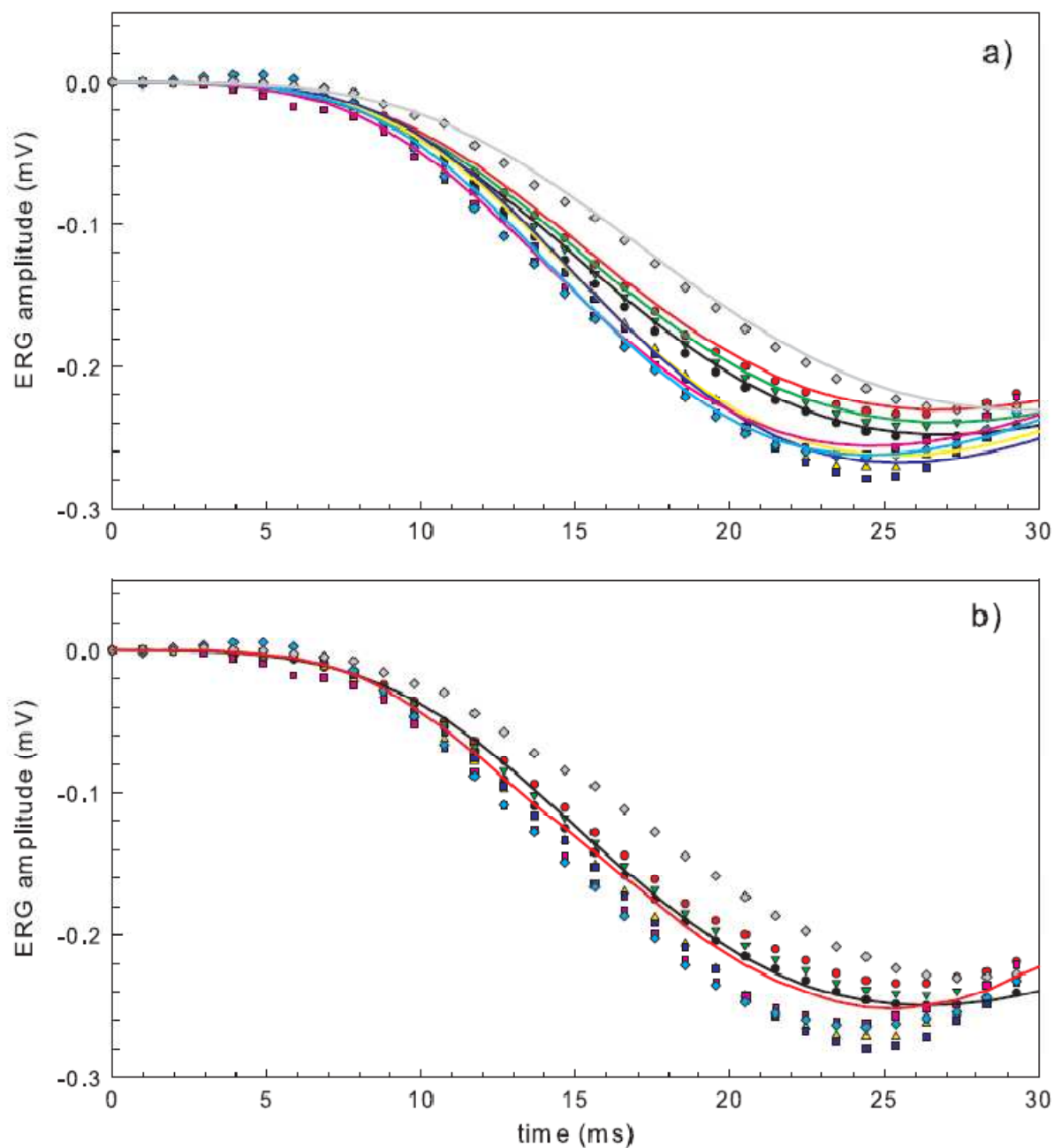


Figura 2.6.3. (a) ERG (troncati a 30 ms), appartenenti a otto soggetti CSNB (simboli), e loro corrispondenti curve di interpolazione con funzioni del tipo Landau-Symon-Vavilov-like (linea continua), (b) punti sperimentali (simboli), curva calcolata con la media dei parametri di best-fit (linea nera continua) e curva rappresentante la media delle tracce sperimentali (linea rossa)

Tavola 2.6.4 Valori medi e deviazioni standard dei parametri ottenuti dall'interpolazione di *onde a* CSNB

Parametro	Media $\pm$ DS	Unità
$R_{\max}$	$-0,258 \pm 0,019$	mV
t_{Λ}	$8,30 \pm 0,29$	Ms
$t_{\min}$	$25,51 \pm 1,00$	Ms
RMS	$0,0068 \pm 0,0020$	mV

Un esame del best fit utilizzando il modello gaussiano rivela che quest'ultimo non è appropriato a simulare i tracciati sperimentali. È evidente infatti che, come conseguenza della asimmetria dei tracciati sperimentali, il modello gaussiano non è aderente alla forma delle *onde a* CSNB. Sebbene ciò possa essere una conseguenza del fallimento delle assunzioni circa i processi biochimici, come discusso in [33], una spiegazione più semplice può essere fornita riconsiderando la validità delle ipotesi specifiche formulate nel derivare questa approssimazione per i coni. La constatazione che una funzione con una forma diversa si adatta meglio ai dati sperimentali implica che un certo numero di fasi supplementari nella foto cascata sono necessarie al fine di ottenere un modello corretto del processo precoce della fototrasduzione. Ciò rispecchia le differenze fisiologiche e morfologiche tra coni e bastoncelli.

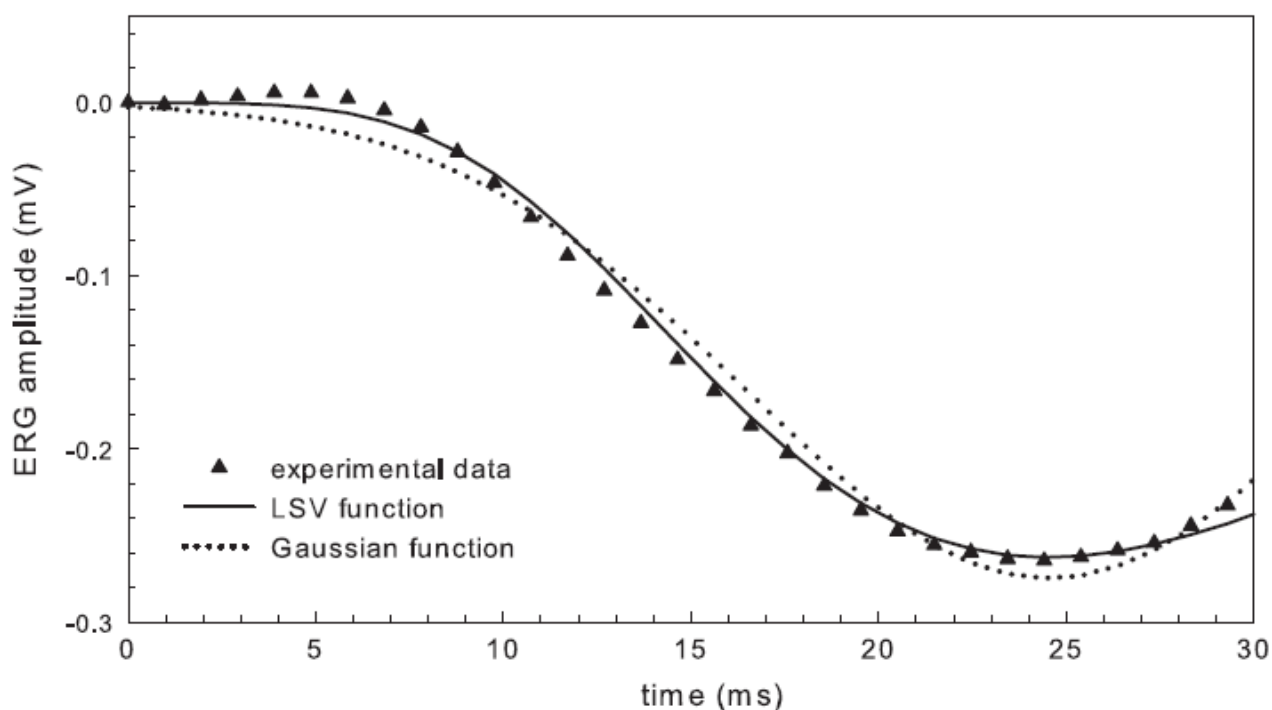


Figura 2.6.4. ERG di un soggetto rappresentativo dei tracciati CSNB (simboli) e sua corrispondente curve di interpolazioni con la funzione Landau-Symon-Vavilov (linea continua) e con la funzione gaussiana (linea tratteggiata).

In conclusione, l'analisi statistica della risposta fotorecettoriale di soggetti affetti da due particolari patologie che colpiscono una sola popolazione fotorecettoriale ha permesso di analizzare separatamente i contributi all'ERG delle due popolazioni fornendo una spiegazione fisica dei primi stadi del processo della fototrasduzione.

Nei soggetti normali, se la luminosità è inferiore a una certa soglia, la risposta scotopica ad un flash luminoso può essere attribuita ai soli bastoncelli; se, invece, è superiore, ai coni e bastoncelli. Nel primo caso l'approssimazione gaussiana è appropriata, nel secondo no e diventa necessaria la ricerca di modelli alternativi.

Nella patologia ACR, dove i fotorecettori sani sono i bastoncelli, l'*onda a* è adeguatamente interpolata dalla funzione gaussiana, anche se con valori dei parametri diversi rispetto a quelli ottenuti nei soggetti normali.

I risultati della procedura di simulazione dei tracciati patologici CSNB hanno mostrato che la funzione più appropriata per l'interpolazione è una *LSV-like*. Tale constatazione può essere giustificata dal fatto che l'evoluzione temporale della risposta dovuta ai coni coinvolge ulteriori fasi nel processo di fototrasduzione.

La caratterizzazione funzionale della risposta fotorecettoriale in soggetti patologici, così come in quelli sani, poiché riproduce le diverse caratteristiche dei tracciati, permette di identificarne le origini fotorecettoriali. I valori dei parametri che descrivono le caratteristiche della corrispondente *onda a* possono, dunque, essere utilizzati per implementare un database e migliorare la capacità diagnostica. In un contesto clinico, infatti, i risultati ottenuti per quanto riguarda i disturbi stazionari che comportano la mancanza di attività di una popolazione fotorecettoriale, sono utili per individuare lo stadio evolutivo di altre patologie progressive, come la *retinite pigmentosa*, in cui una particolare popolazione sta gradualmente perdendo la sua funzionalità.

Quest'analisi deve essere considerata un primo passo e necessita, pertanto, di ulteriori indagini riguardanti le peculiarità dell'*onda a* ed in particolare la sua dipendenza dalla luminanza. L'analisi *wavelet*, riportata nel capitolo successivo, fornisce un primo set di risposte a questi quesiti.

2.7 ANALISI WAVELET DELLA RISPOSTA

FOTORECETTORIALE DI SOGGETTI SANI [42, 43]

Nei paragrafi precedenti sono state analizzate le peculiarità dell'onda *a* direttamente deducibili dal diagramma temporale mediante un approccio simulativo. Pur tuttavia, altre caratteristiche non sono evidenti e necessitano di tecniche analitiche specifiche per la loro rivelazione. Questo capitolo presenta la WA come approccio metodologico per rivelare le caratteristiche tempo-frequenza dell'onda *a* dell'ERG umano. Esso ha il duplice scopo di individuare le componenti tempo-frequenza di risposte di soggetti normali in funzione del valore di luminanza e, successivamente, confrontarle con quelle di pazienti affetti da particolari patologie fotorecettoriali. Inoltre, eventuali anomalie dell'onda *a* non sono sempre immediatamente rilevabili dal diagramma temporale mediante un'analisi obiettiva dell'ERG, di conseguenza, la possibilità di distinguere tracciati patologici da sani attraverso la differenziazione delle loro caratteristiche tempo-frequenza, rappresenta un progresso nelle indagini diagnostiche.

Finora le più recenti applicazioni delle tecniche di wavelet in elettrofisiologia hanno riguardato la separazione delle componenti dell'ERG clinico [44] e l'analisi delle dinamiche dei potenziali oscillatori nella risposta retinica del topo [9].

In un soggetto normale l'onda *a* è caratterizzata da due minimi attribuiti alle attività di coni e bastoncelli [28, 36, 45]. La forma del tracciati ed il valore relativo degli estremi dipendono in modo apprezzabile dalla luminanza. Infatti, in condizioni di alta luminosità, il primo *dip* predomina rispetto al secondo; la luminanza viene ridotta, questa predominanza tende a svanire e i due minimi sembrano fondersi in un unico minimo; in corrispondenza ad un'ulteriore riduzione della luminanza, quando il peso relativo dei due minimi si inverte. Inoltre al decrescere della luminanza, i valori degli estremi si riducono.

Altri fattori possono influenzare la risposta della retina, tra questi: la frequenza del flash e l'adattamento al buio o alla luce. La risposta dei fotorecettori è complessa, infatti talvolta essi rispondono separatamente all'assorbimento della luce, sotto altre circostanze interagiscono; tutti questi comportamenti dipendono principalmente dall'adattamento e dal valore della luminanza. Purtroppo, nonostante la complessità del comportamento fotorecettoriale, in condizioni adeguate è possibile discriminare tra la risposta dei coni e quella

dei bastoncelli. Nei paragrafi precedenti è stato mostrato come una attività mancata o patologica di una popolazione fotorecettoriale abbia una ricaduta morfologica nei tracciati elettroretinografici, tanto da dover giustificare l'utilizzo di funzioni di simulazione differenti da quelle utilizzate per simulare tracciati appartenenti a soggetti sani.

Si è deciso di procedere con la WA allo scopo di integrare le informazioni acquisite con indicazioni riguardanti aspetti peculiari non noti della risposta dei fotorecettori e le l'accensione delle loro attività in funzione della luminanza.

Per questo studio è stato selezionato un campione di 10 ERG registrati da soggetti sani [42]. Le modalità di acquisizione del segnale sono state già presentate; i dati sono stati campionati con una frequenza di Nyquist di 2560 Hz e memorizzati in formato ASCII per la successiva analisi. L'intervallo di tempo di interesse per il presente lavoro si estende per circa 30 ms.

Poiché ogni wavelet è caratterizzata da una propria dipendenza dalla variabile temporale, l'applicazione di un tipo di wavelet o altro può evidenziare differenti caratteristiche del segnale nel dominio tempo-frequenza. Per l'applicazione corrente, la scelta della wavelet madre più idonea è stata preceduta da un'analisi preliminare volta a selezionare la funzione che meglio aderisce alla forma dei dati elettroretinografici. Sulla base di lavori precedenti [8, 28], è stata scelta la Mexican Hat (MHW, derivata seconda della funzione gaussiana), come wavelet madre appropriata per l'analisi delle forme d'onda caratteristiche dell'onda *a*. Inoltre, la sua forma è caratterizzata da un piccolo numero di oscillazioni periodiche che insorgono e decadono entro l'intervallo temporale di interesse. A differenza di altre wavelet ampiamente utilizzate (Haar, Morlet), le cui forme non sono simili alle tracciati tipici dell'onda *a*, la MHW, fornisce risultati in buon accordo con l'analisi preliminare di Fourier e si è rivelata uno strumento appropriato nel rilevamento e localizzazione delle caratteristiche del segnale nelle regioni di attività stazionarie che corrispondono ai minimi o massimi. La Mexican Hat è continua e non ortogonale, ed è definita da:

$$MHW(t, \tau, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \left[1 - \left(\frac{t-\tau}{\sigma} \right)^2 \right] e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{t-\tau}{\sigma} \right)^2} \quad 2.7.1$$

Il campione utilizzato per questa indagine è presentato in Figura 2.7.1. Il pannello a) mostra i 10 tracciati registrati in condizioni di più alta luminosità $\text{Log}(I/I_0) = +1.5$; il pannello b) la dipendenza dalla luminanza dell'onda *a* appartenente ad un soggetto scelto come rappresentativo del campione.

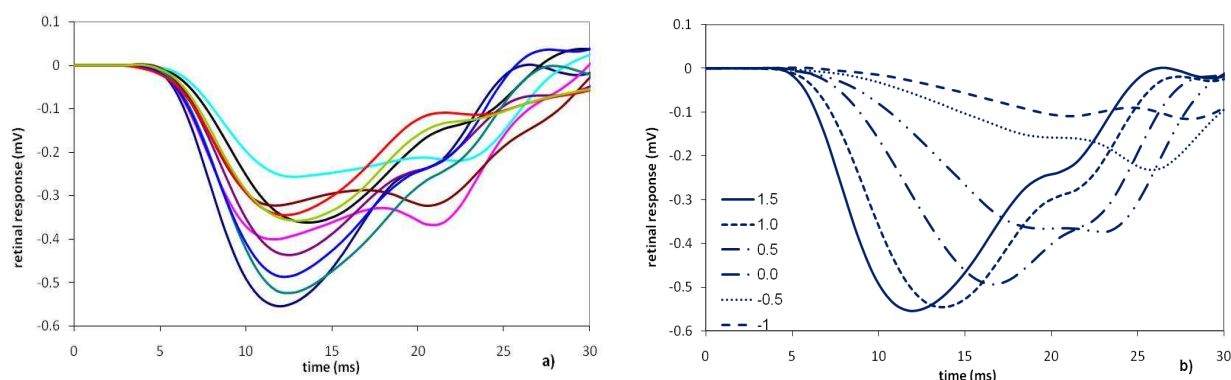


Figura 2.7.1: a) Campione di tracciati elettroretinografici normali registrati in condizioni di massima luminanza ($\text{Log}(I/I_0) = +1.5$) e troncati a 30 ms; b) ERG rappresentativo del campione registrato con sei valori di luminanza nel range $+1.5 \div -1$ di $\text{Log}(I/I_0)$.

L'analisi wavelet è stata preceduta da una preliminare analisi di Fourier (FFT) mirata a selezionare il range di frequenze contenute nello spettro dei tracciati in esame. Figura 2.7.2 riporta i valori medi dei coefficienti FFT calcolati al valore massimo di luminanza $\text{log}(I/I_0)=1.5$ per il campione di tracciati normali mostrati in Figura 2.7.1a. Lo spettro FFT relativo, mostra una componente dominante di alta intensità a bassa frequenza (~ 20 Hz), presente in tutti i tracciati, ed altre componenti a frequenza più alta, i cui coefficienti sono sensibilmente minori. Non sono state trovate componenti maggiori di 240 Hz, in accordo con l'evidenza sperimentale che l'onda *a* è un segnale a bassa frequenza. L'inserto, presente in Figura 2.7.2, rappresenta uno zoom del range ad alta frequenza e mostra la percentuale di soggetti in cui ogni componente di frequenza è presente. Abbiamo limitato l'analisi dei tracciati a 180 Hz poiché frequenze superiori, presenti in numero minore di tracciati, sono

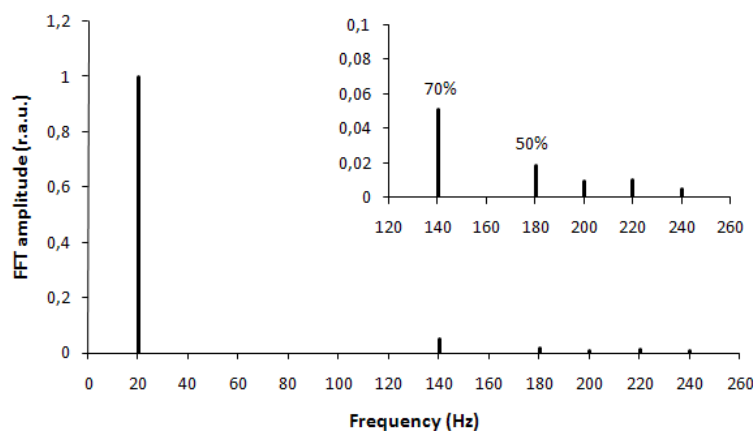


Figura 2.7.2. Valori medi dei coefficienti di FFT (normalizzati al loro valore massimo), calcolati per il campione di tracciati sani mostrato in Figura 2.7.1.a. L'inserto è uno zoom del range di alte frequenze e riporta la percentuale di soggetti in cui ogni componente di frequenza è presente.

caratterizzate da valori di intensità molto bassa (circa 2%) e sono indistinguibili dal rumore.

Un argomento dibattuto tra gli esperti di wavelet riguarda la modalità di presentazione dei risultati fondamentale per la loro immediata interpretazione. Per facilitare la visualizzazione dei risultati, tra le diverse possibilità di presentazione, si è scelto di calcolare il valore assoluto di $WT(\sigma, \tau)$ normalizzandolo al suo valore massimo per ogni valore di luminanza [8, 9, 11]. I risultati sono così ottenuti in termini di $WT_{abs}(\sigma, \tau)$ definito da:

$$WT_{abs}(\sigma, \tau) = \frac{abs(WT(\sigma, \tau))}{\max [abs(WT(\sigma, \tau))]} \quad 2.7.2$$

La distribuzione temporale del contenuto spettrale dell'onda è mostrata come *contour plot* (valori minimi in viola, valori massimi in bianco) di $WT_{abs}(f, \tau)$ dove f indica la frequenza. I moduli di correlazione sono espressi, in scala di tonalità rosa, in termini di scalogramma con il relativo modulo normalizzato rispetto al valore di picco per ogni valore di luminanza. La WA dei tracciati mostra la correlazione esistente con il MHW attraverso l'esistenza di cluster negli scalogrammi [8, 9, 11].

La Figura 2.7.3 mostra il risultato della WA eseguita sulle forme d'onda rappresentate in Figura 2.7.1b, entro l'intervallo temporale di 30 ms. I sei pannelli riportano i moduli di correlazione nel range di frequenza 10-240 Hz lungo l'intero intervallo temporale considerato. Al di là di questo range non sono stati rivelati ulteriori componenti stabili di frequenza, in accordo con quanto trovato con l'analisi di Fourier. Ogni plot mostra un massimo dominante (cluster bianco) e uno o due massimi locali. Ogni massimo è caratterizzato da un valore di frequenza ed un tempo di occorrenza.

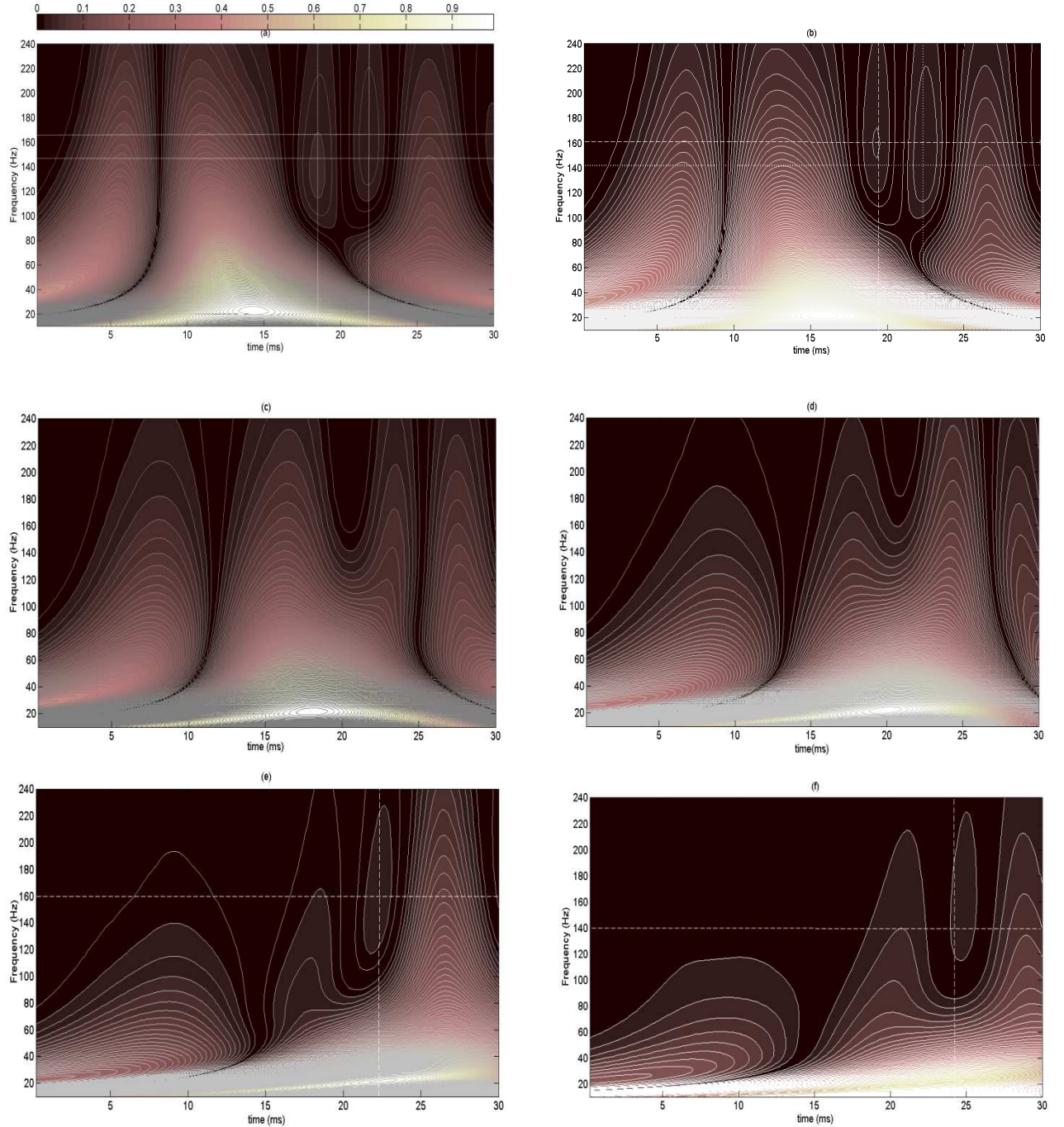


Figura 2.7.3. Comportamento spettrale di uno dei tracciati mostrati in Figura 1. I pannelli da (a) a (f) si riferiscono ai tracciati registrati nel range $+1.5 \div -1$ di $\text{Log}(I/I_0)$. I pannelli mostrano l'ampiezza della trasformata nel range da 10 a 240 Hz lungo il tempo come scalogramma. Una scala di colori tendenti al bianco denota le componenti di frequenza dominanti, il cluster rosa denota altre componenti nell'intervallo di tempo considerato. Le linee identificano le coordinate dei massimi locali. I contour plot sono stati ottenuti tramite il toolbox Wavelet di MatLab.

Un caratterizzazione generale dell'onda a , in grado di spiegare la coerenza delle dinamiche tra i vari soggetti, è fornita dall'analisi dei valori del tempo di occorrenza e delle componenti stabili di frequenza effettuata sull'intero campione di dati. Questa analisi dimostra

che, per ogni valore di luminanza è possibile individuare due o tre componenti di frequenza, indicate con f_0 , f_1 e f_2 .

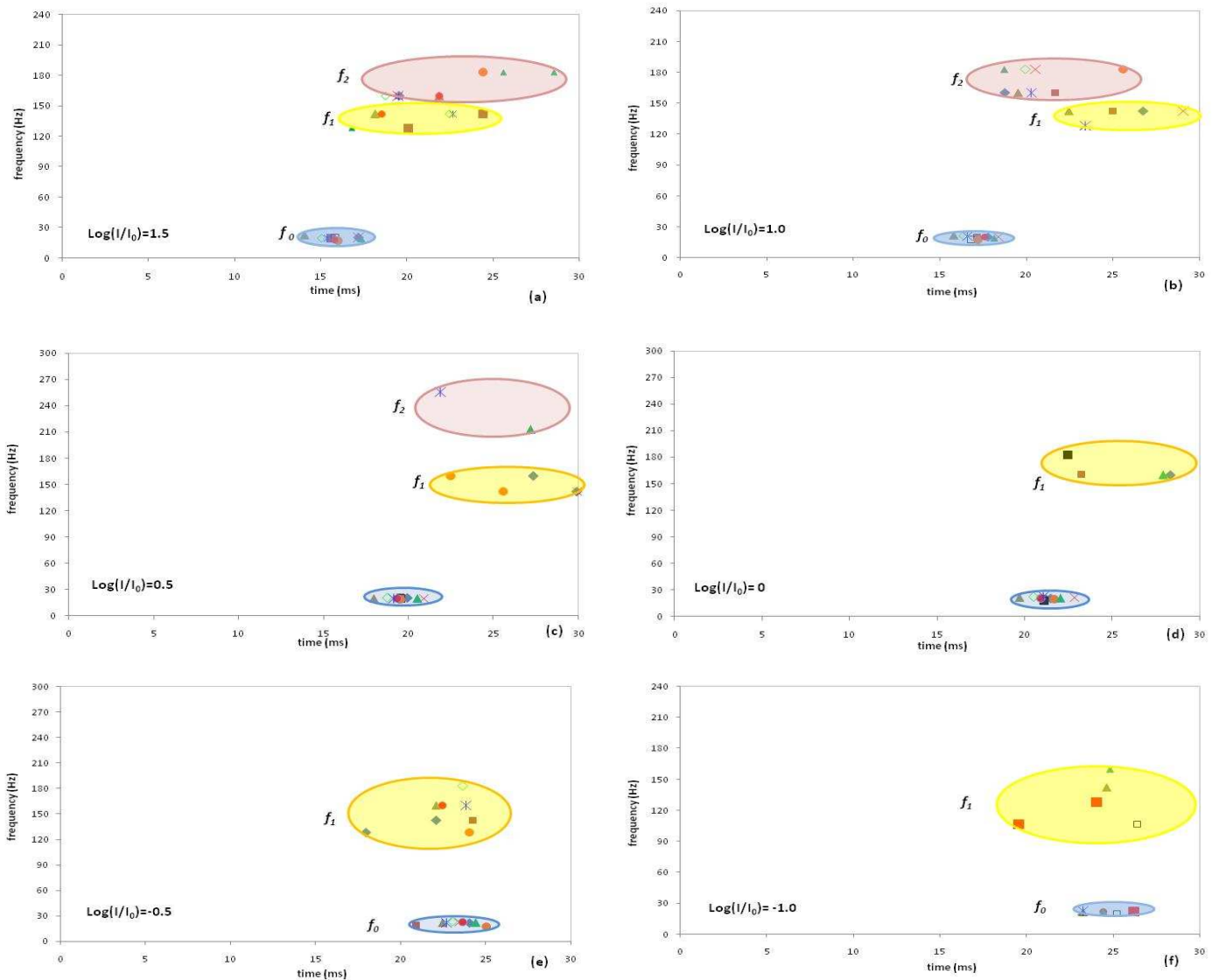


Figure 2.7.4 Distribuzione della latenza e frequenza delle componenti stabili. I sei pannelli, relativi ai sei valori di luminanza, riportano i dati dell'intero set di tracciati. Le tre componenti f-t stabili sono distinte per colore: rosa denota le componenti a più alta frequenza, giallo quelle a media, blu quelle a più bassa frequenza.

La Figura 2.7.4 ne riporta la distribuzione e la mappa di latenza. In particolare la componente a più bassa frequenza, f_0 è sempre presente ed è caratterizzata da una piccola variabilità, mentre le frequenze più alte, f_1 e f_2 , sono presenti in un numero inferiore di tracciati ed hanno tempi di occorrenza più distribuiti. Inoltre, per i valori di luminanza inferiori a $\text{Log}(I/I_0) = 0.5$, f_2 non è presente. Un quadro più chiaro delle dinamiche che caratterizzano la risposta fotorecettoriale si ha analizzando l'evoluzione temporale dei valori medi della frequenza in funzione della luminanza come mostrato in Figura 2.7.5.

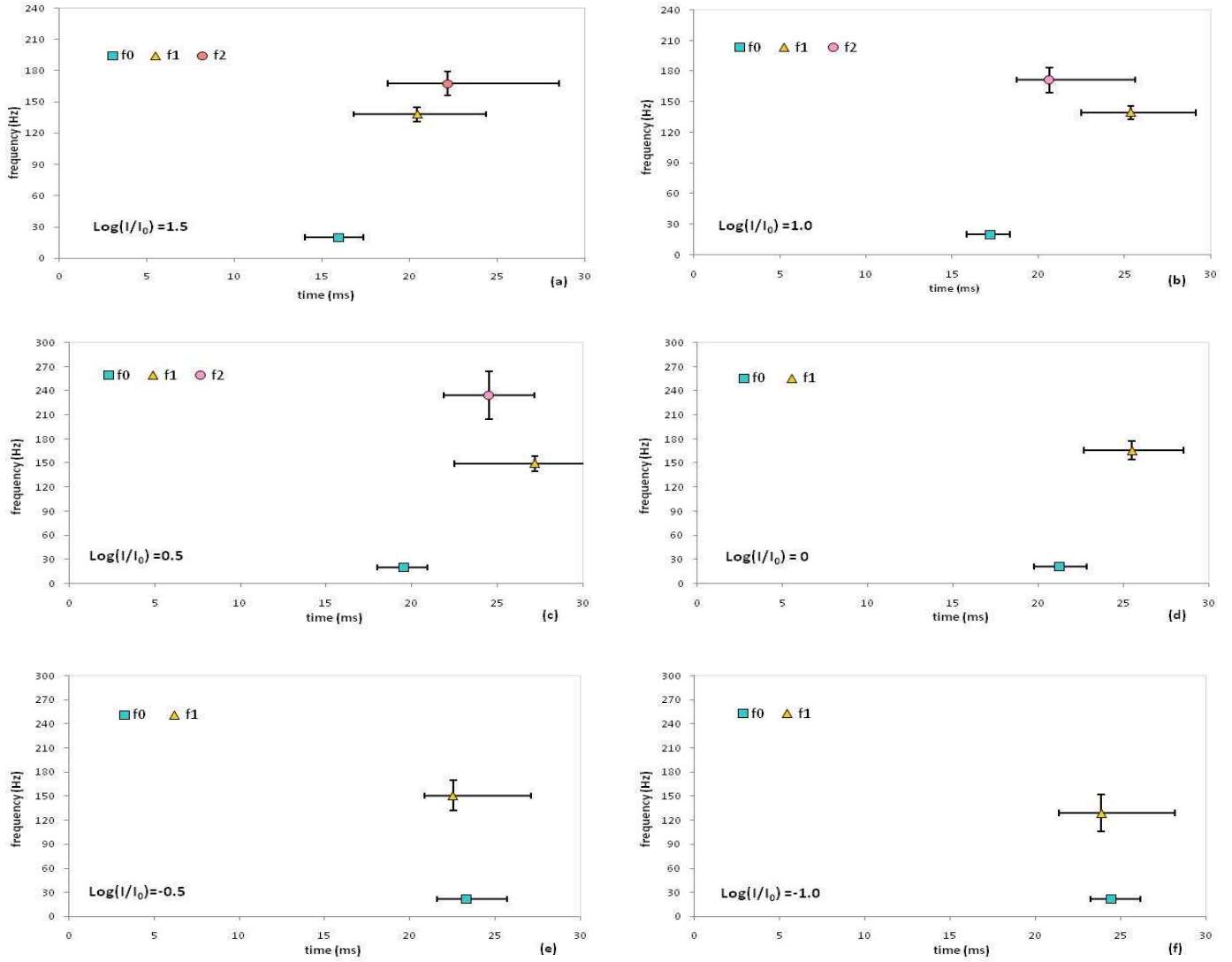


Figura 2.7.5 Frequenze medie ad ogni valore di luminanza, (a) $\text{Log}(I/I_0) = 1.5$ e così via. Le barre d'errore indicano una deviazione standard. I valori medi per ogni valore di luminanza possono contenere un numero differente di punti. Le barre d'errore temporale rappresentano il range entro il valore minimo e massimo del tempo di occorrenza delle frequenze estratte dall'analisi wavelet.

Le barre di errore, relative alla frequenza corrispondono ad una deviazione standard (SD), mentre quelle legate al tempo indicano l'intervallo di variabilità dei tempi di insorgenza. Questa scelta è giustificata dal fatto che una risposta fisiologica (“normale” di un soggetto sano) specifica avviene entro un intervallo di tempo piuttosto che in un particolare istante. Inoltre, un set di tracciati non patologici mostra una variabilità maggiore nell'evoluzione temporale della risposta fisiologica rispetto ad uno patologico costituito da tracciati più omogenei tra loro (accomunati dalla medesima patologia).

Al valore più alto di luminanza, l'ordine temporale delle tre componenti di frequenza è f_0, f_1 e f_2 , tale sequenza cambia a seguito di una riduzione di luminosità. Infatti, per i valori di luminanza inferiori a $\text{Log}(I/I_0) = 1.5$ e maggiori di $\text{Log}(I/I_0) = 0$, le componenti f_1 e f_2

scambiano la loro posizione temporale. Infine, quando il valore di luminanza è inferiore a $\text{Log}(I/I_0) = 0$, f_2 scompare e f_1 tende a precedere f_0 .

E' possibile fare delle assunzioni sulle origini delle tre componenti rivelate. Per quanto riguarda f_0 , essa viene associata alla “somma” delle attività fotorecettoriali, il suo valore tiene conto della distribuzione temporale dell'ammontare di fotorecettori eccitati. Inoltre, considerando la forma dell'intera risposta come una semionda, $1/2f_0$ può essere inteso come una misura della larghezza temporale del processo stocastico di fototrasduzione. Una interpretazione di f_1 and f_2 può essere formulata tenendo in conto delle peculiarità di risposta dei fotorecettori. f_1 può essere attribuita ai bastoncelli che, come è noto, rispondono a bassi valori di luminanza. La presenza di f_2 all'aumentare della luminanza, può essere connessa con l'insorgenza del contributo alla risposta dovuto all'attività dei coni. Ulteriore conferma è l'evidenza che essendo la risposta dei coni più veloce di quella dei bastoncelli, la frequenza ad essi associata è la più elevata.

Infine, il particolare l'andamento temporale di tali frequenze è compatibile con il fatto che sono attive popolazioni diverse, ciascuna caratterizzata da un proprio comportamento tempo-frequenza. La relazione tra i risultati, circa la dipendenza dalla luminanza ed i meccanismi di base che caratterizzano l'attivazione delle due famiglie fotorecettoriali, rimane comunque complessa.

Una valutazione complessiva dell'andamento delle tre componenti in funzione dell'aumentare della luminanza è data dall'analisi dei loro valori medi riportati in Figura 2.7.6 nella quale è evidente, tra l'altro, l'andamento quasi costante di f_0 , coerentemente con il fatto che l'ampiezza temporale dell'onda a non dipende apprezzabilmente dal valore di luminosità.

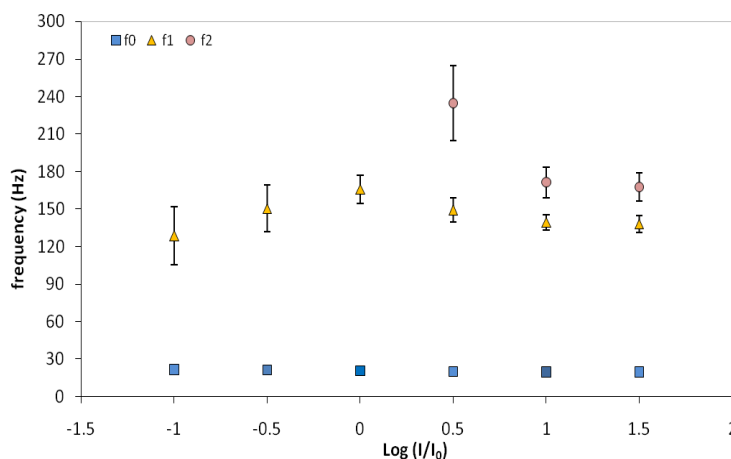


Figura 2.7.6 Valori medi delle frequenze in funzione dell'intensità luminosa. I quadrati si riferiscono alla frequenza dominante f_0 , i triangoli a f_1 e i cerchi a f_2 . Le barre d'errore corrispondono ad una deviazione standard.

Per quanto riguarda i valori delle altre due frequenze, essi dipendono dalla luminanza come segue:

- 🖨 al valore di luminanza pari a $\text{Log} (I/I_0) = 0$ si verifica un cambiamento del trend delle frequenze in funzione dell'intensità della luce;
- 🖨 f_2 compare per valori di luminanza maggiori di $\text{Log} (I/I_0) = 0$ e il suo valore decresce quando la luminosità viene aumentata;
- 🖨 sia f_1 che f_2 sono caratterizzate da un più ampio range di variabilità rispetto a quello di f_0 .

In particolare, dato che una variazione di luminosità determina solo una variazione del numero di fotorecettori eccitati, le cui caratteristiche dovrebbero essere stabili (trattandosi di fotorecettori sani), uno spostamento di frequenza può essere interpretato come un'insorgenza di correlazioni tra di essi. Tali correlazioni hanno così effetti di ricaduta sui valori di entrambe le componenti in frequenza. Inoltre, la riduzione delle barre di errore con l'aumentare della luminanza risente di due contributi, uno dovuto alla riduzione del rumore intrinseco al segnale, l'altro connesso con il comportamento peculiare dei fotorecettori, che tendono a rispondere in modo tanto più coerente in soggetti differenti quanto più è elevata la luminosità.

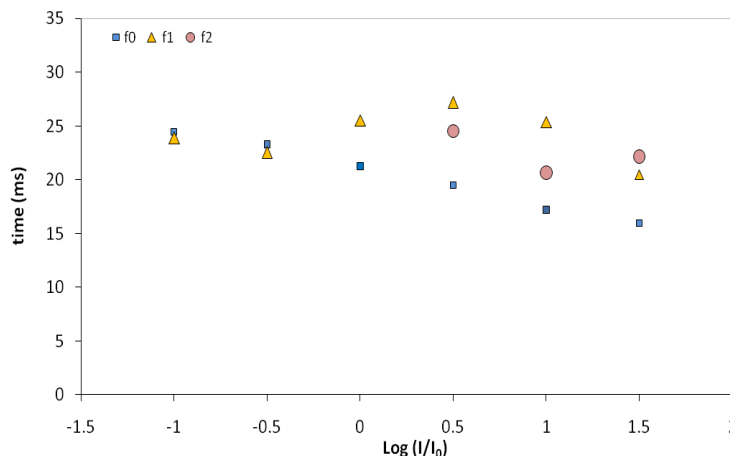


Figura 2.7.7 Valori medi dei tempi di occorrenza delle frequenze in funzione della luminanza. I quadrati si riferiscono alla frequenza dominante f_0 , i triangoli a f_1 e i cerchi a f_2 . Le barre d'errore corrispondono ad una deviazione standard.

Per completare in modo esaustivo l'analisi delle dinamiche proprie delle tre componenti occorre valutare i loro tempi di occorrenza in funzione della luminanza (vedi Figura 2.7.7). L'apprezzabile shift dell'onda *a* verso tempi maggiori in corrispondenza ad una riduzione di luminanza, appare nella WT come un aumento del tempo di occorrenza di f_0 . Una certa

erraticità si manifesta nei tempi di occorrenza di f_1 e f_2 ; pertanto una spiegazione complessiva sarà possibile con l'acquisizione di altri tracciati.

Considerazioni dal punto di vista statistico possono essere dedotte consultando la Tavola 2.7.1 che fornisce dati utili sui parametri statistici coinvolti in questa analisi. In essa sono riportati i coefficienti di variazione (CV), il numero di presenze (*Appearances*) delle componenti stabili di frequenza (in quanti soggetti di un gruppo una certa frequenza può essere identificata), i valori percentuali dei loro contributi. I valori di CV, definiti in base a $CV = 100 * SD / \text{media}$, permettono di valutare e confrontare la variabilità tra i diversi soggetti. Il valore del coefficiente CV in un processo casuale (come il processo a cascata della fototrasduzione dovrebbe essere) è 100. I valori numerici trovati in questa analisi sono sensibilmente inferiori. Questo fatto conferma che la fototrasduzione è un processo meno casuale di quanto ci si dovrebbe aspettare [46]. La soppressione della variabilità può essere legata all'ipotesi che un fotopigmento attivato è coinvolto in un processo alquanto più complesso di un brusco shut-off. Inoltre, la presenza di meccanismi non lineari multistep, come correlazioni e interazioni tra fotorecettori, può produrre una riduzione della variabilità [36, 47].

Tavola 2.7.1 Coefficienti di variabilità (CV), appearances (App.) e contributo percentuale (weight %) delle componenti stabili di frequenza estratte dai 10 tracciati di soggetti normali.

<i>Lum. [Log(I/I₀)]</i>	<i>Freq.</i>	<i>CV(Freq)%</i>	<i>App.%</i>	<i>Weight %</i>
-1	f_0	5.17	100	96.12
	f_1	17.9	90	3.88
	f_2	----	----	----
-0.5	f_0	7.90	100	97.22
	f_1	12.48	90	2.78
	f_2	----	----	----
0	f_0	7.24	100	98.05
	f_1	6.89	40	1.95
	f_2	----	----	----
0.5	f_0	2.89	100	96.54
	f_1	6.52	50	2.54
	f_2	12.86	20	0.92
1	f_0	7.45	100	94.86
	f_1	4.56	50	3.63
	f_2	7.13	80	1.51
1.5	f_0	7.35	100	94.53
	f_1	5.02	70	3.59
	f_2	6.82	90	1.88

Al fine di valutare il peso relativo delle componenti di frequenza nella ricostruzione del segnale, è stato calcolato il loro contributo percentuale nella WT. Da ciò risulta una diminuzione dell'ammontare del contributo percentuale di ciascuna componente di frequenza all'aumentare del valore della frequenza. Il valore assoluto dei coefficienti della WT, calcolato per f_1 and f_2 , può essere infine correlato con la percentuale di fotorecettori attivati, coni e bastoncelli, rispettivamente.

Dalla tavola 2.7.2, che mostra i valori normalizzati di questi coefficienti, si nota che all'aumentare della luminanza corrisponde un incremento anche della quantità di fotorecettori attivati.

Tavola 2.7.2 Valori normalizzati dei coefficienti del valore assoluto di WT calcolati per f_1 and f_2 .

$Lum. [Log(I/I_0)]$	f_1	f_2
-1.0	0.405	---
-0.5	0.414	---
0	0.435	---
0.5	0.662	0.239
1	1.00	0.416
1.5	0.949	0.496

2.8 ANALISI WAVELET DELLA RISPOSTA

FOTORECETTORIALE PATOLOGICA [48-49]

Disordini nel sistema fotorecettoriale causano alterazioni nella catena dei processi fisiologici, che scaturiscono a seguito della fotorilevazione, e si ripercuotono sull'intera risposta del sistema. Al fine di migliorare la conoscenza dei meccanismi legati alla risposta retinica e su come questi siano influenzati dalla malattia, è stata focalizzata l'attenzione sulle caratteristiche tempo-frequenza delle due patologie fotorecettoriali già discusse nei paragrafi precedenti (par. 2.5).

Nella prima parte di questo paragrafo vengono analizzate tramite l'uso della WA e confrontate con tracciati normali, 8 *onde a* appartenenti ai pazienti affetti da ACR incompleta

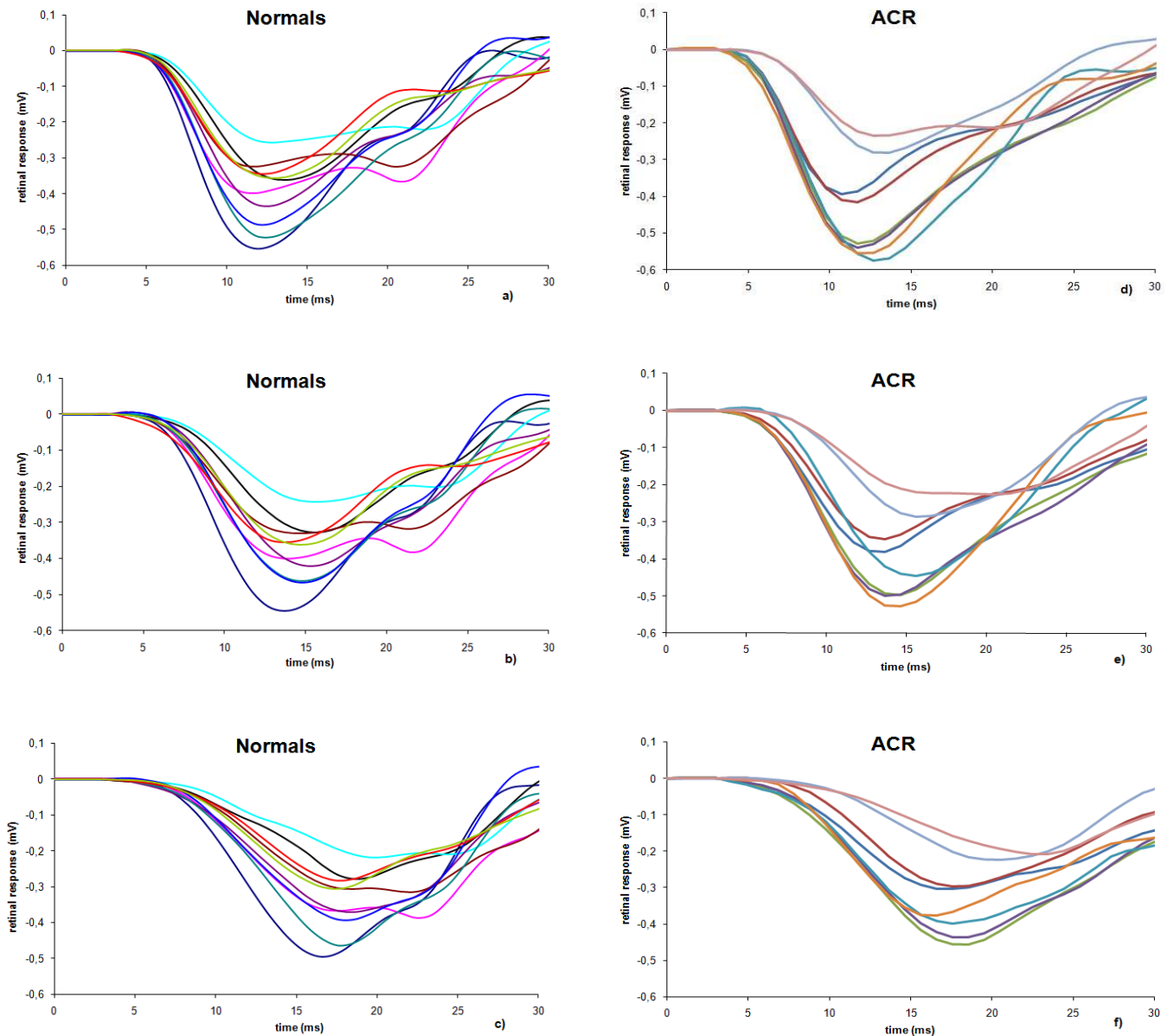


Figura 2.8.1. Campione di tracciati elettroretinografici (troncati a 30 ms) appartenenti a soggetti sani registrati per differenti valori di luminanza: a) $\log(I/I_0) = +1.5$; b) $\log(I/I_0) = 1.0$; c) $\log(I/I_0) = 0.5$. I tracciati patologici registrati agli stessi valori di luminanza sono mostrati nei pannelli d), e) ed f) rispettivamente

per i valori di luminanza +1.5, +1.0, +0.5 in quanto altri dati non erano disponibili per problemi tecnici legati al metodo di acquisizione [48]. La Figura 2.8.1 mostra nei pannelli a, b e c i tracciati normali e in d, e ed f i patologici. Sebbene nei pazienti ACR sia evidente una

piccola riduzione dell'onda *b*, una netta distinzione tra i tracciati normali e patologici non è sempre immediata.

Analogamente alla precedente analisi sui normali, l'analisi wavelet sui tracciati patologici è stata preceduta da un'analisi di Fourier. Anche in questo caso (vedi Figura 2.8.2) è evidente la presenza di un massimo dominante a bassa frequenza (~20 Hz), presente in tutti i tracciati, e di altre componenti a frequenza più alta, i cui coefficienti sono sensibilmente minori. Le considerazioni fatte nell'analisi dei tracciati normali restano valide con l'eccezione che in questo caso la percentuale di presenze è notevolmente ridotta.

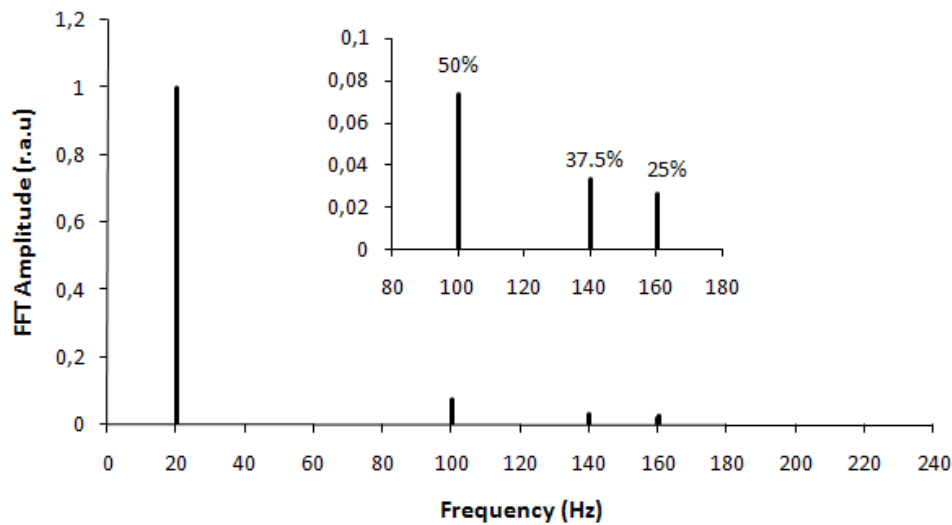


Figura 2.8.2. Valori medi dei coefficienti di FFT (normalizzati al loro valore massimo), calcolati per i campione di tracciati ACR mostrato in Figura 2.8.1.d. L'inserito è uno zoom del range di alte frequenze e riporta la percentuale di soggetti in cui ogni componente di frequenza è presente.

La Figura 2.8.3 permette il confronto tra il comportamento spettrale di un soggetto normale e quello di uno patologico, per gli stessi valori di luminanza di Figura 2.8.1. I sei pannelli riportano le ampiezze della trasformata wavelet nel range 10-240 Hz in funzione del tempo come linee di contorn-plot.

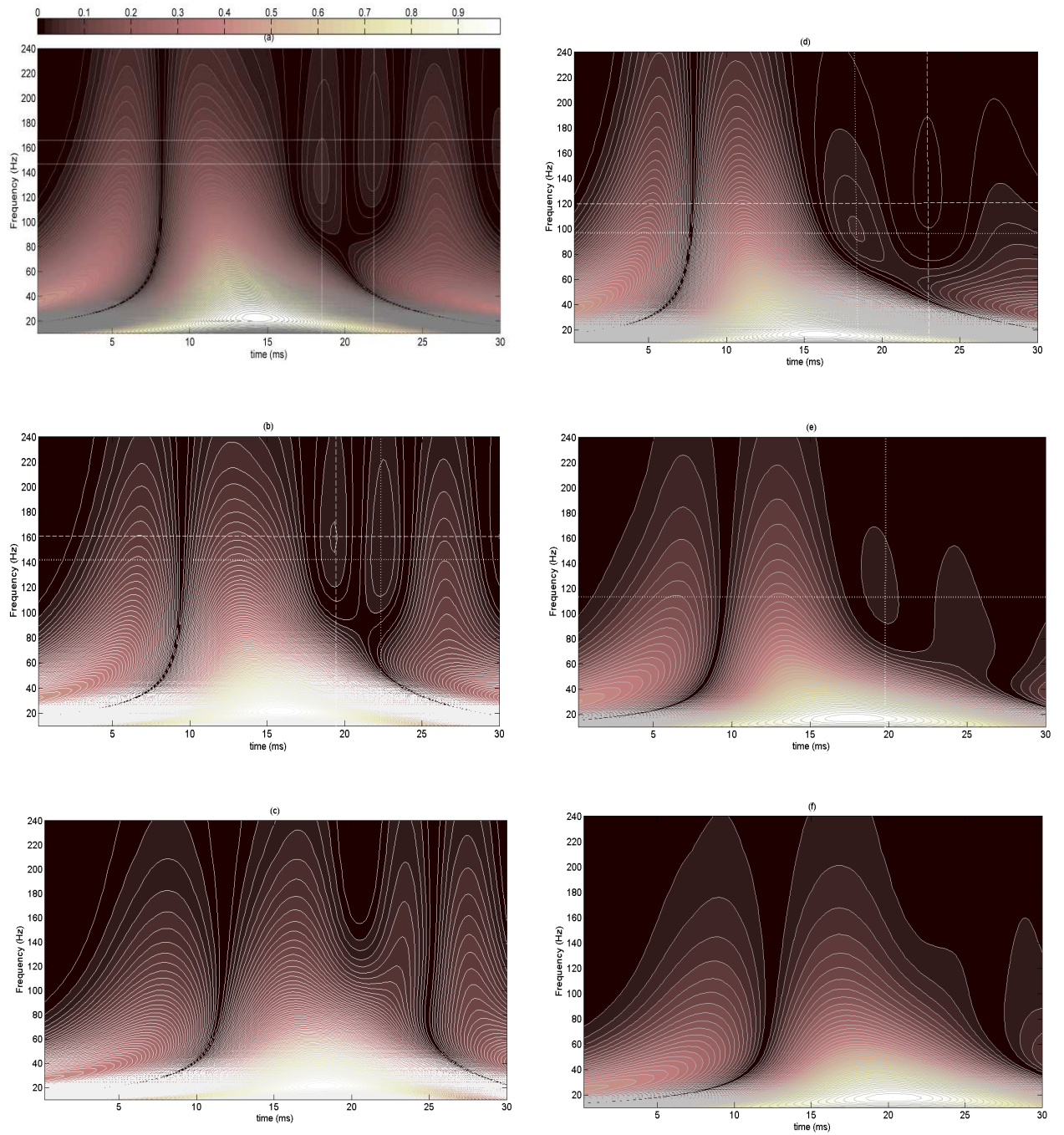


Figura 2.8.3: Comportamento spettrale di uno dei tracciati mostrati in Figura 3.5.1. I pannelli a), b) and c) si riferiscono ad un tracciato normale; pannelli d), e) and f) ad uno ACR. I pannelli mostrano l'ampiezza della trasformata nel range da 10 a 240 Hz lungo il tempo come scalogramma. Le linee identificano le coordinate dei massimi locali. I contourn plot sono stati ottenuti tramite il toolbox Wavelet di MatLab.

Al di là della gamma di frequenze riportata, non sono state trovate ulteriori componenti stabili di frequenza, in accordo con l'evidenza sperimentale che l'onda *a* è un segnale a bassa frequenza. Ancora una volta, ogni plot è caratterizzato da un massimo dominante (cluster bianco, indicato con f_0) e uno o due massimi locali (denotati f_1 e f_2). Le caratteristiche di tali frequenze (numero, intensità, frequenza e distribuzione temporale) dipendono dalla luminosità e sono diverse nei soggetti normali e nei patologici

I sei pannelli di Figura 2.8.4 riportano, per soggetti sani e per soggetti patologici, i valori medi delle tre frequenze stabili, i loro tempi di occorrenza e la loro dipendenza dalla luminanza. Le barre di errore corrispondono ad una deviazione standard (SD).

Le informazioni tempo-frequenza fornite dalla WA, non ottenibili con tradizionali tecniche di indagine spettrale, impediscono di confondere due frequenze vicine nelle due serie, come ad esempio, f_1 nell'insieme di soggetti sani e f_2 nei pazienti ACR per $\text{Log}(I/I_0) = 1.5$. Un confronto tra i risultati relativi allo stesso valore di luminanza, mostra che le due serie rivelano solo piccole variazioni in f_0 . Si riscontrano, invece, differenze apprezzabili in f_1 e f_2 . In particolare, nel caso patologico sono evidenti due effetti:

-  una generale riduzione dei valori di frequenza media;
-  l'assenza di f_2 quando $\text{Log}(I/I_0) < 1.5$.

La frequenza più bassa f_0 , associata con le attività cumulative dei fotorecettori, tiene conto della distribuzione temporale del numero di fotorecettori eccitati.

Le frequenze più alte f_1 and f_2 sono legate ai contributi dei fotorecettori e alle loro peculiarità. Nel caso patologico, f_2 è presente solo al più elevato valore di luminanza, anche se sensibilmente spostata verso valori più bassi. Una spiegazione globale deve considerare che, come mostrato in [28, 30, 31] le risposte dei coni e dei bastoncelli si influenzano reciprocamente. Supponendo che una ridotta popolazione di coni possa ancora contribuire alla risposta, è necessario un valore molto elevato di luminanza per rendere apprezzabile f_2 . Di conseguenza, il ritardo temporale osservato in f_2 patologica indica un comportamento anomalo dei coni residui. A valori più bassi di luminanza, il loro contributo tende a diventare irrilevante e f_2 non è più apprezzabile. Inoltre, f_1 non è più spostata verso valori più alti dalla rapida risposta dei coni e tende, invece, verso frequenze più basse.

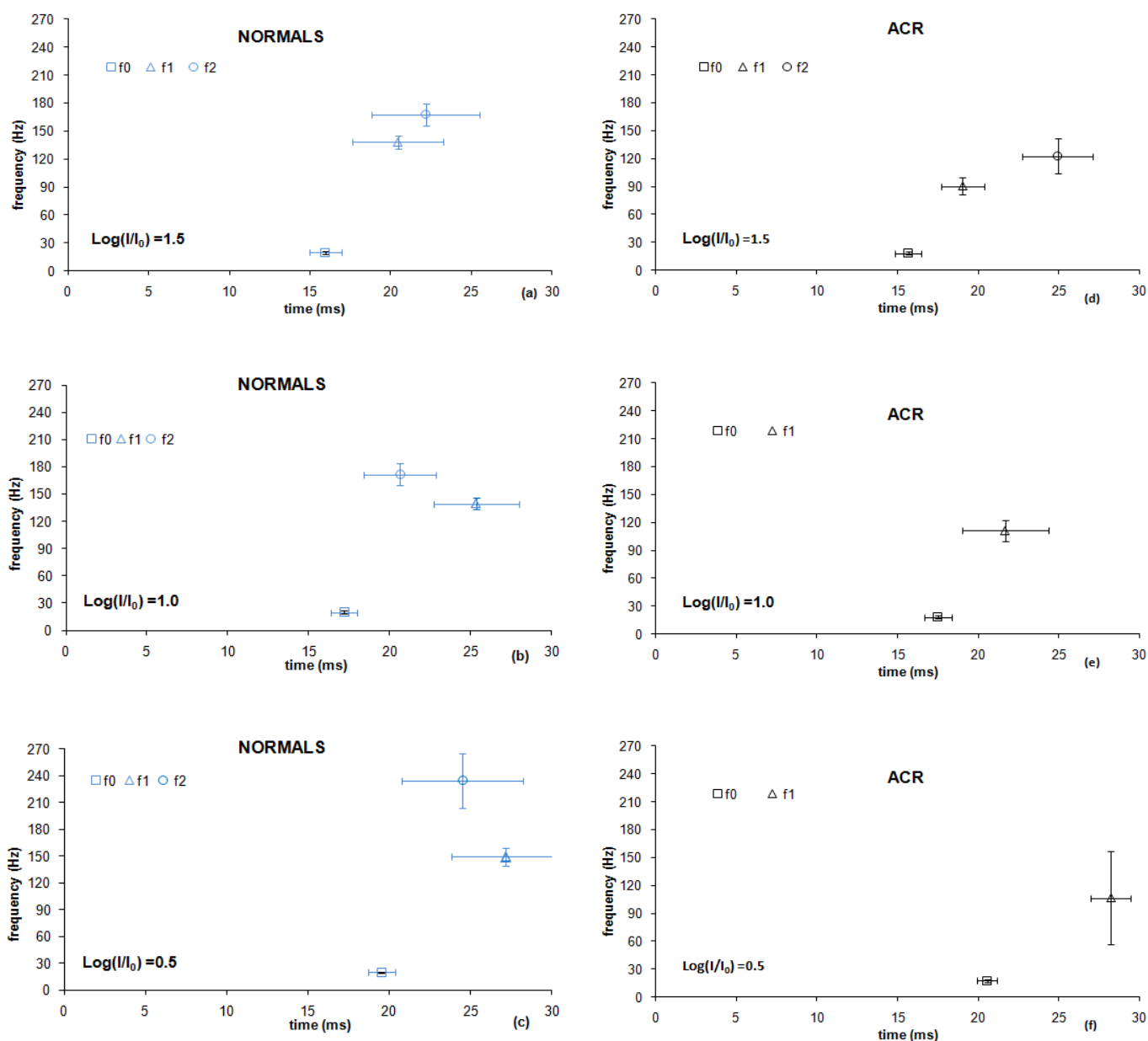


Figura 2.8.4. Frequenze medie relative ai tre valori di luminanza considerati. Le barre di errore indicano una deviazione standard.

La Tavola 2.8.1 fornisce dati utili sui parametri statistici relativi ai tracciati normali e ACR. Essa riporta i valori medi delle frequenze e dei tempi di occorrenza, le loro deviazioni standard (SD), la media dei coefficienti delle trasformate wavelet (WT), i coefficienti di variazione (CV), le apparenze delle componenti di frequenza presenti. Al fine di stimare il contributo delle due popolazioni fotorecettoriali, sia nella risposta normale che patologica, la tavola 2.8.1 non riporta i valori normalizzati dei coefficienti WT ottenuti utilizzando l'eq. 2.7.2,

ma quelli calcolati direttamente mediando i coefficienti per ogni valore di luminanza e frequenza. Il range di frequenza considerato è entro tre deviazioni standard.

I valori dei coefficienti relativi a f_0 non sono alterati dalla presenza della patologia, quelli di f_1 sono paragonabili nei due gruppi di soggetti, dal momento che i bastoncelli stanno lavorando correttamente e in numero costante. D'altra parte, essendo i coni colpiti dalla patologia, sono ridotti in numero ed efficienza; questi fatti hanno una ricaduta sui valori dei coefficienti di WT che in questo caso si riducono.

Tavola 2.8.1: Valori delle componenti di frequenza, tempi di occorrenza, coefficienti di variabilità, appearances estratte dai due campioni di tracciati relativamente ai tre valori di luminanza.

Luminanza	Log(I/I ₀)=1.5		Log(I/I ₀)=1.0		Log(I/I ₀)=0.5	
<i>Tracciati</i>	<i>Normali</i>	<i>ACR</i>	<i>Normali</i>	<i>ACR</i>	<i>Normali</i>	<i>ACR</i>
f_0 .(Hz) $\pm$ SD	19.8 $\pm$ 1.4	18.1 $\pm$ 1.8	19.9 $\pm$ 1.5	18.3 $\pm$ 2.9	20.1 $\pm$ 0.6	17.6 $\pm$ 2.5
t_0 (ms) $\pm$ SD	15.9 $\pm$ 1.0	15.7 $\pm$ 0.8	17.2 $\pm$ 0.8	17.5 $\pm$ 0.9	19.5 $\pm$ 0.8	20.6 $\pm$ 0.6
WT coeff.	2.5	2.6	2.6	2.6	2.5	2.4
CV(f_0) %	7.3	10.1	7.4	16.1	2.9	14.1
App.(f_0) %	100	100	100	100	100	100
f_1 .(Hz) $\pm$ SD	138.2 $\pm$ 6.9	90.6 $\pm$ 9.4	139.4 $\pm$ 6.4	111.2 $\pm$ 11.3	149.3 $\pm$ 9.7	106.7 $\pm$ 50.3
t_1 (ms) $\pm$ SD	20.4 $\pm$ 2.8	19.0 $\pm$ 1.3	25.3 $\pm$ 2.7	21.7 $\pm$ 2.7	27.2 $\pm$ 3.3	28.2 $\pm$ 1.2
WT coeff.	0.09	0.11	0.099	0.062	0.07	0.07
CV(f_1) %	5.0	10.35	4.6	10.2	6.5	47.1
App.(f_1) %	70	50	50	62.5	50	25
f_2 .(Hz) $\pm$ SD	167.6 $\pm$ 11.4	122.5 $\pm$ 28.8	171.4 $\pm$ 12.2	----	234.7 $\pm$ 30.2	----
t_2 (ms) $\pm$ SD	22.2 $\pm$ 3.3	24.9 $\pm$ 2.2	20.6 $\pm$ 2.2	----	24.5 $\pm$ 3.7	----
WT coeff.	0.05	0.04	0.041	----	0.02	----
CV(f_2) %	6.8	23.5	7.1	----	12.9	----
App. (f_2) %	90	62.5	80	----	20	----

La Figura 2.8.5 riassume la dipendenza dalla luminosità dei valori medi delle componenti di frequenza (pannello superiore) e dei loro tempi di occorrenza (pannello inferiore). Le differenziazioni riscontrate nel campione patologico possono essere spiegate come segue: il contributo dei coni (ridotti di numero e/o operanti in modo improprio) si riduce al diminuire della luminanza diversamente dai bastoncelli che mantengono un comportamento "normale". Inoltre, la sensibile riduzione dei valori medi di frequenza osservata nei casi patologici, è opportunamente giustificata dalla mancanza di fenomeni di correlazione tra le famiglie fotorecettoriali che avvengono, invece, nei soggetti sani. Ad alta

luminanza ($\text{Log}(I/I_0) = 1.5$), la presenza di entrambe le componenti f_i e f_2 , nel caso patologico indica che le due popolazioni contribuiscono alla distribuzione spettrale e il valore ridotto di f_2 (attribuito alla risposta patologica dei coni) non esercita una sufficiente sollecitazione su f_i che risulta ridotta di circa 50 Hz.

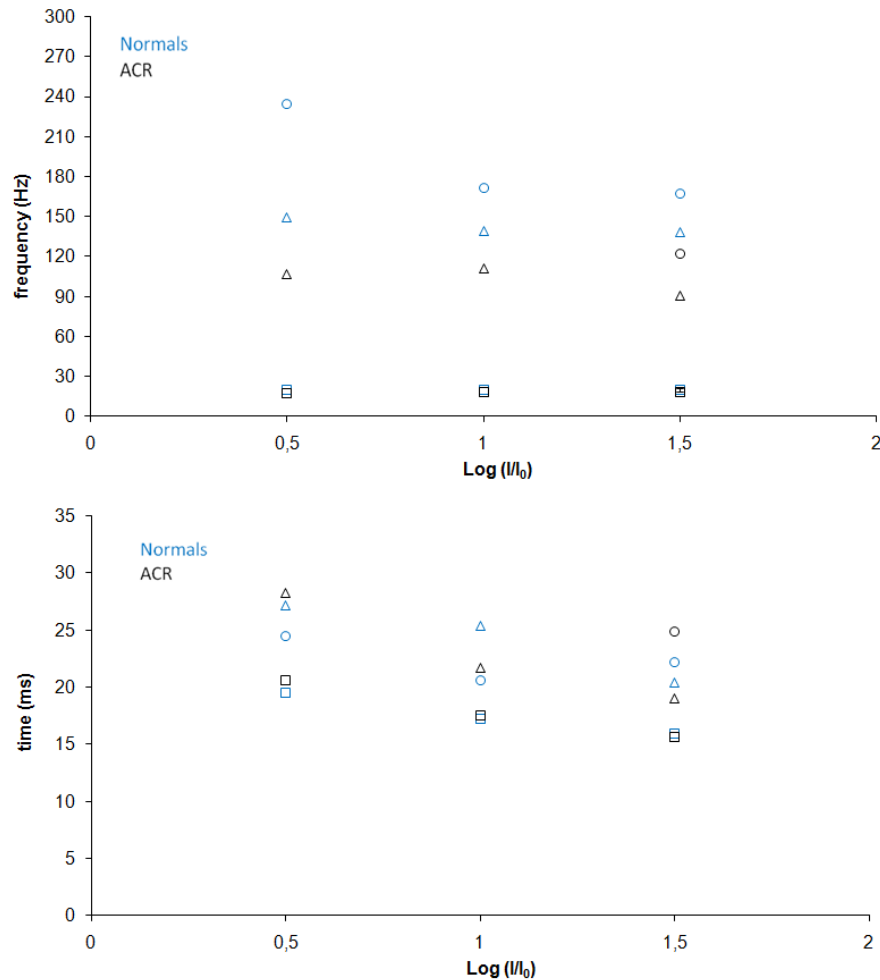


Figura 2.8.5 a) Valori medi delle frequenze; b) valori medi dei loro tempi di occorrenza in funzione della luminanza. I quadrati si riferiscono alla frequenza dominante f_0 , i triangoli a f_i e i cerchi a f_2 .

Quando $\text{Log}(I/I_0) = 0.5$, il contributo dei coni può essere considerato irrilevante e, quindi, f_2 scompare, mentre f_i si riduce di circa 40 Hz. Nel caso intermedio ($\text{Log}(I/I_0) = 1.0$), f_i può essere considerata come una frequenza ibrida, nel senso che non è possibile discriminare il contributo residuo dei coni. Infatti, confrontando il suo valore con la media di f_i e f_2 relativa al caso normale si riscontra ancora una volta una riduzione di circa (40 Hz). I tempi di insorgenza mostrano un andamento decrescente con l'aumentare della luminanza sia per tracciati normali che patologici e sono caratterizzati da un comportamento simile a quello delle componenti di frequenza:

- 
 t_0 è solo leggermente influenzato dal valore di luminanza;
- 
 t_1 è inferiore al corrispondente valore riscontrato nel campione normale per ogni valore di luminanza;
- 
 al valore di luminanza intermedia, t_1 può essere considerato un tempo ibrido costituito dalla media dei tempi t_1 e t_2 rispetto al caso normale.

Questi risultati confermano l'assenza di correlazioni tra i fotorecettori nel campione ACR a causa del comportamento patologico dei coni. Una patologia dei coni che influenza l'onda a in maniera non sempre visibile nel tracciato temporale può avere ricaduta sul suo contenuto spettrale.

Seguendo le procedure già esposte, sono stati analizzati anche tracciati appartenenti a pazienti affetti da CSNB, la patologia a carico dei bastoncelli. L'analisi è stata condotta per il solo valore di luminanza $\text{Log}(I/I_0) = 1$ poiché, trattandosi di ERG scotopici, per valori inferiori di luminanza il segnale risultava particolarmente rumoroso e, dunque, non trattabile. Inoltre, non erano disponibili tracciati acquisiti con valori superiori di luminanza.

La Figura 2.8.6 riporta i tracciati appartenenti a soggetti sani e patologici registrati nelle stesse condizioni di acquisizione dati.

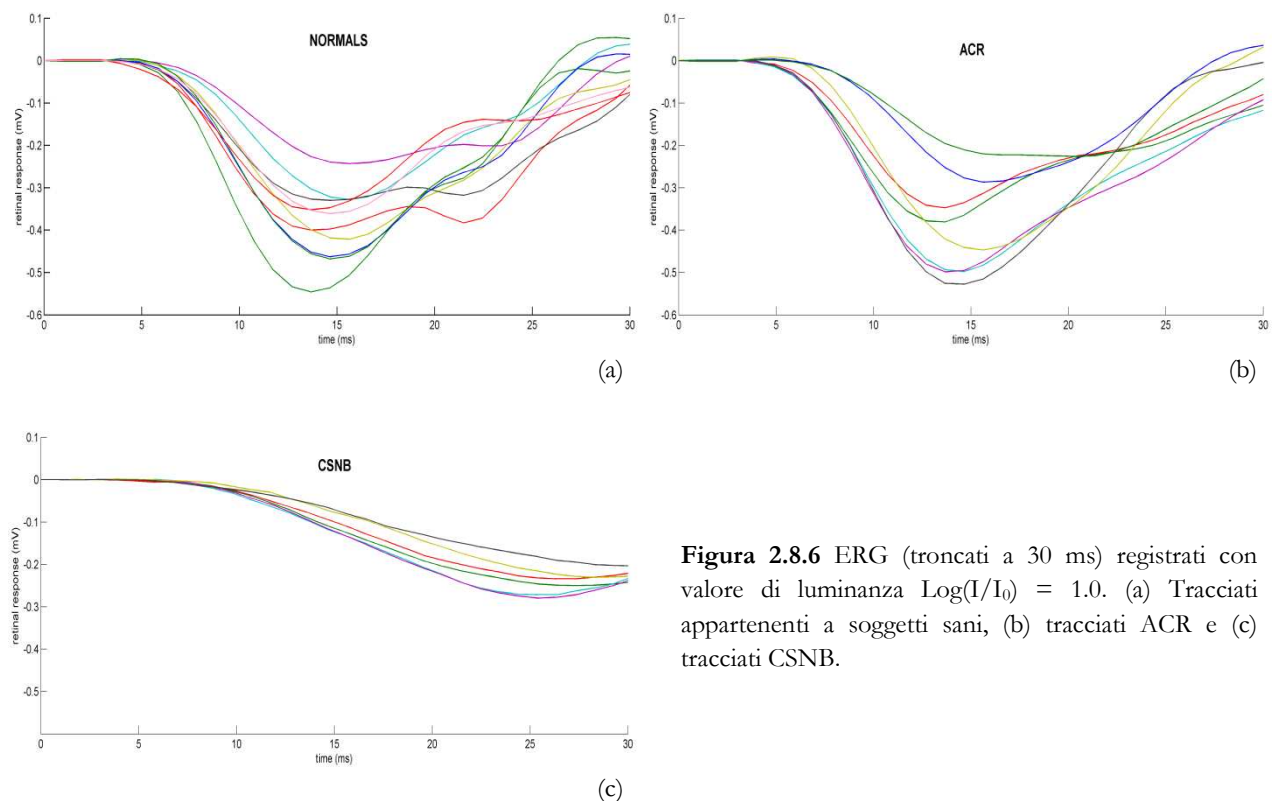


Figura 2.8.6 ERG (troncati a 30 ms) registrati con valore di luminanza $\text{Log}(I/I_0) = 1.0$. (a) Tracciati appartenenti a soggetti sani, (b) tracciati ACR e (c) tracciati CSNB.

In particolare, il pannello (a) mostra 10 tracciati di soggetti sani; i pannelli (b) e (c) visualizzano, rispettivamente, 8 tracciati ACR e 6 CSNB. La Figura 2.8.7 mostra i corrispondenti scalogrammi. Ogni scalogramma mostra un massimo dominante (cluster bianco) f_0 e uno o due massimi locali, f_1 e f_2 .

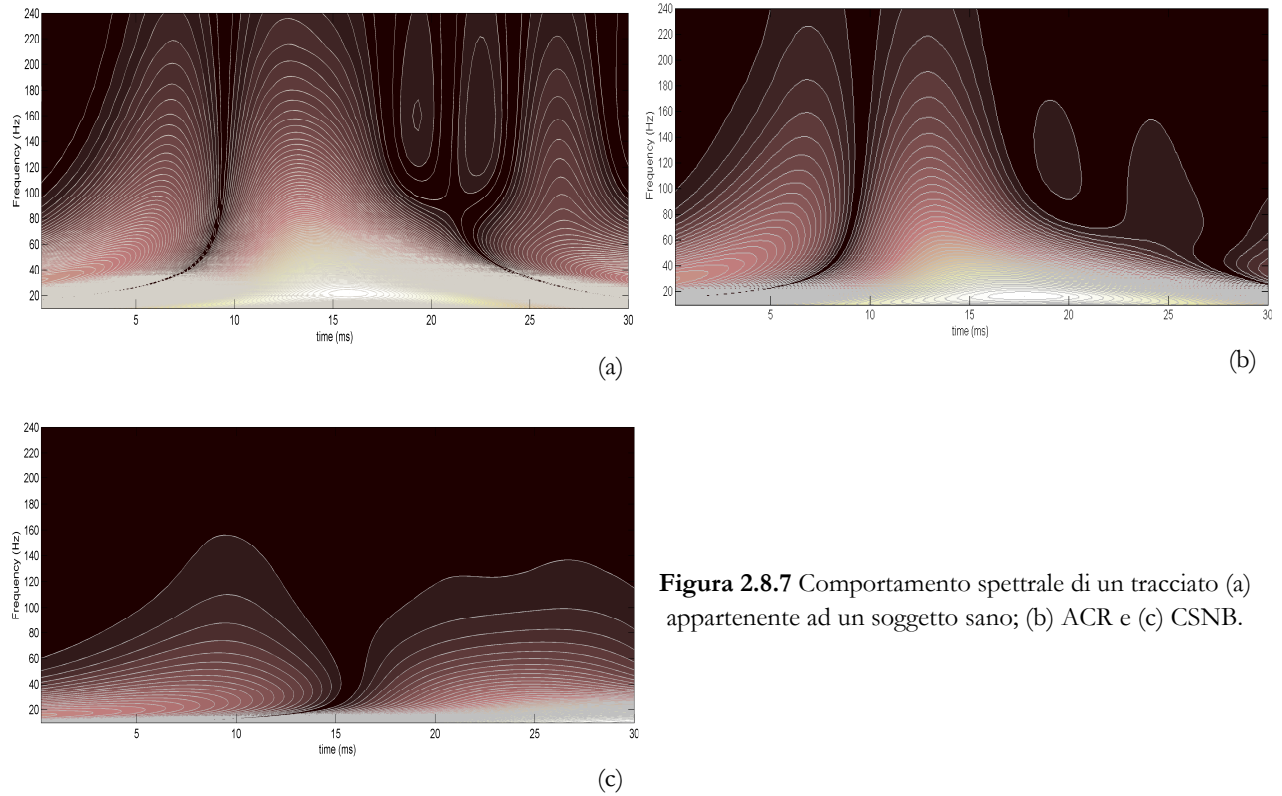


Figura 2.8.7 Comportamento spettrale di un tracciato (a) appartenente ad un soggetto sano; (b) ACR e (c) CSNB.

Per potere effettuare un confronto, in tavola 2.8.2 sono riportati i dati più rilevanti sui parametri statistici riguardanti i tracciati normali, ACR e CSNB.

Tavola 2.8.2 Valori delle componenti di frequenza, tempi di occorrenza, coefficienti di variabilità, e apparenze estratte dai tre campioni di tracciati per il valore di luminanza $\text{Log}(I/I_0) = 1.0$

Tracciati	Freq.(Hz) $\pm$ SD	Time (ms) $\pm$ SD	CV(Freq)%	Appearance (%)
Normali	$f_0: 19.9 \pm 1.5$	$t_0: 17.2 \pm 0.8$	7.4	100
	$f_1: 139.4 \pm 6.4$	$t_1: 25.3 \pm 2.7$	4.6	50
	$f_2: 171.4 \pm 12.2$	$t_2: 20.6 \pm 2.2$	7.1	80
ACR	$f_0: 18.3 \pm 2.9$	$t_0: 17.5 \pm 0.9$	16.1	100
	$f_1: 111.2 \pm 11.3$	$t_1: 21.7 \pm 2.7$	10.2	62.5
	$f_2: \text{-----}$	$t_2: \text{-----}$	-----	-----
CSNB	$f_0: 10.2235 \pm 0.205$	$t_0: 31.25$	2.003	100
	$f_1: \text{-----}$	$t_1: \text{-----}$	-----	-----
	$f_2: \text{-----}$	$t_2: \text{-----}$	-----	-----

L'analisi comparativa dei dati indica, come già rilevato, che i soggetti ACR rispetto ai normali rivelano differenze poco apprezzabili in f_0 ma significative in f_1 e f_2 , mentre i pazienti CSNB presentano differenze apprezzabili anche in f_0 . L'effetto principale delle due patologie fotorecettoriali è una riduzione dei valori di frequenza e nell'assenza di una (f_2 in ACR) o di due componenti (f_1 e f_2 in CSNB). La mancanza della componente a frequenza più alta nei tracciati ACR è legata al fatto che la patologia è proprio a carico dei coni ai quali tale frequenza è associata. Nel caso dei CSNB, f_1 è assente perché è correlata all'attività dei bastoncelli mentre, f_2 (associata ai coni), non appare in quanto è necessario un valore superiore di luminanza per la sua "accensione".

2.9 ANALISI WAVELET DELLA RISPOSTA

FOTORECETTORIALE: CONSIDERAZIONI FINALI

L'analisi wavelet, condotta su tracciati appartenenti a soggetti sani e patologici, è stata finalizzata alla individuazione delle componenti di frequenza e della loro insorgenza temporale.

La WA, effettuata su un campione di *onde a* normali, nonostante la variabilità del campione, ha permesso di identificare un insieme di componenti stabili di frequenza, rivelate attraverso la presenza di cluster negli scalogrammi, caratterizzati da specifiche localizzazioni nel dominio tempo-frequenza.

Sono state rilevate tre frequenze stabili le cui origini sono state attribuite all'attività dei fotorecettori in funzione della luminanza. La dipendenza dalla luminanza del peso relativo delle componenti f_1 e f_2 è una conseguenza di un progressivo switch dei centri che si attivano in diverse condizioni di intensità luminosa. In particolare, f_2 presente ad alti valori di luminanza, indica l'innescarsi delle attività dei coni. A valori elevati dell'intensità luminosa, poiché aumenta il numero di fotorecettori attivati, possono insorgere anche correlazioni tra le due famiglie dei fotorecettori.

I risultati ottenuti sui tracciati patologici sono in grado di fornire informazioni utili circa il comportamento e l'efficienza dei fotorecettori nelle tre tipologie di campioni. Più precisamente, essi indicano che, l'assenza di una eventuale componente di frequenza e/o il suo

spostamento verso valori più bassi possono essere collegati con la risposta patologica di una popolazione fotorecettoriale. In effetti, l'abbassamento dei valori delle frequenze è legato alla non corretta attività di una delle due popolazioni fotorecettoriali che ha ricadute sul cross-talk tra fotorecettori appartenenti alla stessa famiglia (coni-coni, bastoncelli-bastoncelli) e tra fotorecettori appartenenti a famiglie differenti (coni-bastoncelli). Questa circostanza impedisce l'insorgenza di fenomeni di correlazione che invece caratterizzano la risposta “normale” dei fotorecettori. Questa valutazione convalida le ipotesi attuali sulle interazioni coni-bastoncelli che sono implicite nella risposta dei soggetti normali e fornisce informazioni utili sulle caratteristiche di tempo-frequenza delle due patologie e la loro interpretazione clinica. In quest'ultimo caso, una riduzione del valore di f_0 nelle *onde a* ACR indica un contributo ridotto dei coni attivi e il deficit del contributo dei bastoncelli in pazienti con CSNB. Per quanto riguarda invece la presenza o meno di f_1 e f_2 legate ai contributi dei fotorecettori (f_1 ai bastoncelli, f_2 ai coni), la loro presenza è indicativa della integrità funzionale della retina.

Anche se l'approccio analitico fornito dalla WA necessita di un ulteriore aggiornamento, sia in termini di metodologia che di incremento del campione statistico, la rilevazione e la distribuzione delle componenti di frequenza nel dominio tempo-frequenza, possono contribuire a sviluppare un classificatore di segnale elettroretinografici, in grado di distinguere differenti patologie fotorecettoriali.

CAPITOLO 3

CASO STUDIO 2: MATERIALI METALLICI E LORO DEGRADO

La materia inquieta si aggrega e si disgrega, si incontra e si trasforma!

Cael William Brown

Il presente capitolo è dedicato all'analisi di dati provenienti da un caso studio che ha interessato le attività di ricerca del *Laboratorio di Tecniche Fisiche per lo studio e la caratterizzazione dei Beni Culturali* attivo presso il DiFTeR. Esso riguarda l'analisi di dati provenienti da due tecniche spettroscopiche¹³ utilizzate per studiare la genesi dei prodotti di corrosione indotti artificialmente per interrimento in un sito di interesse archeologico presso la località Tharros in Sardegna su alcuni campioni bronzei di composizione nota¹⁴. Le tecniche a cui si fa riferimento sono la fluorescenza a raggi X e la spettroscopia mediante ablazione laser [par.1.3]. Il capitolo prevede una definizione delle problematiche inerenti la corrosione dei metalli, una breve introduzione delle due tecniche, ed infine una presentazione dei risultati ottenuti.

¹³ Il termine *spettroscopia* deriva dal latino *spectrum* che vuol dire “immagine” e dal greco *skopein* “esaminare”.

¹⁴ Questa ricerca è stata condotta all'interno del progetto PRIN 2007 “Optimization of integrated physical techniques of X-ray spectrometry, laser and electron spin for the study of corrosion processes on surface and volume of metals and alloys”, supportata dal Ministero italiano per l'Università e la Ricerca Scientifica.

3.1 LA CORROSIONE: UNA PATOLOGIA DEI METALLI

La corrosione¹⁵ metallica è una conseguenza dell'interazione chimica tra un metallo e l'ambiente che produce un degrado del materiale e delle sue proprietà tale da compromettere non solo l'aspetto macroscopico ma perfino il suo comportamento. Tale fenomeno deriva dalle caratteristiche chimico-fisiche dei metalli nei quali gli elettroni più esterni, a causa della loro delocalizzazione sull'intera struttura metallica, sono facilmente soggetti a cattura da parte di specie chimiche che tendono, invece, ad acquistare elettroni. Come conseguenza di tale perdita, nel metallo si manifesta una repulsione elettrostatica tra cariche positive in eccesso. A causa di tale repulsione gli ioni positivi vengono espulsi dalla struttura metallica ristabilendo in tal modo l'iniziale condizione di elettro-neutralità. Questi meccanismi sono alla base di un progressivo processo di corrosione del campione metallico che si manifesta con cinetiche differenti nel tempo.

Il processo di degrado può presentarsi sotto varie forme legate alla tipologia di reazione che si innesca, agli elementi chimici presenti nel materiale e nell'ambiente circostante, alle caratteristiche metallurgiche del materiale, alla struttura geometrica del campione (irregolarità delle superficie e presenza di pori) ed in particolare a fattori ambientali. I fenomeni di corrosione dei materiali metallici possono avere dunque, numerose e diverse cause di origine.

Per quanto riguarda i fattori ambientali, generalmente, si parla di corrosione atmosferica, in acqua e nel terreno. La corrosione atmosferica avviene in ambienti umidi ed è direttamente correlabile a fattori climatici quali, precipitazioni, nebbia, umidità relativa, temperatura, oltre che alla presenza di eventuali inquinanti. La gran parte di metalli o leghe metalliche, immersi in acqua, è soggetta a fenomeni di corrosione tanto più probabili quanto più l'acqua è ricca di ossigeno o di cloro. Inoltre, in ambiente anaerobico possono subire attacchi ossidativi ad opera di batteri specifici. Per ciò che concerne la corrosione indotta dal suolo, essa è strettamente legata agli elementi ivi presenti ed ai processi di bio-corrosione dovuti all'azione di batteri specializzati (ferrobatteri, batteri solfo-riduttori).

¹⁵ Il termine *corrosione* indica un processo di consumazione lenta e continua (dal lat. *com-* particella indicante "insistenza" e *rodere*, per "consumare").

In particolare, i campioni bronzei, posti in ambienti naturali corrosivi, presentano una patina di corrosione, generalmente, di colore bruno o verde-blu [50-53]. Caratterizzare la natura e la struttura chimica della patina di corrosione è un metodo complesso ma efficiente, per dedurre, a posteriori, informazioni sulla composizione chimica dei campioni, le tecniche di produzione, sull'ambiente e il tipo di suolo in cui sono rimasti sepolti. La conoscenza di tali informazioni nell'ambito dei Beni Culturali è di fondamentale importanza perché è propedeutica a qualsiasi intervento di conservazione e restauro.

Il meccanismo di corrosione del bronzo è stato spesso legato alle proprietà strutturali e dinamiche del rame, anche se ultimamente viene sempre più sottolineato il ruolo degli elementi in lega, che possono incidere sensibilmente sul processo di corrosione rallentandolo o addirittura favorendolo [51-53].

Il piombo, per esempio, gioca un ruolo cruciale poiché durante il processo di solidificazione della lega, tende a formare isole intergranulari che diventano luogo preferenziale per il degrado [50, 54, 55]. Ciò è confermato dal fatto che, nelle patine di corrosione il piombo può raggiungere valori addirittura quattro volte maggiori rispetto al *bulk* [52]. Lo stagno, invece migliora la resistenza della lega alla formazione delle patine di corrosione. L'arricchimento di tale elemento, dovuto alla sua facilità di diffusione e all'alta stabilità dei composti di neoformazione, è strettamente connesso al processo di decuprificazione [56].

Data la complessità delle dinamiche e dei fattori coinvolti, caratterizzare le patine di corrosione richiede una indagine spesso articolata e multidisciplinare. La non omogeneità e non uniformità della distribuzione superficiale della patina, insieme alla necessità di preservare l'integrità del campione archeologico e di ripetere la misura su diversi punti, restringono il campo a metodi analitici non invasivi o possibilmente micro invasivi [52, 57-59].

Molteplici sono le tecniche disponibili e utilizzabili a questo scopo, tra quelle tradizionalmente impiegate emergono la microscopia ottica (OM), la microscopia elettronica a scansione con dispersione di raggi X (SEM-EDX), la fluorescenza a raggi X (XRF). Ciononostante, poiché i meccanismi di corrosione implicano la migrazione di elementi o ioni lungo lo spessore della lega analizzata, creando un gradiente di concentrazione attraverso gli strati di corrosione, uno studio esaustivo di tali fenomeni necessita anche di tecniche alternative non o micro-distruttive che forniscano non solo informazioni superficiali [55].

La maggior parte delle tecniche analitiche disponibili è in grado di fornire dati stratigrafici ma necessita di complesse e costose attività di sezionamento del campione che ne compromettono l'integrità in maniera irreversibile [60].

Negli ultimi decenni, la spettroscopia ad ablazione laser (LIBS), sta emergendo come strumento avanzato per la caratterizzazione di strutture complesse tra cui i metalli [58]. Questa tecnica è in grado di fornire informazioni sui profili di profondità ottenuti mediante impulsi successivi laser sullo stesso punto e acquisiti sequenzialmente [58, 61-65].

In questo capitolo, verranno caratterizzati i prodotti di corrosione sui campioni bronzei attraverso l'analisi dei dati ottenuti dall'uso integrato delle ultime due tecniche spettroscopiche citate. Il confronto tra le due tecniche XRF e LIBS è particolarmente utile grazie alla loro complementarità in termini di spessore e composizione delle superfici da investigare [66, 67]. Tali tecniche (XRF e LIBS) preservano quasi completamente l'integrità del campione essendo la prima non distruttiva e la seconda micro-invasiva. Entrambe le metodologie di indagine, infine, non richiedono un pre-trattamento del campione e ne permettono, pertanto, un'analisi diretta in tempi estremamente brevi.

3.2. PARAMETRI STRUMENTALI XRF E LIBS

Le analisi XRF sono state effettuate utilizzando uno spettrometro portatile a fluorescenza a raggi X (XRF) ArtTAX 200 (Bruker AXS). Quest'ultimo (Figura 3.2.1) è dotato di tubo a bassa potenza di raggi X. Un anodo di molibdeno è usato come un bersaglio. Prima di emettere il fascio di raggi X, è possibile inserire un filtro a disco, al fine di attenuare la radiazione di *Bremsstrahlung* e per ridurre la componente di diffrazione del fascio di raggi X. La fluorescenza a raggi X viene raccolta da un rivelatore SDD-XFlash (Silicon Drift Detector) con una risoluzione energetica <145 eV a 5.9 keV (corrispondente alla riga K_{α}).

L'ArtTAX è dotato di un sistema di flusso di elio, che consente di rilevare elementi leggeri riducendo l'assorbimento fotoelettrico, da parte dello strato di aria, di raggi X caratteristici emessi dal campione e che, proprio per il numero atomico dell'elio, più basso di quello dell'azoto, aumenta l'efficienza di rivelazione.



Figura 3.2.1: Apparato strumentale XRF disponibile nel *Laboratorio di Tecniche Fisiche per lo studio e la caratterizzazione dei Beni Culturali* del Dipartimento di Fisica e Tecnologie Relative dell'Università di Palermo

I parametri sperimentali, riportati in Tavola 3.2.1 sono stati selezionati in modo da avere un buon segnale spettrale e da ottimizzare il Rapporto Segnale Rumore (SNR).

Tavola 3.2.1: Set-up sperimentale per le misure XRF

X-RAY SOURCE	
Anode target	Mo
Anode High Voltage	40 kV
Anode current	600 μ A
Acquisition time	300 s
Helium flow rate	1.6 l/min
X-ray filter	Air

Le misure LIBS sono state effettuate sui campioni posti all'interno di un vano porta campioni dotato di un tavolo motorizzato per l'esatto posizionamento del campione e la messa a fuoco dei laser sul punto da analizzare. Lo spettrometro è dotato, anche, di un braccio esterno per misure su oggetti di grandi dimensioni. Lo strumento LIBS (Figura 3.2.2) integra un laser a doppio impulso: vengono emessi due impulsi laser collineari a 1064 nm con una energia di 50-120 mJ per impulso con una frequenza di ripetizione massima di 10 Hz e un ritardo reciproco regolabile da 0-60 μ s.

Il segnale LIBS, sia prodotto all'interno della camera sperimentale o direttamente sull'oggetto, viene raccolto attraverso una fibra ottica ed inviato ad uno spettrometro compatto Echelle accoppiato ad una CCD per l'acquisizione dello spettro. Lo strumento è controllato tramite un personal computer integrato che gestisce la visualizzazione e il posizionamento del campione, le impostazioni sperimentale del laser (energia dei fasci, il

ritardo tra gli impulsi, tasso di ripetizione) e parametri di acquisizione spettrale (numero medio di, ritardo di acquisizione, misurazione CCD: gate e guadagno).



Figura 3.2.2: Apparato strumentale LIBS disponibile nel *Laboratorio di Tecniche Fisiche per lo studio e la caratterizzazione dei Beni Culturali* del Dipartimento di Fisica e Tecnologie Relative dell'Università di Palermo

La risoluzione spettrale dello spettrometro è $\lambda / \Delta\lambda < 5000$. I parametri del set-up sperimentale per la sorgente laser e per lo spettrometro Echelle, sono stati scelti con l'obiettivo di migliorare il SNR. Di seguito sono riportati i parametri strumentali per l'acquisizione degli spettri LIBS e l'elaborazione dei profili di profondità. Per la sorgente laser è stato fissato: l'energia lampada laser a 16,5 J, che corrisponde a una energia di uscita del laser di $60 \div 70$ mJ, la frequenza di ripetizione a 1 Hz, il ritardo del primo impulso laser a 135 ms e il ritardo del secondo impulso laser a 1 μ s.

La Tavola 3.2.2 riporta parametri strumentali del laser e della CCD impostati per le misure LIBS.

Tavola 3.2.2: Set-up sperimentale per le misure LIBS

LASER	
Lamp Energy	16.5 mJ
Repetition Rate	1 Hz
Laser Energy	65 mJ
CCD CAMERA	
Number of accumulation	5
MCP Gain	230
Gate pulse width (GPW)	1.5 μ s
gate pulse delay (GPD)	2.5 μ s

I profili di profondità del rame acquisiti con una maggiore risoluzione spaziale sono stati ottenuti mediando su due *shots* consecutivi, con una *lamp energy* di 12,5 J, che corrisponde ad un valore di $20 \div 30$ mJ e il ritardo di impulso di 5 μ s. Tali parametri permettono di analizzare uno spessore inferiore rispetto a quello indagato tramite il set-up precedentemente riportato.

3.3. ANALISI DEI PRODOTTI DI CORROSIONE SU CAMPIONI BRONZEI [68-70]

Per questo studio sono stati analizzati due leghe bronzee, una ternaria ed una quaternaria di composizione nota, le cui concentrazioni sono tipiche della produzione metallurgica dell'epoca romana [54 55, 71, 72]. In particolare, sono stati analizzati dati XRF e LIBS provenienti da campioni non corrosi e da campioni aventi la stessa composizione chimica ma affetti da corrosione indotta naturalmente dopo un anno di interrimento in una zona di interesse archeologico (Tharros, Sardegna) [54]. La composizione nominale dei campioni è riportata nella Tavola 3.3.1 come percentuale in peso.

Tavola 3.3.1 Composizione nominale dei campioni bronzee.

Etichetta	Cu (%)	Sn (%)	Pb (%)	Zn (%)	S
CNR 128	92.3	7.5	0.2	—	inclusioni
CNR 129	82.3	3.0	0.5	14.0	inclusioni
THT 128	92.3	7.5	0.2	—	inclusioni
THT 129	82.3	3.0	0.5	14.0	inclusioni

Al fine di studiare l'evoluzione della degradazione chimica dal *bulk* alla superficie, l'approccio metodologico ha previsto l'analisi degli spettri acquisiti su diverse aree macroscopicamente distinguibili per colorazione (patina bruna e verde) e su ognuno dei lati del campione, denotati arbitrariamente con A e B. La Figura 3.3.1 mostra le immagini al microscopio ottico di alcune zone rappresentative delle due tipologie di patina, verde e bruna.

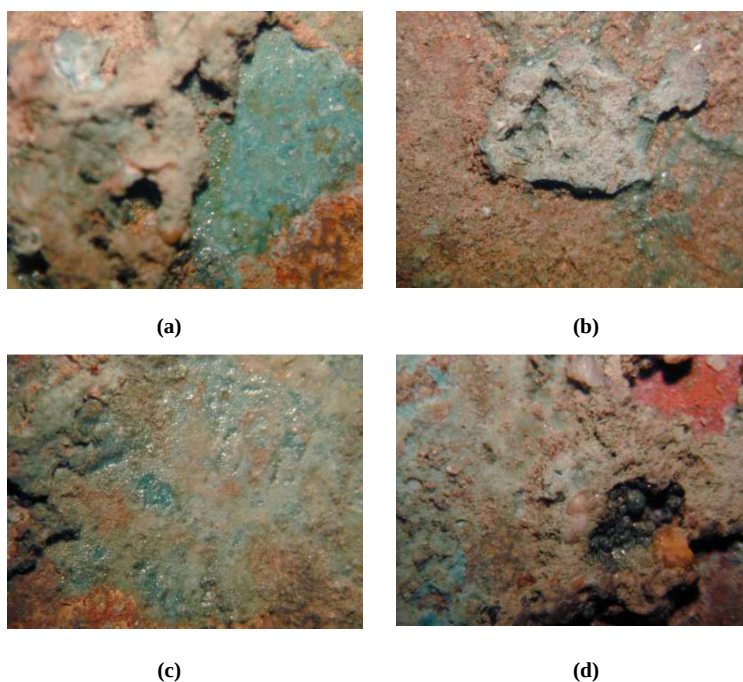


Figura 3.3.1. Immagini al microscopio ottico di tipiche superfici di corrosione delle patine verdi (greenish) e brune (brownish) sul campione (a, b) THT 128 e (c, d) THT 129.

Per motivi statistici, sono state acquisite cinque misure XRF per ogni tipologia di zona analizzata (corrosa e non corrosa). E' importante notare che, poiché il contenuto di piombo non è uniformemente distribuito nei campioni bronzei, la sua misura varia in modo significativo a seconda della zona selezionata per l'analisi. Questo inconveniente è ridotto mediando la misura su diverse aree del campione.

Per quanto riguarda le misure LIBS, per ogni campione bronzeo non corroso (CNR 128 e CNR 129) sono stati esaminati cinque punti corrispondenti a cinque posizioni casuali. Nei campioni corrosi, THT 128 e 129 THT, è stato, invece, analizzato un punto per ogni tipo di patina (bruna e verde) sul quale sono state effettuate, inoltre, quindici acquisizioni consecutive. Ogni acquisizione, inoltre, è stata mediata su cinque colpi laser registrati sullo stesso punto del campione. Gli spettri LIBS analizzati non contengono lo spettro relativo al primo colpo, in quanto non riproducibile.

Il criterio generale di indagine è stato quello di valutare, grazie alle potenzialità dell'XRF e della LIBS e i confronti con i campioni non corrosi, le alterazioni di concentrazione chimica degli elementi della lega indotte dal processo di corrosione.

La Figura 3.3.2 mostra gli spettri XRF dei campioni non corrosi (CNR128 e CNR129) e quelli acquisiti sulla patina bruna e verde dei corrispondenti campioni corrosi (THT128 e THT129). I primi sono caratterizzati oltre dagli elementi delle leghe di bronzo anche da elementi come calcio e ferro, dovuti alla procedura di preparazione del campione. Il processo di corrosione modifica gli spettri XRF e introduce elementi chimici provenienti dall'ambiente di interramento, come silicio, manganese e cloro, mentre aumenta l'intensità delle righe spettrali corrispondenti al calcio e al ferro.

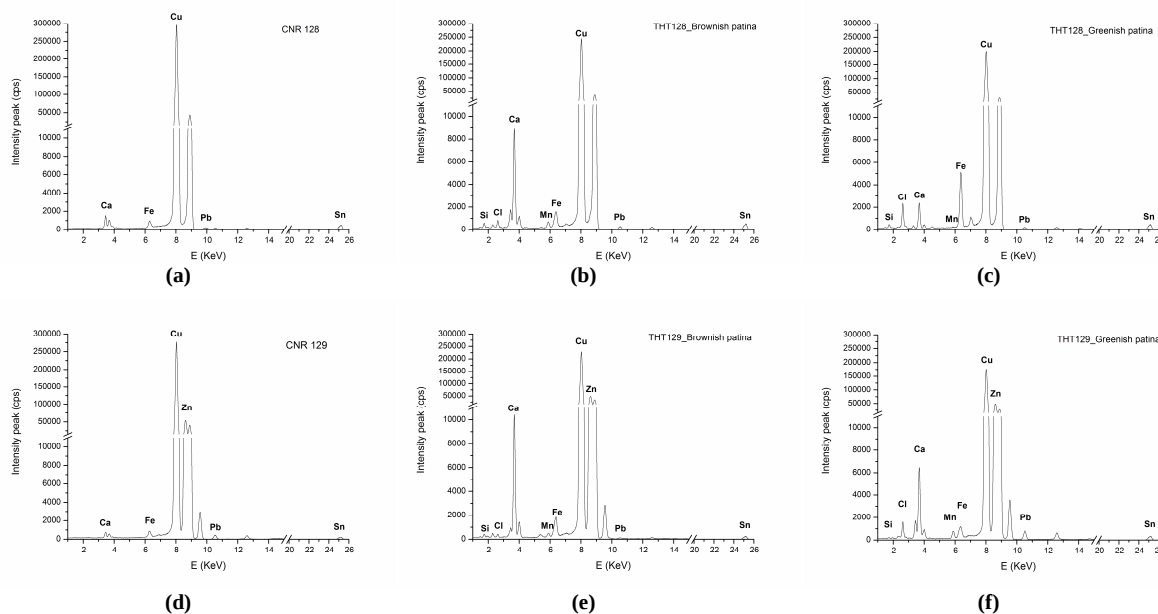


Figura 3.3.2 Spettri tipici XRF del campione non corrosivo CNR 128 (a), patina bruna e verde del campione THT128 (c,d); analoghi spettri di CNR 129 (d) e THT 129 (e, f).

L'obiettivo primario di questa indagine è stato quello di riuscire a trovare procedure analitiche in grado di discriminare le alterazioni indotte dalla corrosione, rispetto alle caratteristiche composizionali originali del campione. Tutto ciò anche in relazione alla differente composizione del campione, al fine di fare ipotesi sul ruolo e sul contributo di alcuni elementi, rispetto ad altri, nella formazione degli strati di corrosione. Con questo scopo, cioè verificare la similarità/dissimilarità dei campioni sulla base della loro composizione chimica, è stato costruito un biplot con i dati XRF relativi a piombo e stagno. Il biplot, mostrato in Figura 3.3.3, riporta l'intero set dei dati, appartenenti ai campioni corrosi e non. La presenza di *cluster* rende possibile la distinzione sia della tipologia del campione (128 e 129) sia della colorazione della patina (bruna o verde).

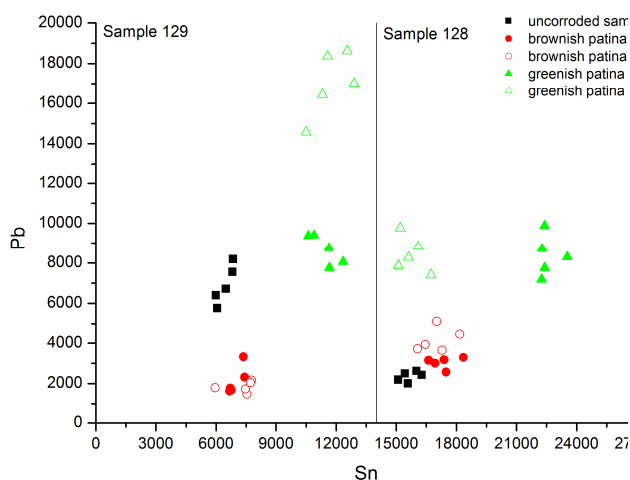


Figura 3.3.3 Biplot dei dati XRF. I quadrati neri indicano i campioni non corrosi. I triangoli pieni e vuoti sono relativi, rispettivamente, alla patina verde dei lati A e B. Lo stesso criterio è valido per i cerchi pieni e vuoti relativamente alla patina bruna.

Inoltre, per quanto concerne la patina verde, i cluster permettono di discriminare i punti di misura per lato (A e B) del campione. La stessa considerazione non può essere fatta per la patina bruna che, invece, non mostra una chiara distinzione tra i due *cluster*. In particolare, nel campione THT128 si riscontrano evidenti differenze nel contenuto di stagno, mentre nel campione THT 129 nel contenuto di piombo. Questo particolare comportamento, connesso al piombo, potrebbe essere una conseguenza della presenza dello zinco nel campione THT129.

Tale modalità di rappresentare i dati permette di valutare il contributo degli elementi che partecipano alla crescita dello strato di corrosione, confermando la ben nota successione (lega metallica, patina bruna, patina verde) della formazione della patina. Ciò è possibile grazie al fatto che, i dati inerenti alle misure sulla patina bruna sono più aderenti alla corrispondente composizione originaria (a quella del campione non corrosivo) di quanto non lo siano quelle relative alla patina verde.

Una valutazione di quanto il contributo percentuale di ogni elemento varia nelle patine dei campioni degradati (THT 128 e THT129) rispetto ai campioni non corrosi (CNR 128 e CNR 129), è visualizzato dal grafico a barre di Figura 3.3.4, i cui pannelli a) e b) mostrano l'ammontare delle variazioni percentuali dell' elemento nella patina bruna e verde, rispettivamente. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard associata alla differenza di concentrazione in termini di percentuale tra i campioni corrosi e non corrosi. La variabilità della larghezza delle barre di errore dipende dalla disomogeneità dei livelli di corrosione in termini di spessore e composizione.

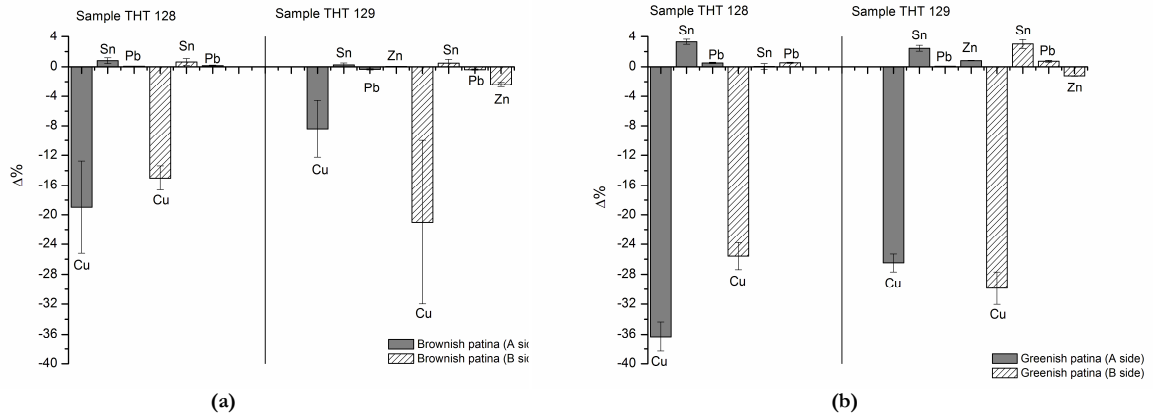


Figura 3.3.4. Bar plot delle differenze percentuali tra l'ammontare percentuale dell'elemento nei campioni corrosi (THT 129 e THT 128) e quello relativo ai campioni non corrosi (CNR 129 e CNR 128). a) patina bruna; b) patina greenish. I dati sono relativi allo spessore investigabile con l'XRF.

Come atteso, la riduzione del contenuto di rame, in entrambe le patine, è l'effetto più evidente del processo di corrosione, anche se le maggiori variazioni si riscontrano nelle patine verdi. Queste considerazioni sono in accordo con il noto fenomeno dell'arricchimento dello stagno [56] che si verifica nello strato di corrosione. L'arricchimento dello stagno [54], indicato con $f(\text{Sn})$, può essere calcolato dalla relazione:

$$f(\text{Sn}) = \left[\frac{\text{Sn} / (\text{Sn} + \text{Cu})_{\text{patina}}}{\text{Sn} / (\text{Sn} + \text{Cu})_{\text{un corroded sample}}} \right] \quad 3.3.1$$

dove i termini Sn e Cu sono riferiti all'area dell'intensità del picco XRF misurato sia sulla patina verde e bruna dei campioni degradati (THT 128 e THT 129) e quindi sui corrispettivi campioni non corrosi (CNR 128 e CNR 129).

L'aumento del contenuto di stagno e la conseguente riduzione del rame negli strati di corrosione, può essere connesso con la dissoluzione selettiva del rame da parte della lega, ossia con il processo di decuprificazione [51].

Una valutazione comparativa di tale arricchimento può essere fatta analizzando la Figura 3.3.5 che mostra, per ogni lato del campione, il grafico a barre di $f(\text{Sn})$ per le patine bruna e verde del campione corrosivo (THT 128 e THT 129) rispetto al corrispondente non corrosivo. Si può notare che le patine brune, nonostante appartengano a due diverse tipologie di leghe (ternaria e quaternaria), presentano un aumento confrontabile del contenuto di stagno in tutte le aree analizzate. Differente è la situazione per le patine verdi che risultano invece più arricchite in stagno rispetto alle brune. Inoltre, il confronto puntuale tra le patine verdi rivela

un arricchimento maggiore nei campioni con zinco (THT 129) rispetto a quelli senza (THT 128). In generale, il contenuto di stagno per la patina bruna si mantiene costante per l'intero set di misure, al contrario di quello della patina verde che è influenzato dalle fluttuazioni. Questo risultato può essere spiegato considerando la maggiore stabilità della patina bruna rispetto a quella verde.

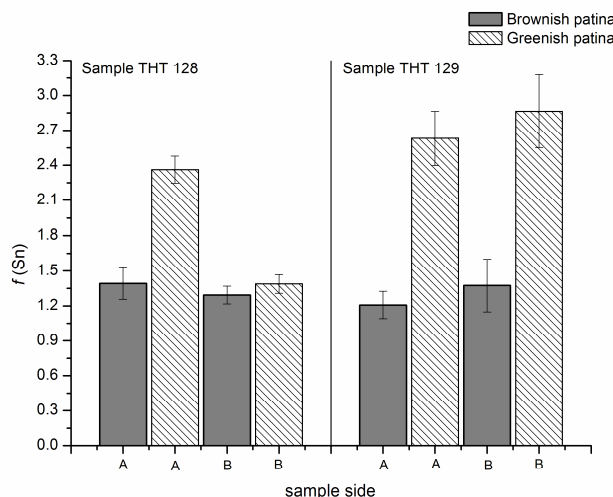


Figura 3.3.5. Bar plot del fattore di arricchimento dello stagno dei campioni corrosi (patina bruna e patina verde) rispetto ai campioni non corrosi.

Per quanto prima accennato, circa la possibilità di integrare le informazioni acquisite tramite la XRF, con quelle deducibili dalla LIBS, sono stati costruiti i profili di profondità (grafici dell'intensità del segnale vs il numero di *shots* corrispondente alla medesima acquisizione) con i dati LIBS acquisiti a seguito di ablazioni successive della superficie del campione sullo stesso punto. Questa procedura analitica ha permesso di caratterizzare il

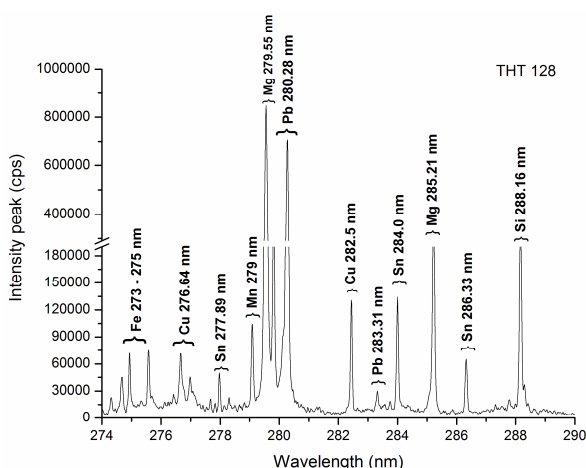


Fig. 3.3.6. Tipico spettro LIBS relativo al campione THT128.

comportamento degli elementi della lega, oltre il massimo spessore investigabile con la XRF (circa $60 \div 70 \mu\text{m}$ con il set-up strumentale utilizzato vedi par.3.2). Le linee spettrali selezionate per lo studio dei profili di profondità sono state 280.2 nm per il Pb, 282.5 nm per

il Cu, e 286.3 nm per lo Sn. La Figura 3.3.6 mostra un tipico spettro LIBS per il campione THT128.

I punti utilizzati per rappresentare i profili di profondità di Pb, Cu e Sn, mostrati in Figura 3.3.7, sono stati calcolati come rapporto di intensità dell'elemento rispetto a quella dello stesso elemento relativa all'ultima serie acquisita (50 laser *shots*). Questa scelta operativa deriva dal

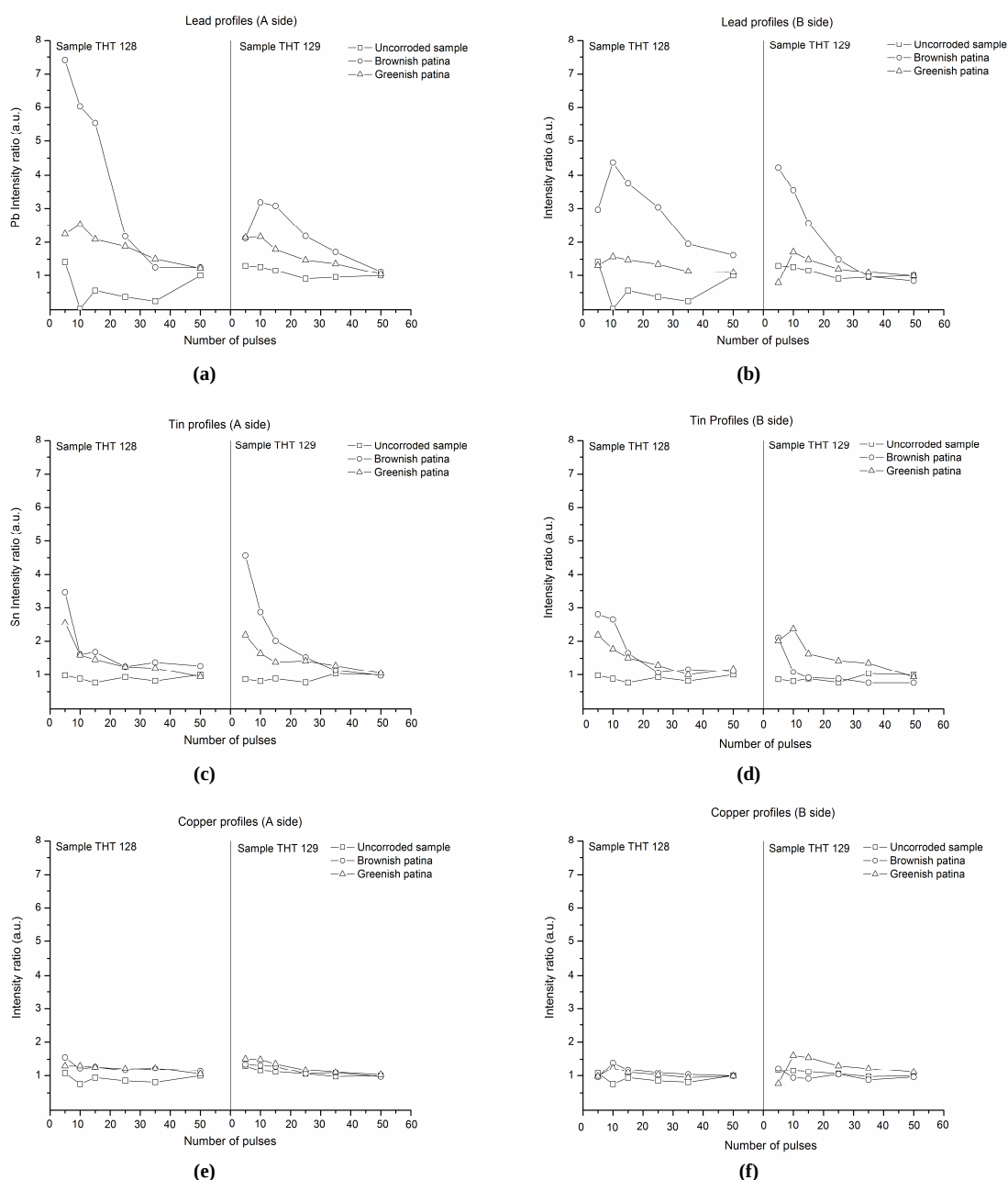


Figura 3.3.7. Profili di profondità di Pb, Cu, e Sn per i campioni non corrosi e per le patine brune e verdi dei campioni corrosi: (a) Pb- lato A; (b) Pb – lato B; (c) Cu – lato A; (d) Cu – lato B; e così via seguendo l'ordine nel testo.

tentativo di evitare le eventuali differenze nelle proprietà del metallo che non garantiscono gli

stessi rapporti stechiometrici nel plasma rispetto a quelli nella superficie originale evaporata [61, 64, 73].

Inoltre, questa decisione è altresì giustificata dall'interesse a valutare le variazioni relative degli elementi lungo i diversi strati strutturali del campione bronzeo (cioè patine verdastre, brune e lega metallica). I profili (di piombo, stagno e rame) in Figura 5.3.7, relativi ai campioni non corrosi ed alle patine verdi e brune, permettono dunque di stimare il contributo degli elementi costituenti la lega alla crescita degli strati di corrosione, seguendo la loro distribuzione lungo lo spessore investigato fino al *bulk*. Il confronto con i corrispondenti campioni non corrosi garantisce il raggiungimento di questa condizione.

L'analisi comparativa, effettuata tra le due tipologie di campioni (senza e con Zinco), le tre tipologie di zone indagate (patina bruna, verde, e campione non corrosivo), i due lati del campione (A e B), permette di dedurre importanti informazioni utili agli scopi prefissati da questa indagine.

Il comportamento dei profili di piombo è molto variabile da punto a punto a causa della sua bassa concentrazione nei campioni e della sua non uniforme distribuzione nella lega. Tuttavia, per quanto riguarda i punti indagati, le misure LIBS hanno confermato il fenomeno della migrazione del piombo dal *bulk* verso la superficie [51, 52], come già discusso per i dati relativi alle misure XRF degli strati esterni (Fig. 3.3.4). Non è stato possibile ottenere misure LIBS per spessori più piccoli ($<100\text{ }\mu\text{m}$) a causa delle difficoltà di rilevare il piombo tramite i parametri strumentali utilizzati. Le acquisizioni di cui si riportano i dati sono state effettuate con i parametri strumentali che garantiscono la migliore efficienza di rivelazione per questo elemento.

I profili relativi allo stagno (*tin*) mostrano comportamenti diversi per entrambi i lati e tipologia di campioni, anche se in ogni caso, è osservabile un arricchimento di questo elemento. Questi risultati confermano che un arricchimento di stagno interessa spessori più profondi di quelli esaminati dall'XRF. In accordo con i risultati precedenti, l'arricchimento dello stagno è una conseguenza della sua bassa solubilità ed elevata stabilità dei suoi composti di neoformazione, che permette agli ioni di rimanere nella patina [51]. Tuttavia, anche in questo caso non è stato possibile realizzare misure LIBS in funzione dello spessore ($<100\text{ }\mu\text{m}$) per le analoghe difficoltà descritte nel caso del piombo.

Il comportamento dei profili del rame e dei valori dei rapporti di intensità tra le due tipologie di campione (THT128 e THT 129), restano approssimativamente costanti. Tuttavia,

anche per questi spessori indagati, solo in alcuni casi, è possibile osservare valori bassi dei rapporti di intensità che rivelano un contenuto minore in superficie rispetto al *bulk*, a conferma del processo di decuprificazione già verificato dalle indagini XRF (Figura 3.3.4). A differenza del piombo e dello stagno, è stato possibile, per il rame, ottenere misure LIBS relativamente a spessori inferiori ($<100\text{ }\mu\text{m}$), utilizzando un nuovo set di parametri strumentali e mantenendo una buona efficienza di rivelazione. I dati LIBS, infatti, hanno fornito informazioni complementari sul differente comportamento degli elementi della lega anche se non direttamente confrontabili con i dati XRF mostrati nella Figura 3.3.4 in quanto si riferiscono a differenti spessori indagati. Per superare questo inconveniente, è stata acquisita una nuova serie di dati con adeguati parametri LIBS che ha permesso di analizzare i profili di profondità con una maggiore risoluzione spaziale. In questo modo è stato possibile studiare strati esterni di spessore confrontabile con quello analizzato dall'XRF e non rilevabile tramite il precedente set-up sperimentale LIBS. Questa analisi è stata in grado di fornire informazioni solo sul comportamento del rame, poiché con tali parametri LIBS, anche a causa della bassa concentrazione di stagno e piombo, non è garantito un comportamento statisticamente rappresentativo di questi ultimi.

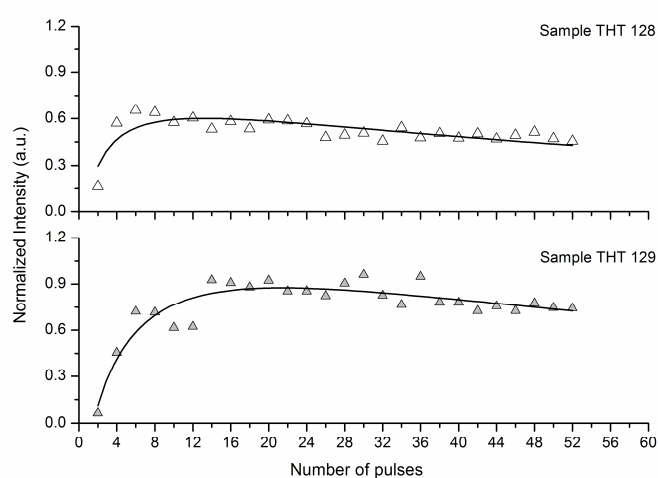


Figura 3.3.8. Profili di profondità del rame normalizzati ai valori medi di intensità del picco dei corrispondenti campioni non corrosi.

Pannello superiore: per la patina verde del campione 128 (triangoli vuoti). Pannello inferiore: per la patina verde del campione 129 (triangoli grigi)

La Figura 3.3.8 mostra i profili di profondità del rame, relativamente alla linea spettrale 521.8 nm, normalizzati ai valori medi dell'intensità del picco del corrispondente campione non corrosi, per la patina verde del campione 128 (triangoli vuoti) e 129 (triangoli grigi). La linea spettrale scelta è caratterizzata da una più alta intensità rispetto alla 285.5 nm del rame e ciò ha permesso di ottenere i grafici mostrati nella precedente figura i cui dati sperimentali sono stati fittati con una funzione Lognormal.

Al fine di raggiungere un livello di segnale lineare, sono stati necessari 8 e 14 colpi di laser rispettivamente per THT 128 e THH129. Questi risultati hanno permesso di discriminare

gli strati di corrosione con diverso spessore. In particolare, attraverso lo spessore dello strato corrosivo fino al *bulk*, il rame mostra un incremento di concentrazione confermando quanto già ottenuti mediante l'analisi XRF. Inoltre, raggiungendo il bulk con ripetuti impulsi laser, le differenze in concentrazioni di rame mostrano una tendenza a ridursi. Questi risultati necessitano di ulteriori indagini per analizzare i fenomeni che avvengono nella parte più profonda dello strato di corrosione dove *bulk* e strati di corrosione sono strettamente connessi.

3.4 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'approccio metodologico usato, mirato ad un'analisi comparata ed integrata dei dati XRF-LIBS, si è rivelato appropriato per caratterizzare le superfici degradate dei campioni bronzei e determinare la composizione chimica degli strati di corrosione e la sua variazione lungo lo spessore analizzato.

L'analisi integrata dei dati XRF e LIBS è stata in grado di fornire informazioni sulla distribuzione degli elementi che costituiscono la lega lungo lo spessore corrosivo. La tecnica LIBS ha permesso "di discretizzare" il volume indagato al fine di confrontare spessori simili rispetto ai dati XRF, grazie alla sua capacità di discriminare le informazioni sulla composizione lungo lo spessore dello strato analizzato.

L'analisi dei dati ha reso possibile la caratterizzazione delle tipiche patine di corrosione presenti su oggetti di bronzo, valutando uno dei fattori che maggiormente influenzano la crescita degli strati di corrosione, vale a dire gli elementi di lega. Inoltre, sono state ottenute informazioni significative sul comportamento degli elementi costituenti la lega, e la loro migrazione dal bulk verso lo strato di corrosione.

In particolare, per quanto riguarda la distribuzione nella patina degli elementi costituenti la lega, le misure LIBS hanno evidenziato due tipi di comportamento. I profili di profondità hanno reso possibile la distinzione tra le diverse tipologie di comportamento nei campioni. In particolare, nella parte più profonda degli strati di corrosione, il piombo mostra una grande variabilità a causa della diversa natura delle aree analizzate (verde o bruna), le concentrazioni di stagno sembrano aumentare attraverso lo spessore della patina diversamente da quelle del rame che mantengono valore costante. Esclusivamente per questo ultimo

elemento, un nuovo set di parametri LIBS scelto per ottenere una maggiore risoluzione spaziale, ha permesso di studiarne il comportamento attraverso l'intero spessore dello strato di corrosione fino al *bulk*.

Al fine di effettuare un'analisi LIBS quantitativa più accurata, ulteriori indagini sono in corso per valutare la massa ablata dal laser per ogni colpo in seguito alle differenti proprietà chimiche e fisiche dei materiali. Oltre a ciò, altre attività di ricerca saranno indirizzate a comprendere come i parametri del laser (energia e fluenza laser) possano alterare la composizione del plasma e la sua evoluzione nel tempo.

CAPITOLO 4

CASO STUDIO 3: STRUTTURE POROSE E LORO DINAMICHE FENOMENOLOGICHE

Il vero viaggio di scoperta non consiste nel cercare nuove terre, ma nell'avere nuovi occhi.

Marcel Proust

In questo capitolo si riporta una nuova metodologia di analisi che permette la caratterizzazione di strutture porose e lo studio delle dinamiche fenomenologiche che le riguardano, attraverso l'analisi di immagini acquisite mediante la tecnica di tomografia computerizzata. Questo capitolo consta di una parte introduttiva sui modelli più accreditati per descrivere il fenomeno dell'imbibizione, sulla tecnica usata per le acquisizioni, alla quale seguono i dettagli dell'analisi condotta su campioni di rocce sedimentarie e la loro discussione.

4.1 I SISTEMI POROSI ED IL FENOMENO DELLA RISALITA CAPILLARE: I MODELLI

Uno dei problemi alla base di modificazioni strutturali nei materiali porosi è sicuramente il fenomeno dell'imbibizione d'acqua. Le forze capillari sono più intense all'estremità più stretta del poro. La comprensione e valutazione di tale fenomeno nei sistemi porosi interessati è auspicabile [74] sia al fine di monitorarne la progressione che di prevenire l'insorgenza nei casi in cui sia richiesto.

Nei materiali porosi, come le rocce sedimentarie, il fenomeno di imbibizione d'acqua è causato dalle forze di attrazione differenziale, tra le pareti dei pori e il fluido [75]. A seconda delle ipotesi formulate in merito, la progressione del fronte di bagnamento all'interno delle rocce porose può essere descritta sia da un'equazione di avanzamento del fronte (modello di Handy) [77-90] sia da un'equazione di tipo diffusiva [76-80]. Nel secondo caso, la velocità del fronte di bagnamento è proporzionale al gradiente di pressione capillare in funzione della distanza e i fronti assumono un profilo piatto (*"piston like displacement"*). Nel primo caso, il coefficiente di diffusione è proporzionale alla derivata parziale della pressione capillare rispetto alla saturazione dell'acqua e i fronti di spostamento calcolati, sono significativamente diffusi (comportamento di percolazione). Di seguito verranno descritti in maniera più esplicita queste due tipologie di modelli in grado di descrivere il fenomeno dell'imbibizione: 1) modello di Handy, 2) modello stocastico.

E' noto che l'imbibizione definisce il processo mediante il quale un fluido sposta un altro da un supporto poroso a causa solamente di forze capillari. Quando l'acqua è in contatto con un mezzo poroso, le forze capillari dominano sulle forze viscosi, e la dinamica è determinata dal raggio dei pori locali r . Per descrivere lo spostamento d'aria da parte dell'acqua durante l'imbibizione, sono state ricavate equazioni differenziali ma non sono state risolte [87-88]. Con opportune ipotesi, tuttavia, le soluzioni per l'imbibizione di acqua-aria sono possibili e conducono alla derivazione di un'equazione per uno spostamento *piston like* [89]. Il rate di imbibizione in mezzi porosi è analogo al rate di risalita capillare nei capillari. Le ipotesi di base sono: 1) l'acqua imbibisce in maniera piston-like;-2) il gradiente di pressione nella fase gassosa del fronte d'acqua può essere trascurato.

Se l'imbibizione avviene verticalmente verso l'alto, il rate del flusso può essere derivato dall'equazione di Washburn [90] secondo la legge di Darcy:.

$$v_w = \frac{k_w}{\mu_w} \left(\frac{P_c}{z} - \Delta \rho g \right) \quad 4.1.1$$

dove v_w ($m s^{-1}$) è la portata, k_w la permeabilità efficace dell'acqua¹⁶, μ_w la viscosità dell'acqua, P_c la pressione capillare, $\Delta \rho$ la differenza di densità per acqua e aria, g l'accelerazione di gravità e z la posizione del fronte d'acqua. P_c è definito dall'altezza capillare all'equilibrio h_e ($h_e = \frac{P_c}{\rho_w g}$)

¹⁶ L'unità di misura della permeabilità al flusso del fluido è definita come la quantità di permeabilità che permette ad 1 metro cubo di liquido di viscosità di 1 Pascal al secondo di fluire attraverso una sezione di 1 m di spessore con una sezione di 1 m² in 1 sec. ad una differenza di pressione di 1 Pa.

Per lo spostamento *piston-like* il rate del flusso è:

$$v_w = \theta_w \frac{\partial z(x,t)}{\partial t} = \theta_w \frac{dz}{dt} \quad 4.1.2$$

dove θ_w è il rapporto tra il volume di acqua contenuto nello spazio poroso ed il volume totale dello spazio poroso. Sostituendo l'eq. (4.1.2) in (4.1.1), si ottiene:

$$\frac{dz}{dt} = \frac{k_w}{\theta_w \mu_w} \left(\frac{P_c}{z} - \Delta \rho g \right) \quad 4.1.3$$

L'integrazione dell'Eq. (4.1.3) dà un risultato analogo a quello del rate di risalita capillare in un tubo capillare

$$z + \frac{P_c}{\Delta \rho g} \ln \left(1 - \frac{\Delta \rho g z}{P_c} \right) = - \frac{k_w \Delta \rho g}{\theta_w \mu_w} t \quad 4.1.4$$

Se $\frac{\Delta \rho g z}{P_c} \ll 1$ (cioè quando le forze di gravità sono molto inferiori di quelle capillari),

espandendo in serie di Taylor il termine logaritmico della Eq. (4.1.4) si ricava:

$$\ln \left(1 - \frac{\Delta \rho g z}{P_c} \right) = \ln \left(1 - \frac{z}{h_e} \right) \cong - \frac{z}{h_e} - \frac{1}{2} \left(\frac{z}{h_e} \right)^2 \quad 4.1.5$$

Tenendo conto del rapporto tra P_c e h_e precedentemente descritto e trascurando il valore della densità dell'aria rispetto a quella dell'acqua (cioè $\Delta \rho = \rho_w - \rho_a \cong \rho_w$), è possibile discriminare le caratteristiche della fase liquido dalla matrice solida introducendo la conducibilità idraulica ($m s^{-1}$) definito da $K_w = \frac{k_w \rho_w g}{\mu_w}$. Utilizzando l'eq. (4.1.5) l'eq. (4.1.4) si riduce a

$$z = \sqrt{\left(\frac{2 h_e K_w}{\theta_w} \right) t} = S_w \cdot t^{1/2} \quad 4.1.6$$

dove S_w ($mm/s^{1/2}$) è chiamato *sorptivity* ed esprime la capacità di un mezzo poroso di assorbimento capillare di un liquido. In generale, si tratta di una approssimazione, poiché sono presenti gradienti di saturazione. L'equazione (4.1.6) è in grado di discriminare il comportamento di risalita capillare di mezzi porosi differenti.

L'assorbimento capillare di acqua in un mezzo poroso può anche essere descritto nell'ambito della teoria della percolazione, secondo cui la dinamica del processo riproduce lo spostamento di un fluido da un altro in modo casuale. In un mezzo poroso, il flusso del fluido

è una tipica realizzazione sperimentale del moto di un interfaccia non in equilibrio in un ambiente disordinato. Nel caso tipico, un'interfaccia d-dimensionale affine caratterizzata da una altezza $h(x, t)$ si muove in un mezzo disordinato $(d + 1)$ dimensionale [76-79]. Due classi principali di disordine sono stati discussi in letteratura. Il primo denominato "termico" o "*annealed*", dipende solo dal tempo, il secondo, denominato "*quenched*" è fisso nel mezzo. La presenza di un disordine *quenched* permette un'interessante analogia con i fenomeni critici, descrivendo due classi di universalità [84]. Il movimento continuo dell'interfaccia richiede l'applicazione di una forza motrice F . Esiste un valore critico F_c tale che per $F < F_c$, l'interfaccia sarà mantenuta (*pinned*) dal disordine dopo qualche tempo finito. Per $F > F_c$ l'interfaccia si muove a tempo indeterminato con una velocità costante v . Questo significa che, in mezzi disordinati, il moto di un'interfaccia può essere studiata come una transizione di fase di transizione chiamato *depinning*. La prima classe di universalità è descritta dalla una equazione non lineare di Langevin nota come equazione di Kardar-Parisi-Zhang [77-81].

$$\frac{\partial h}{\partial t} = F + v \nabla^2 h + \lambda (\nabla h)^2 + \eta(x, t) \quad 4.1.7$$

in cui il coefficiente del termine non lineare λ diverge alla transizione di *depinning*. La seconda classe di universalità è descritta dalla equazione di Langevin nota come equazione Edward-Wilkinson [77,80]

$$\frac{\partial h}{\partial t} = F + v \nabla^2 h + \eta(x, t) \quad 4.1.8$$

dove il termine $v \nabla^2 h$ rappresenta una tensione superficiale e agisce per smussare l'interfaccia, mentre il termine di rumore *quenched* $\eta(x, t)$ introduce la rugosità dell'interfaccia.

4.2 UN APPROCCIO METODOLOGICO ALLO STUDIO DI STRUTTURE POROSE [94]

Le variazioni dei volumi di acqua, all'interno dei pori delle rocce sedimentarie, dovute a diverse condizioni di temperatura (variazioni di temperatura giornaliera e stagionali) causano alterazioni della meccanica degli elementi porosi. Ne consegue che, riuscire a misurare

(stimare) la distribuzione spaziale del contenuto in acqua è fondamentale sia per valutare lo stato della struttura sia per pianificare un intervento di consolidamento o restauro. La X-Ray Imaging TC fornisce un supporto adeguato per tali indagini con un'eccellente risoluzione temporale e spaziale [91-93].

Per questo studio sono state acquisite immagini TC di campioni di rocce sedimentarie provenienti da diverse cave siciliane (nelle aree archeologiche di Agrigento e Selinunte e della Val di Noto) e utilizzate per la costruzione dei templi greci e dei palazzi barocchi della Val di Noto. L'obiettivo primario è stato quello di mostrare l'adeguatezza della risoluzione spaziale dell'*imaging* CT raggi X per lo studio di tali rocce. Questa tecnica di imaging, messa a punto per lo studio flusso nei mezzi porosi, permette quindi una visualizzazione in tempo reale e la stima delle distribuzioni di acqua attraverso rocce sedimentarie. I risultati concordano bene con i modelli teorici che descrivono infiltrazioni d'acqua e riproducono il contenuto di acqua [78, 89].

La Tavola 4.2.1 riporta le principali caratteristiche petrografiche di tali rocce. La Figura 4.2.1 presenta campioni rappresentativi di queste tipologie di rocce attraverso osservare la morfologia dei pori.

Tavola 4.2.1: Caratteristiche petrografiche dei campioni di rocce sedimentarie

	Agrigento	Cusa	Val di Noto
<i>Classificazione</i>	limestone	limestone	silt
<i>Dimensione dei pori</i>	0.2÷8mm	0.2÷0.5mm	~0.06 mm
<i>Tipo di porosità</i>	intergranulare	intergranulare	intergranulare
<i>Grado di porosità</i>	medio-alta	alta	alta

In particolare, la roccia Agrigento risulta essere il campione più eterogeneo, come dimostrato dalla presenza di inclusioni. Il campione di Val di Noto è quello più omogeneo ed è caratterizzato da pori di piccole dimensioni.

Al fine di ottimizzare il set-up di acquisizione delle immagini TC, i campioni sono stati sagomati a forma cubica con le dimensioni di 40 mm di larghezza.

La scelta di tali dimensioni è legata al limite sperimentale del surriscaldamento dell'anodo a raggi X, conseguenza sia dell'alto valore di tensione necessario per penetrare un grande spessore del campione, sia della necessità di acquisizioni molto veloci per il monitoraggio della risalita capillare dell'acqua.

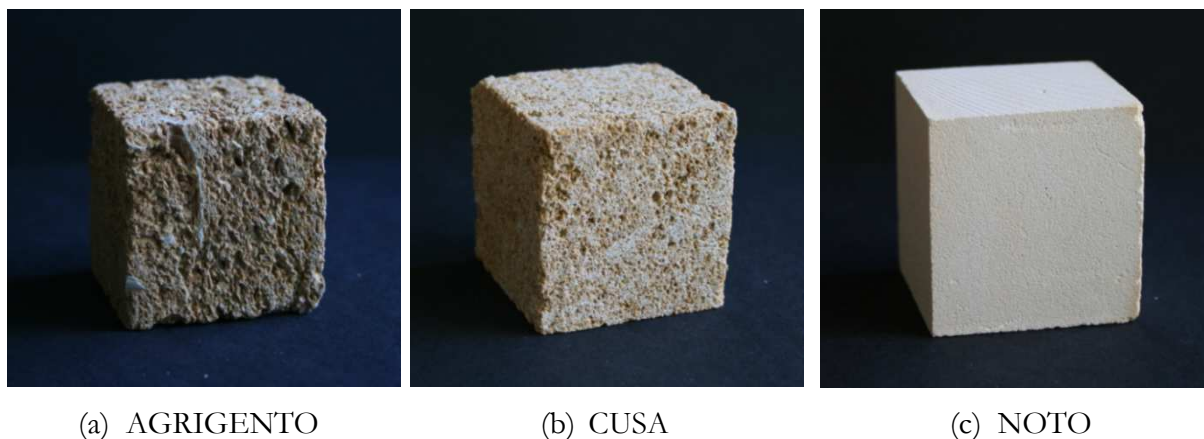


Figura 4.2.1 Foto dei campioni di rocce sedimentarie provenienti dalle aree archeologiche di (a) Agrigento, (b) Cusa, (c) Noto.

Per gli esperimenti riguardanti l'assorbimento d'acqua dal basso verso l'alto, i campioni di roccia sono stati collocati in un contenitore chiuso in maniera tale da esporre l'intera superficie inferiore all'acqua. Dopo un trattamento di essiccazione, consistito nel riscaldamento termico di 60°C per una settimana in un forno ventilato e seguito da un raffreddamento per tre ore in un essiccatore, ogni campione è stato messo in un contenitore con un filtro di carta bagnata secondo le norme dello standard UNI 10.859 [95]. Il livello dell'acqua è stato mantenuto fisso da un apposito sistema di ricarica alimentato da un sistema idraulico attivo.

Le immagini TC sono state acquisite dal dispositivo multislice Philips Brilliance 64 (Philips Medical Systems, Eindhoven, Olanda), operativo presso la *Sezione di Scienze Radiologiche del Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche e Forensi dell'Università di Palermo* che ha collaborato a questa indagine.

La Figura 4.2.2 mostra un quadro schematico del dispositivo TC e dell'apparato sperimentale usato per l'acquisizione delle immagini.

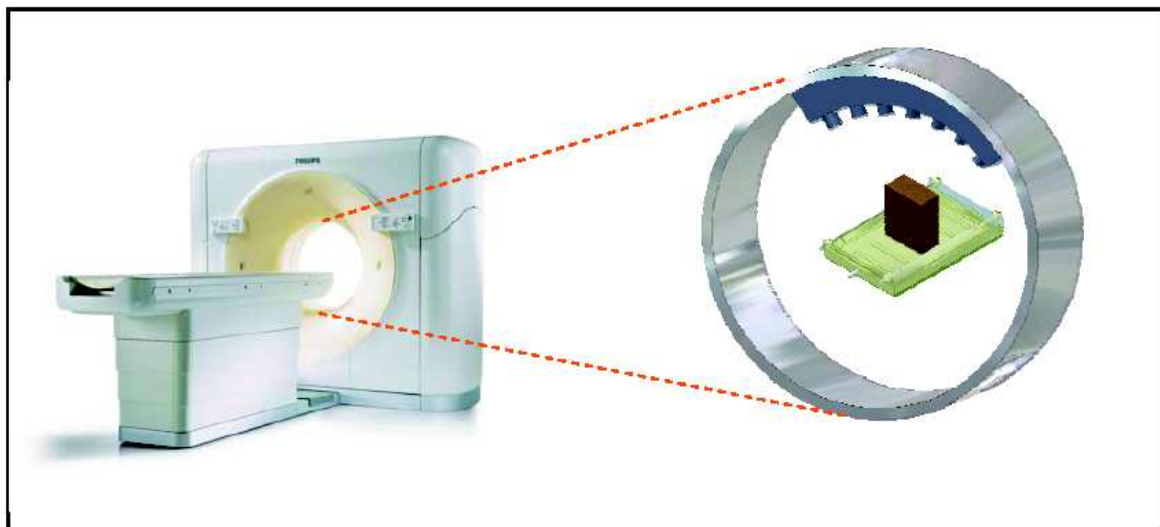


Figura 4.2.2 Immagine schematica del dispositivo X-ray CT multislice e l'apparato sperimentale utilizzato per acquisire le immagini.

L'acquisizione volumetrica è stata eseguita con spessore mm 0,625 e ricostruita nel post-processing a 0,625 millimetri di spessore, in tempi diversi, prima e dopo il contatto con l'acqua. I parametri del set-up sperimentale sono 120 kV e 250 mA, rispettivamente per l'alta tensione e corrente dell'anodo di tungsteno. La dimensione dell'immagine è 1024×1024 pixel, con una risoluzione di 5,689 pixel per mm. Le *slices* sono state acquisite in maniera contigua con uno spessore di 0,625 mm quindi, per ogni campione sono state acquisite 64 immagini in direzione assiale. Un algoritmo di dettaglio è stato utilizzato nel processo acquisizione e in quello di ricostruzione.

La sequenza temporale, adeguata a seguire la cinetica di risalita capillare di acqua nei campioni ed usata per le acquisizioni delle immagini TC è stata stimata attraverso misure gravimetriche. Questo metodo consiste in una sequenza temporale di pesate dei campioni asciutti e bagnati, fino alla saturazione [90]. Le misure gravimetriche hanno permesso di valutare la quantità di acqua assorbita per unità di superficie (Q_i). Per una significatività statistica, sono state eseguite quattro misure sullo stesso campione.

Al fine di seguire la dinamica di risalita capillare attraverso l'analisi delle immagini TC è stata implementata una mappa dei valori di attenuazione CT della *slice* coronale centrale del campione al momento del suo inserimento nel contenitore e ad intervalli regolari (1, 2, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 20 minuti) dopo il suo bagnamento.

Per visualizzare la progressione del fronte di bagnamento lungo l'altezza del campione, tale mappa è stata successivamente trasformata in una mappa a falsi colori corrispondenti a diversi valori di attenuazione CT.

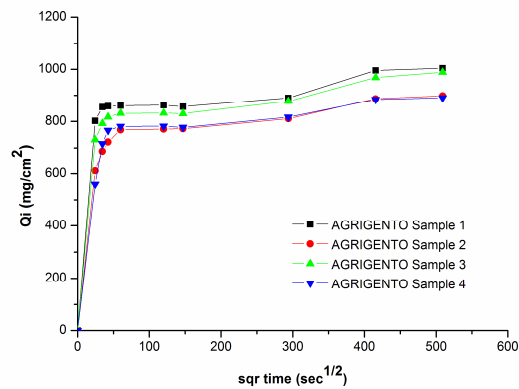
Le misure dei valori di attenuazione CT (definiti precedentemente nel par. 1.4) a diversi istanti di tempo dal contatto dei campioni con l'acqua, sono state effettuate selezionando una regione di interesse (ROI – *Region of Interest*) di forma quadrata della stessa dimensione del campione.

La media dei valori di attenuazione CT misurati nella ROI, ottenuta su cinque *slices* coronali, equamente distribuite lungo la direzione sagittale del campione, è stato utilizzata per valutare l'altezza media del fronte di bagnamento, con diverse scansioni CT ad intervalli fissi (1, 2, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 20 minuti) dopo il bagnamento, al fine di descrivere il comportamento dinamico del processo di imbibizione.

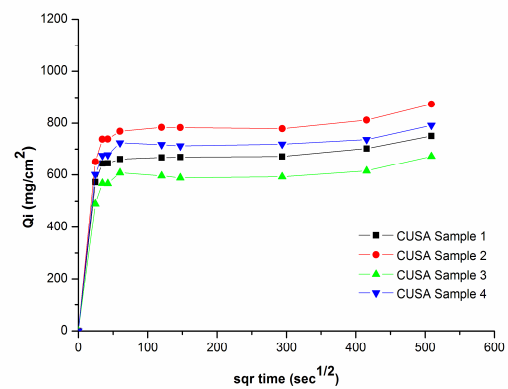
4.3 ANALISI DI IMMAGINI TC PER LO STUDIO DI ROCCE SEDIMENTARIE [94]

In Figura 4.3.1 sono riportati i valori della quantità di acqua Q_i [mg/cm²], assorbita dai campioni in funzione della radice quadrata del tempo, misurate secondo le procedure riportate nel paragrafo precedente.

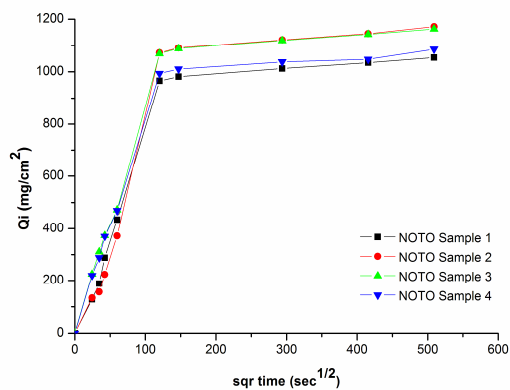
Dall'analisi degli andamenti, si evidenzia una cinetica molto veloce per i campioni di Cusa ed Agrigento e una più lenta per quello di Val di Noto, come prevedibile data la diversa morfologia dei loro pori. Inoltre, relativamente al campione di Agrigento, il “ginocchio” della curva, indice dell'inizio della saturazione, compare più tardi rispetto al campione di Cusa. Questo fatto è ben correlato con l'analisi del numero CT, come sarà descritto di seguito.



(a)



(b)



(c)

Figura 4.3.1 Indice di assorbimento per i tre campioni di rocce sedimentarie analizzate: (a) Agrigento, (b) Cusa, (c) Val di Noto.

La Figura 4.3.2, mostra le mappe a colori derivate dai valori di attenuazione CT ottenuti dal campione di Agrigento, dalle quali è possibile visualizzare la distribuzione dell'acqua all'interno della struttura rocciosa.

La prima immagine (in alto a sinistra) è relativa alla prima acquisizione CT (dopo 1 minuto dall'inserimento nel contenitore) le altre immagini si riferiscono agli intervalli di tempo fissati (2, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 20 minuti dopo il suo bagnamento). La barra di colore in ogni immagine è legata ai valori di attenuazione CT. Nella immagine in alto a sinistra è evidente la distribuzione disomogenea delle zone del valore di attenuazione. Le immagini successive mostrano un aumento di zone arancione e rosse, corrispondenti alla imbibizione percolativa dell'acqua.

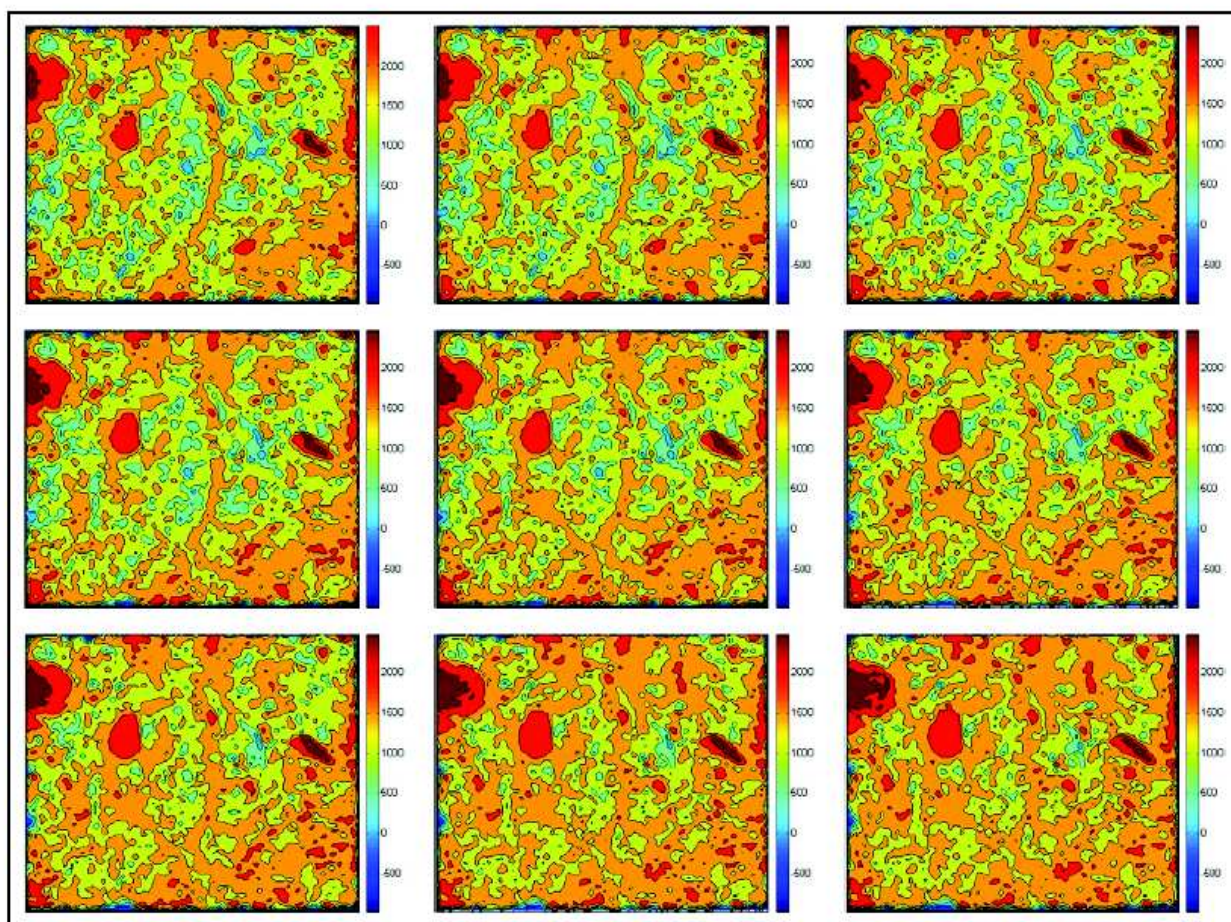


Figura 4.3.2 Mappa a colori derivata dai valori di attenuazione CT della distribuzione dell'acqua nella roccia di Agrigento.

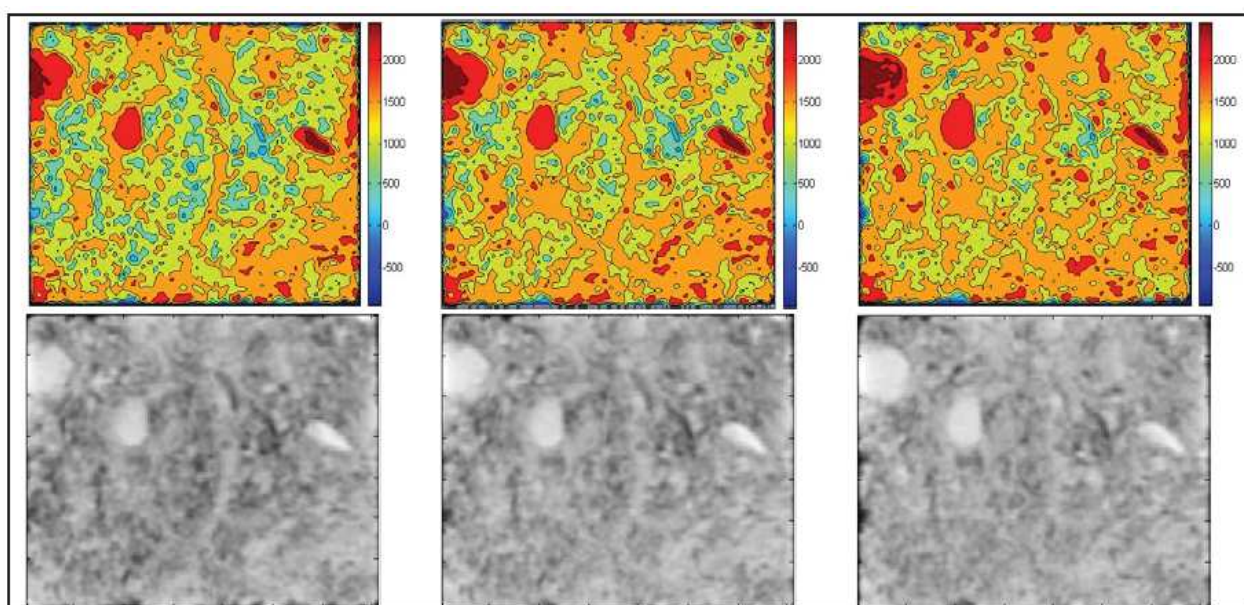


Figura 4.3.3 Un confronto tra immagini a falsi colori e immagini a livelli di grigio del campione di Agrigento

La Figura 4.3.3 mostra un confronto tra le immagini dell'ultima colonna della Figura 4.3.2 e le corrispondenti immagini in scala di grigi.

La struttura più disomogenea del campione di Agrigento nei confronti di altre rocce, si riflette sul fatto che l'acqua si distribuisce nei pori in modo percolativo e non secondo il modello di Handy [89]. Quindi, la dinamica del suo fronte di bagnamento è correlata con il tempo attraverso una equazione stocastica (eq. 4.1.7), come Kardar-Parisi-Zhang [77, 81].

La Figura 4.3.4 riporta le variazioni del numero di Hounsfield (vedi par. 1.4) sulle immagini TC, acquisite secondo la procedura temporale già esposta, relative al campione di Noto. Nei suoi pannelli è possibile seguire i profili di tre zone di diversa densità: arancione, giallo e verde.

La zona ad alta densità (arancione) che si trova lungo il profilo del campione è una conseguenza della grande quantità di dose assorbita in quella zona. In corrispondenza agli intervalli temporali successivi fissati per l'acquisizione, si osserva un aumento della zona arancione ed una diminuzione della zona verde, legata all'avanzamento del fronte di bagnamento dal basso verso l'alto.

La Figura 4.3.5 mostra il confronto tra le immagini dell'ultima colonna di Figura 4.3.4 e le corrispondenti immagini raffigurate in scala di grigi. Entrambe le figure, permettono di visualizzare il movimento del fronte di bagnamento (dal basso verso l'alto) e di determinare, qualitativamente, la distribuzione dell'acqua all'interno del materiale poroso. Questi risultati mostrano che il fronte di bagnamento nel campione della Val di Noto è abbastanza piatto e si muove proporzionalmente alla radice quadrata del tempo, in accordo con la letteratura (eq. 4.1.6) [89].

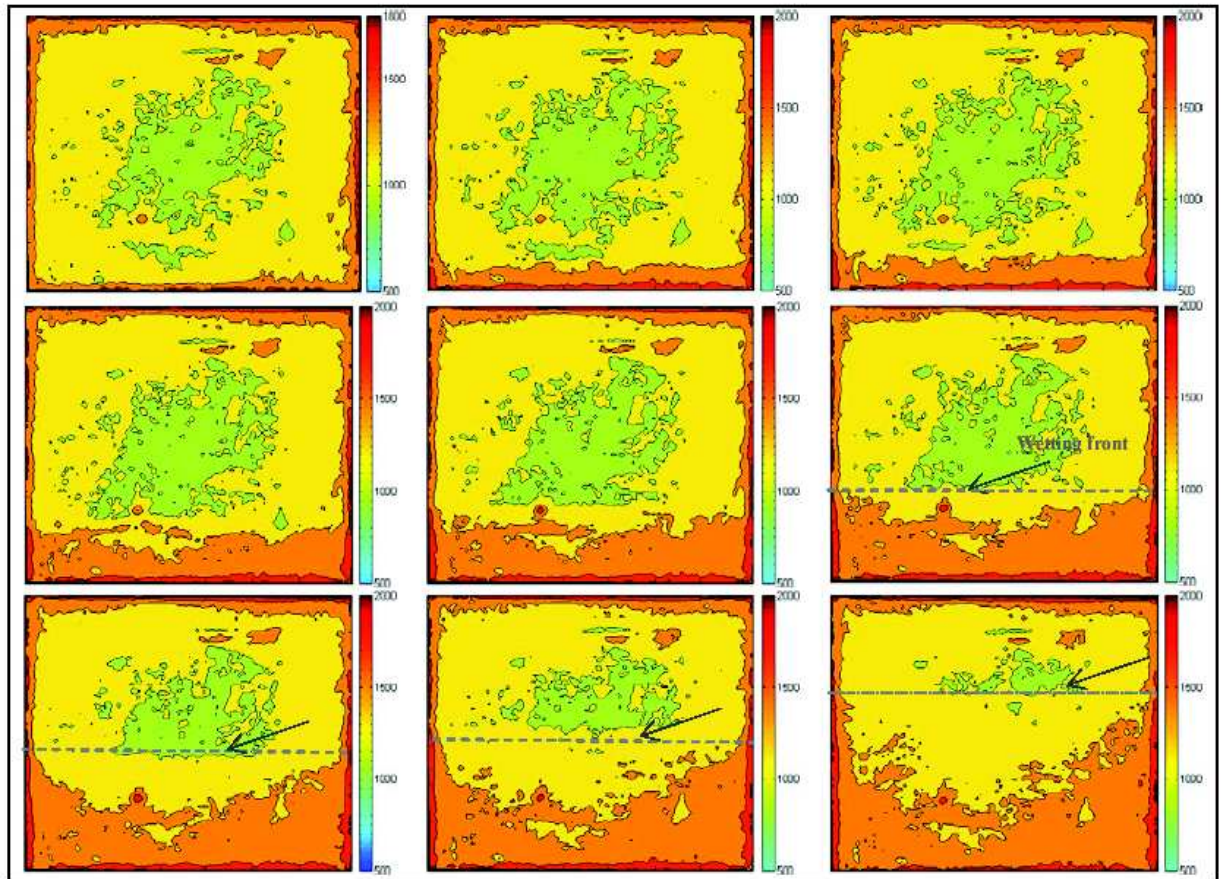


Figura 4.3.4 L'imbibizione dell'acqua nel campione di Noto è mostrata attraverso le variazioni del numero di Hounsfield sulle immagini TC. La prima immagine (in alto a sinistra) è relativa al campione asciutto, le altre sono state acquisite a differenti tempi successivi al contatto con l'acqua, 60, 120, 180, 300, 480, 600, 780, 900 e 1200 sec.

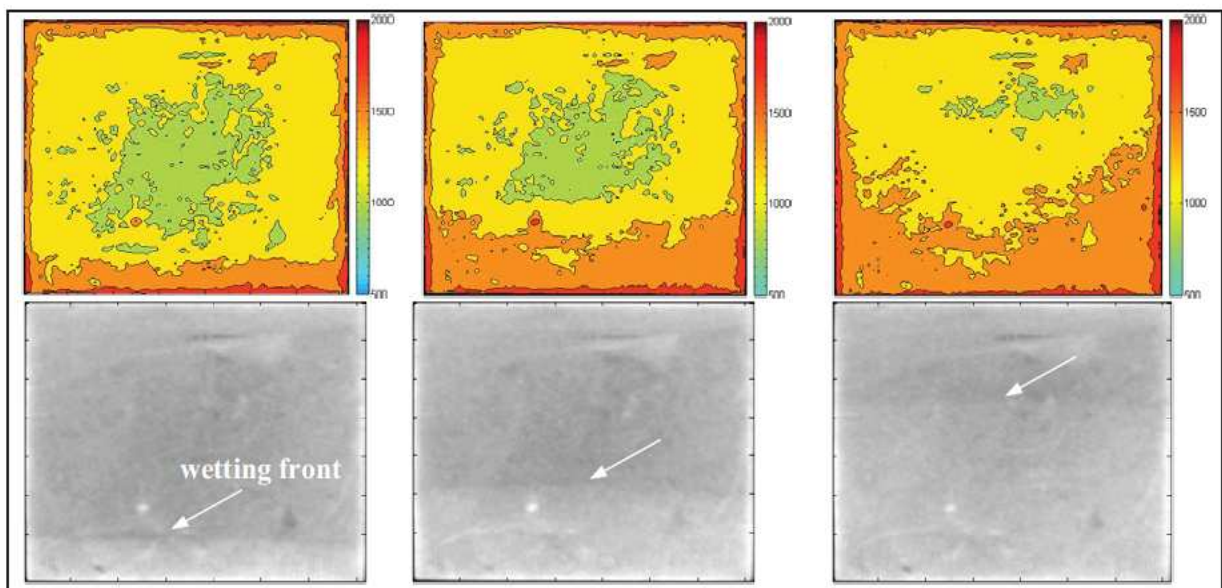


Figura 4.3.5 Confronto tra immagine a falsi colori ed in scala di grigi del campione di Val di Noto

Per quanto riguarda il campione di Cusa, dal momento che la sua cinetica di bagnamento è stata completata entro l'acquisizione TC effettuata dopo 1 minuto, non è stato possibile seguire la progressione del suo fronte di bagnamento con le mappe colorate implementate per le altre rocce.

L'approccio analitico fin qui seguito, ha evidenziato la possibilità di utilizzare i numeri TC per descrivere qualitativamente la dinamica dell'acqua all'interno del campione poroso. Procedendo su questa linea, si mostrerà come i numeri TC possono rivelarsi utili per ottenere informazioni circa l'altezza media del fronte d'acqua in diversi tempi dopo il contatto con l'acqua.

Figura 4.3.6 mostra, per i campioni di Agrigento e Val di Noto, i numeri TC in funzione della radice quadrata del tempo. L'intervallo di tempo considerato è quello relativo al comportamento lineare di tali campioni mostrato in Figura 4.3.1. Poiché le rocce sedimentarie sono costituite principalmente da calcio, il valore medio del valore di attenuazione TC misurato in un generico ROI cade nel range dei valori del 1300÷1700 HU, a seconda della densità e l'eterogeneità del campione asciutto.

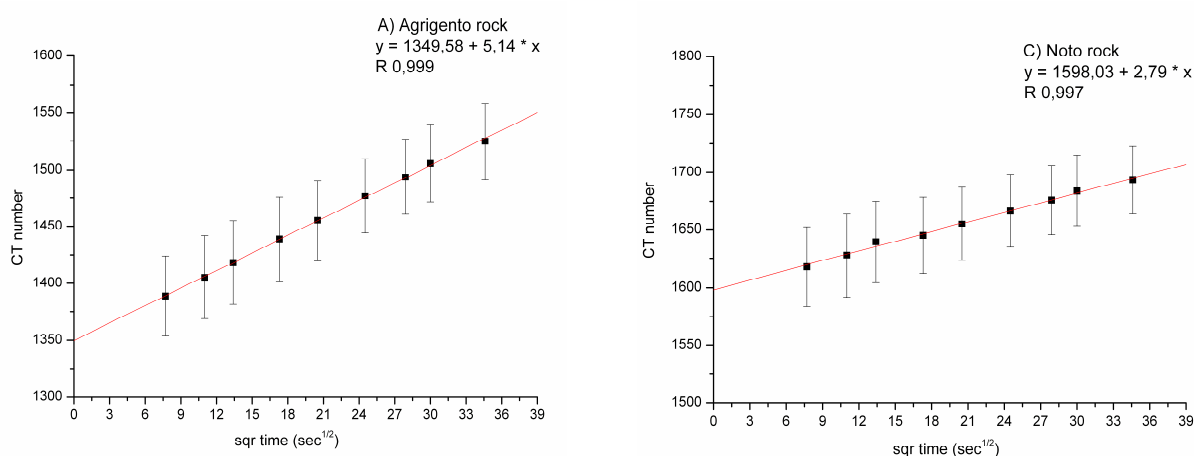


Figura 4.3.6 Grafici dei valori dei numeri CT in funzione della radice quadrata del tempo: (A) campione di Agrigento, (B) campione della Val di Noto.

Il comportamento lineare del numero TC versus la radice quadrata del tempo ha dimostrato che è possibile correlare i valori di numero TC con l'altezza media del fronte di bagnamento. Le principali differenze nei plot di Agrigento e della Val di Noto sono legati agli errori statistici, maggiori nel caso della roccia Agrigento, dove il fronte di bagnamento segue un comportamento percolativo rispetto a quello abbastanza piatto del campione della Val di Noto. Ciò è evidenziato anche dal grafico di Figura 4.3.7 in cui è rappresentata l'altezza media del campione Val di Noto in funzione della radice quadrata del tempo, misurato osservando l'insorgenza del fronte di bagnamento nelle immagini TC acquisite in tempi diversi.

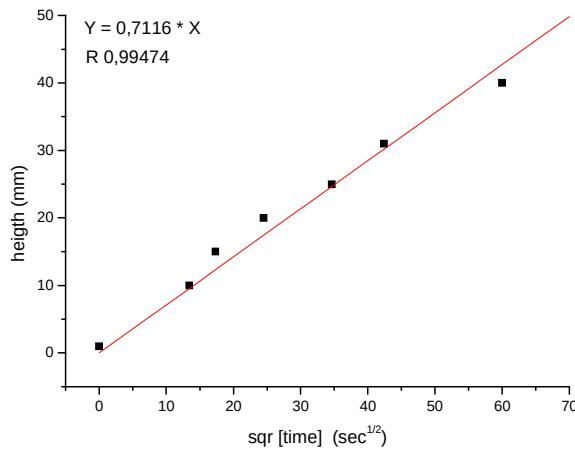


Figura 4.3.7 Best fit dei dati al modello di Handy relativi all'altezza media del fronte di bagnamento per il campione di Val di Noto.

In Figura 4.3.8 sono riportati, per il campione di Cusa, i numeri TC in funzione della radice quadrata dei tempi. Purtroppo, in questo caso il comportamento non è lineare a causa del fatto che al tempo corrispondente alla prima acquisizione TC, l'acqua assorbita dal campione aveva già raggiunto la condizione di saturazione. Pertanto, in questo caso non è stato possibile correlare il numero di TC per l'altezza media del fronte di bagnatura, come previsto dal modello di Handy.

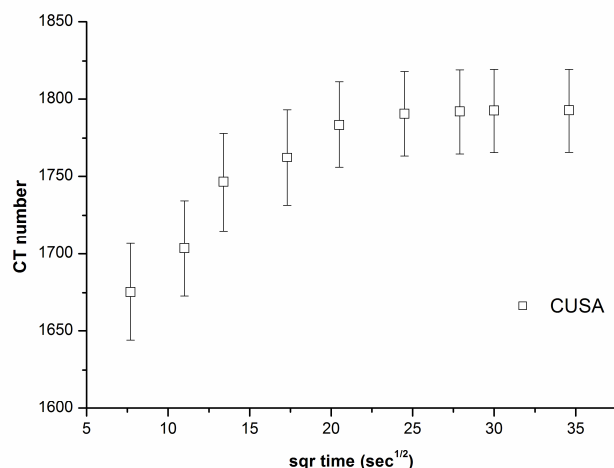


Figura 4.3.8. Valori medi dei numeri TC in funzione della radice quadrata del tempo per il campione di Cusa

□ CUSA

4.4 MICRO-TOMOGRAFIA COMPUTERIZZATA (μ -TC) PER LO STUDIO DI ROCCE SEDIMENTARIE [96]

Le immagini ottenute per acquisizione tramite la tomografia computerizzata (TC) mostrano la distribuzione bidimensionale e tridimensionale dei coefficienti di attenuazione lineare, strettamente correlati con l'energia della radiazione trasmessa, quindi con la densità e la composizione atomica del materiale investito dalla radiazione.

Tuttavia, in questo metodo, sono presenti limitazioni che non permettono l'utilizzo della strumentazione standard ai fini della caratterizzazione morfologica e del monitoraggio di fenomeni come quelli discussi in questo capitolo.

Tali problemi sono dovuti principalmente alla comparabilità della risoluzione spaziale con le dimensioni strutturali del campione da analizzare, come si è verificata nel caso della roccia di Noto.

Tale complicazione può essere superata solo nel caso in cui la risoluzione spaziale sia molto inferiore delle dimensioni strutturali, condizione questa raggiungibile solamente per mezzo della *micro-tomografia computerizzata* (μ -TC), tecnica radiologica che risale agli anni '80 e si basa sullo stesso principio della TC.

Tale tecnica, non distruttiva né invasiva, è una forma miniaturizzata della TC medica, e viene usata per creare mappe tridimensionali di piccoli campioni, di solito di pochi

centimetri di grandezza. La moderna strumentazione μ -TC permette di ottenere risoluzioni spaziali anche al di sotto dei 2 micron, che risultano particolarmente adatte allo studio di strutture porose come le rocce sedimentarie. Essa è molto utile per lo studio tridimensionale di strutture anche composite, per i quali oltre alla caratterizzazione porosimetrica è molto importante ottenere le immagini della formazione di eventuali fratture o lesioni interne.

Nella μ -CT convenzionale, un fascio di raggi X di forma conica attraversa il campione colpendolo da diverse angolature e proiettando una serie di "ombre" su un sistema di rivelatori. In questo tipo di tomografi è l'oggetto che ruota su se stesso, mentre la sorgente ed il sistema di rivelatori rimangono fissi. Mediante un algoritmo denominato di *Feldkamp* è possibile ricostruire l'immagine in modalità tridimensionale dal set di immagini bidimensionali corrispondenti a ciascuna proiezione. La matrice volumetrica così ottenuta e corrispondente ai diversi valori del numero di Hounsfield permette di ottenere la variazione di densità volumetrica del campione.

L'elaborazione delle immagini viene successivamente effettuata mediante un software specifico che permette la micro-caratterizzazione dei parametri di campioni come la porosità, la distribuzione delle dimensioni dei pori e le loro connessioni. Una dettagliata conoscenza della distribuzione del diametro dei pori e della loro connettività è, infatti, essenziale per la migliore comprensione dei fenomeni di tipo dinamico legati alla risalita capillare in mezzi porosi.

Questo paragrafo mostra l'applicazione di tale metodologia alla caratterizzazione strutturale delle strutture porose precedentemente analizzate mediante l'uso della TC medica.

Di seguito sono presentati alcuni risultati ottenuti attraverso l'elaborazione delle immagini acquisite con una strumentazione μ -CT SkyScan 1172 operativa presso l'Istituto per i Sistemi Agricoli e Forestali del Mediterraneo l'ISAFOM del CNR di Ercolano (Na), che ha collaborato a questo studio.

Nella Figura 4.4.1 è mostrata un'immagine dell'apparato micro tomografico Skyscan Mod. 1172, mentre nella Tavola 4.4.1 vengono riportati i valori di set-up strumentale utilizzati.



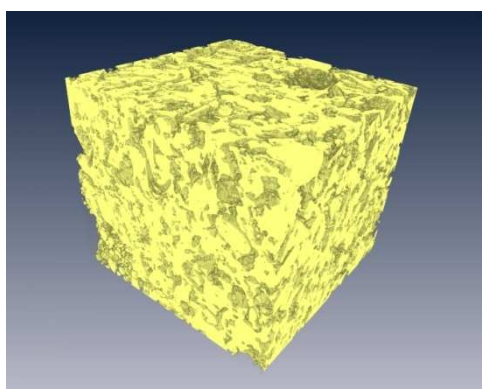
Figura 4.4.1. Micro tomografo Skyscan Mod. 1172

Tavola 4.4.1 Set strumentale del microtomografo.

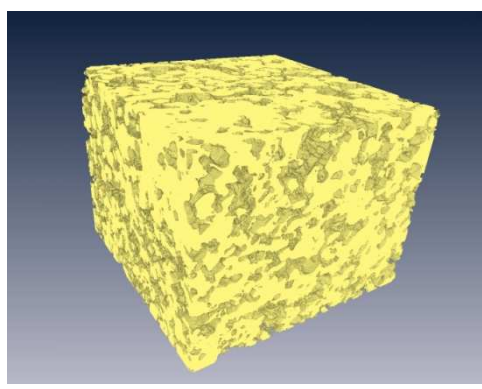
Parametri strumentali
Tensione: 60 ÷ 110 kV
Currente: 100 ÷ 200 mA
Max resolution: 1.3 μm
Filtro: Hamming
Sample shape: Cilinder
Max sample dimensions: 68 mm D x 68 mm H

Le analisi sono state effettuate sui campioni di forma cilindrica del diametro di 5mm e altezza di 10mm prelevati dai campioni di roccia sedimentaria di Agrigento, Cusa, e Noto già utilizzati per le precedenti analisi tomografiche.

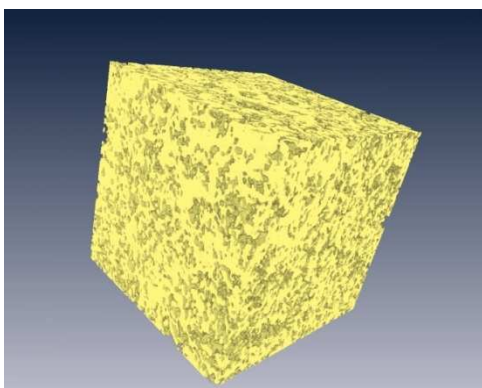
La potenzialità della tecnica di ricostruzione volumetrica con risoluzione micrometrica è evidente dall'analisi delle immagini riportate nelle Figure 4.4.2 e 4.4.3 attraverso le quali viene mostrata la struttura porosa dei campioni. Nel caso specifico le figure sono relative ad una ricostruzione 3D di una porzione cubica dei tre campioni delle dimensione di 100 μm ed estratta virtualmente dai campioni analizzati. Le immagini riportate in Figura 4.4.3 si differenziano da quelle riportate nella precedente figura poiché mostrano solamente gli spazi vuoti.



a)

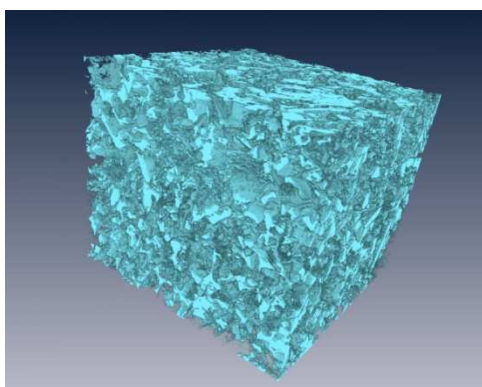


b)

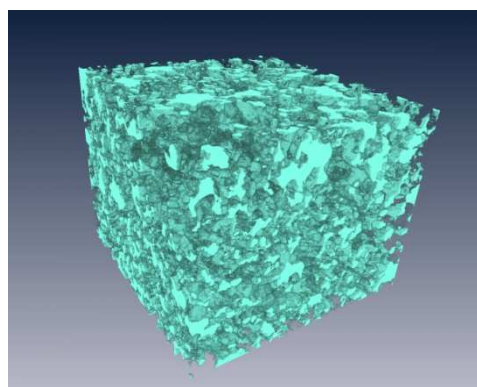


c)

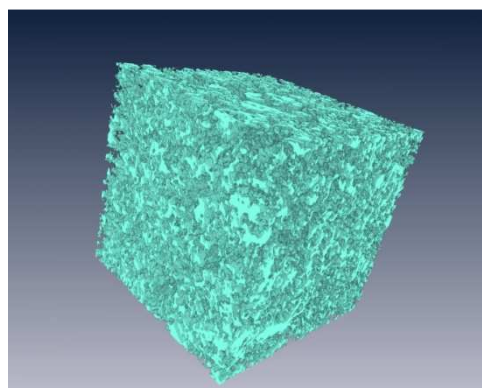
Figura 4.4.2 Ricostruzione 3D di una porzione cubica della fase solida della struttura porosa del campione di a) Agrigento, b) Cusa, c) Noto.



a)



b)



c)

Figura 4.4.3. Immagine rielaborata dei pori (visualizzazione cromatica azzurro-verde) nei campioni di: a) Agrigento, b) Cusa e c) Noto.

La caratterizzazione morfologica e dell'architettura della struttura porosa ha assunto particolare importanza in relazione all'utilità della individuazione delle relazioni intercorrenti

tra i parametri caratterizzanti tali tipologie di strutture porose. In Figura 4.4.4 è rappresentata la curva di distribuzione dimensionale dei pori per ogni classe dimensionale del diametro dei pori.

La distribuzione dimensionale dei pori viene calcolata applicando in serie, sui voxel (pixel) di fase porosa l'operatore morfologico di "apertura" con "elemento strutturante" approssimante una sfera di raggio crescente [97-98]. L'effetto è quello di una serie di sferette virtuali, di diametro crescente, che percorrono l'intera rete dei pori andando a riempire i vuoti di dimensione minima inferiore o uguale al diametro corrente. Ad ogni incremento del diametro viene misurata la differenza fra la porosità iniziale e la porosità residua risultante dal riempimento dei vuoti di larghezza (dimensione minima) inferiore o uguale al diametro corrente.

In Figura 4.4.4 è mostrata, per ogni campione di roccia, la curva di distribuzione dimensionale dei pori rappresentata dai valori di porosità percentuale per ogni classe dimensionale del diametro dei pori.

In particolare, la roccia di Noto mostra una porosità massima centrata su un diametro di 15 μm a differenza delle altre due tipologie di campioni che mostrano una distribuzione dei pori più ampia e piccata su valori maggiori.

In Figura 4.4.4b è mostrato un ingrandimento di tale andamento per la roccia di Noto che evidenzia un andamento bimodale con la presenza di un secondo picco, e l'assenza di pori di dimensione superiore ai 45 μm .

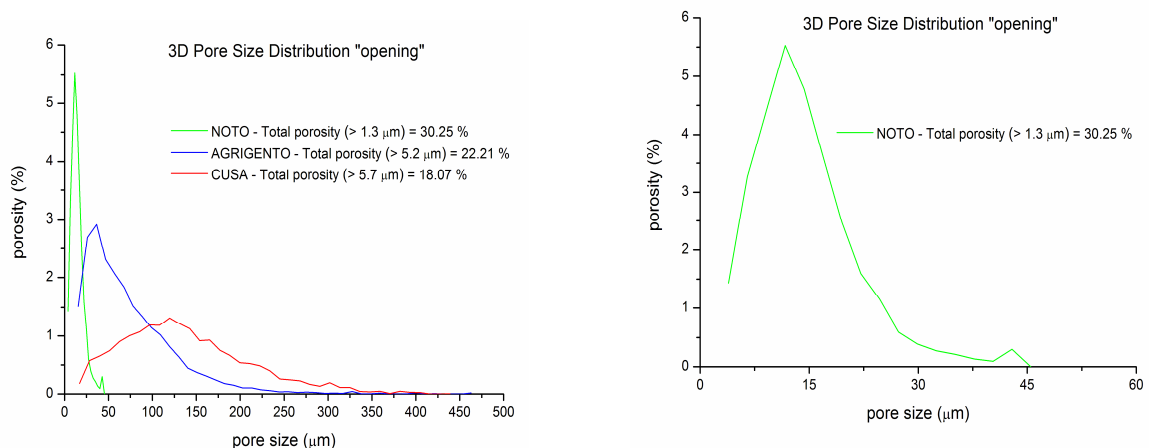


Figura 4.4.4 a) Distribuzione 3D della dimensione di pori connessi. b) Ingrandimento della distribuzione 3D relativa al campione di Noto.

La Figura 4.4.5 riporta i valori di porosità cumulata per i tre campioni. La porosità totale (rapporto tra il numero di voxel rappresentanti vuoti e il numero totale di voxel dell'immagine) del campione di Noto è risultata essere pari a 30.25%, quella del campione di Agrigento a 22.21% e quello di Cusa a 18.07%.

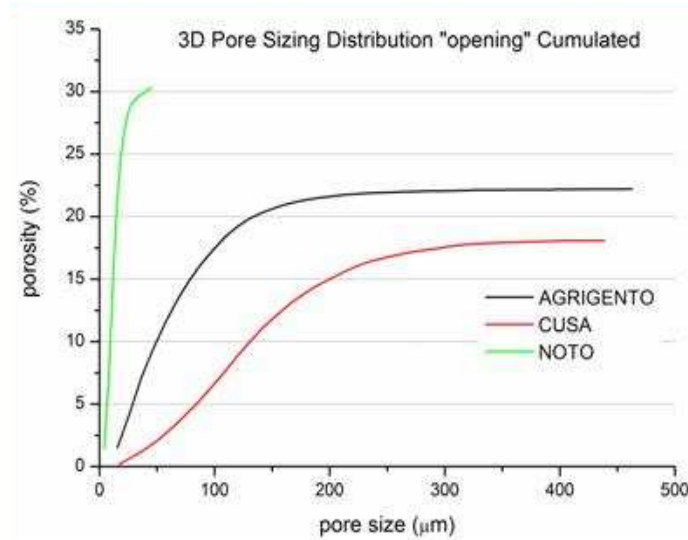


Figura 4.4.5: Porosità cumulata per i tre campioni

Valutazioni sulla connettività dei campioni possono essere fatte esaminando le curve di percolazione riportate in Figura 4.4.6. In pratica vengono misurate le percentuali della porosità totale che si trovano in comunicazione con una data coppia di facce opposte campione; ciò viene fatto prima sull'immagine iniziale e poi su immagini ottenute da quest'ultima con la chiusura successiva dei pori appartenenti a classi dimensionali crescenti [97].

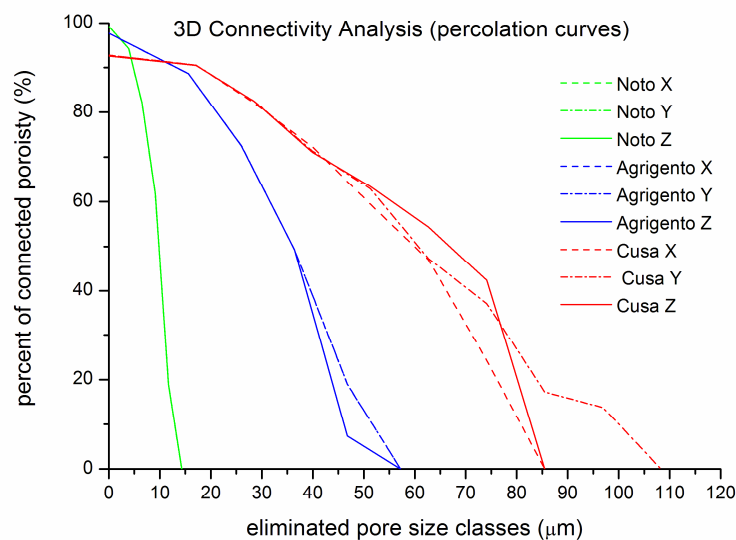


Figura 4.4.6 Curve di percolazione per i campioni di Noto, Agrigento, Cusa

Tali valori percentuali descrivono la cosiddetta curva di percolazione. In Figura 4.4.6 sono mostrate le curve di percolazione relative alle tre coppie di facce normali, rispettivamente, agli assi di riferimento Y, X, Z per ogni tipologia di campione analizzato. Sull'asse delle ascisse sono riportate le classi dimensionali in μm escluse dalla rete dei pori ed in ordinata la percentuale di porosità connessa.

A differenza degli altri campioni, il campione di Noto mostra, una sovrapposizione delle 3 curve di percolazione. Ciò significa che la quasi totalità della porosità totale del campione di Noto è in comunicazione con le facce normali ai tre assi di riferimento (X, Y, Z) mentre dopo la chiusura dei pori delle classi dimensionali superiore a 5 μm questo valore si riduce bruscamente fino ad annullarsi con la chiusura della classe di larghezza pari a circa 15 μm . Le curve di percolazione riferite agli altri due campioni rocciosi evidenziano comportamenti distinti per i tre assi di riferimento.

Per quanto riguarda il campione di Agrigento le tre curve di percolazione non sono distinte fino alla chiusura dei vuoti di ampiezza inferiore o uguale a 40 μm valore in cui quasi il 50% della porosità totale è connessa. Chiudendo i pori delle classi dimensionali successive la curva di percolazione relativa all'asse Z si distingue per un tratto di forte pendenza a cui corrisponde una forte riduzione della percentuale di porosità connessa a meno del 10%. Le curve di percolazione relative al campione di Agrigento mostrano una connettività distinguibile relativamente ai tre assi di riferimento per le classi dimensionali di pori inferiori o uguali a 45 μm .

La presenza di tratti a forte pendenza nelle curve di percolazione consente l'individuazione di classi dimensionali critiche che potrebbero essere usate, ad esempio, come parametri di correlazione della struttura ai fenomeni di dinamica di fluidi all'interno della stessa. Sono in corso studi riguardante tale problematica.

4.5 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Oggi, l'uso di tecniche di diagnostica medica, supportate da metodi di elaborazione dati sempre più efficienti, sembra diventare sempre più un approccio di indagine promettente per lo studio di strutture complesse di qualsiasi natura. In questo capitolo è stato presentato un esempio riguardante la potenzialità della tecnica di imaging TC a raggi X per lo studio e

l'analisi fenomenologica delle cinetiche di assorbimento capillare in rocce sedimentarie siciliane. Tale tecnica non invasiva, infatti, in grado di rilevare il contenuto di acqua in sistemi porosi, con una buona risoluzione spaziale e temporale, si è rivelata, in alcuni casi, appropriata per studiare l'assorbimento di acqua nelle rocce sedimentarie.

I dati forniti dalle analisi delle immagini TC possono essere valutati sia qualitativamente che quantitativamente e sono in buon accordo con i modelli teorici. Essi confermano che le cinetiche del fronte di bagnamento in un mezzo poroso sono descritte da equazioni stocastiche e, che in alcuni casi particolari, è possibile correlare l'altezza media del fronte in funzione del tempo con una legge semplice (modello di Handy [89]).

Tuttavia, in questo metodo, sono presenti limitazioni che non permettono l'utilizzo della strumentazione standard ai fini della caratterizzazione morfologica e del monitoraggio di fenomeni come quelli discussi in questo capitolo. Al fine di approfondire le conoscenze sulle strutture porose di interesse le informazioni TC sono state integrate con quelle provenienti dall'analisi effettuate tramite la tecnica di microtomografia grazie alla quale sono state acquisite informazioni sulla connettività delle strutture.

L'approccio metodologico integrato riguardante l'analisi di immagini TC e μ -TC si apre su vari fronti inerenti: lo studio dei fenomeni strettamente legati alle peculiarità porosimetriche, il monitoraggio delle performance di eventuali trattamenti idrofobici su i suddetti campioni e la possibilità di studiare anomalie strutturali derivanti da altri fattori anche in differenti materiali.

CONCLUSIONE

Questa tesi è stata concepita con l'intento di presentare ed applicare differenti tecniche di indagine a sistemi complessi di interesse in fisica applicata, analizzandone i risultati al fine estendere e conoscenze scientifiche già acquisite.

Lo studio di strutture complesse può avvalersi di tecniche analitiche e/o strumentali differenziabili in funzione della tipologia dei segnali da analizzare e delle informazioni da acquisire. E', infatti, possibile condurre indagini, sia analizzando i dati sperimentali tramite tecniche matematiche adeguate (analisi computazionale, simulazioni, *modelling*, analisi di Fourier, wavelet, ecc), sia utilizzando apparati strumentali dedicati (spettrometri, tomografi etc). Entrambi gli approcci sono in grado, seppur in modo diverso, di fornire informazioni utili, e talvolta anche complementari, sulle proprietà strutturali e comportamentali dei sistemi di interesse.

In particolare l'attività di ricerca svolta nel triennio del dottorato ha utilizzato sia tecniche matematiche, come l'analisi wavelet nel processing di segnali biologici non stazionari, sia l'approccio metodologico per l'analisi integrata di dati provenienti da strutture inerti ed acquisite mediante differenti tecniche spettroscopiche.

Il primo caso studio della tesi ha riguardato lo studio di un segnale biomedico, l'ERG, acquisito a seguito di una stimolazione della retina con un flash luminoso. Grazie allo studio di una porzione dell'ERG è stato, dunque, possibile formulare alcune ipotesi circa le dinamiche fotorecettoriali che stanno alla base della sua generazione in condizioni fisiologiche e successivamente in condizioni patologiche. Tutto ciò al fine di caratterizzare, sulla base delle peculiarità di un tracciato normale, quelle invece relative a tracciati appartenenti a soggetti affetti da particolari patologie fotorecettoriali.

L'approccio metodologico simulativo/modellistico applicato allo studio dei biosegnali consente di caratterizzarli e monitorarne eventuali alterazioni morfologiche. Tuttavia, spesso le informazioni contenute in tali segnali non sono sempre immediatamente accessibili. Poiché i

cambiamenti dinamici connessi con il comportamento delle strutture biologiche danno luogo a segnali non-stazionari, conoscere le complesse caratteristiche tempo-frequenza è rilevante per l'analisi delle variazioni locali, spesso presenti nei biosegnali, siano esse fisiologiche che patologiche. Appare, quindi, opportuno, sia conoscere il loro contenuto in frequenza, sia rivelarne la distribuzione temporale per far sì che tali informazioni possano essere utili in un contesto clinico-diagnostico. Diventa, pertanto, necessario implementare opportuni metodi di *signal processing*, sia per rivelare gli aspetti rilevanti caratterizzanti il segnale, sia per comprendere i processi fisiologici di base e monitorare gli eventi di natura diagnostica.

In questo contesto, insieme ai consolidati metodi analitici (come FFT, SFT, ecc), l'analisi wavelet (WA) sta guadagnando importanza. Essa, infatti, consente di rappresentare il segnale in un dominio tempo-frequenza caratterizzato da una maggiore flessibilità soprattutto nell'analisi delle risposte non lineari e non-stazionarie. Numerosi studi hanno applicato questo metodo a segnali biomedici di varia natura; in tutti questi casi, l'uso della WA ha fornito rilevanti informazioni sulle caratteristiche tempo-frequenza del segnale e su eventuali malattie incipienti.

Le analisi condotte per il caso studio 3 confermano la versatilità e la capacità analitica di tecniche fisiche non invasive o micro-distruttive quali l'XRF e la LIBS a fornire informazioni decisive per indagini complesse come quelle di campioni archeologici. L'implementazione di metodologie per la lettura integrata di dati derivanti da tecniche spettroscopiche differenti ha reso possibile l'analisi di strutture di natura inorganica (leghe bronzee) attraverso la caratterizzazione delle tipiche patine di corrosione e la valutazione delle risposte degli elementi costituenti la lega alla crescita degli strati di corrosione. Le indagini hanno, inoltre, consentito di valutare il ruolo degli elementi di lega che rappresentano uno dei fattori che maggiormente influenzano la crescita degli strati di corrosione. In tal modo si è potuto determinare la composizione chimica degli strati di corrosione e la sua variazione lungo lo spessore analizzato. Infatti, attraverso la realizzazione, tramite la tecnica LIBS, di profili di profondità degli elementi costituenti le patine di corrosione e degli ioni metallici in lega, è stata verificata la presenza di fenomeni di migrazione dal bulk verso la superficie di tali ioni.

Questo approccio analitico è ancora in fase di perfezionamento soprattutto per rendere le indagini LIBS quantitative più accurate. A tal fine ulteriori indagini sono in corso per valutare la massa di ablazione laser per ogni colpo rispetto alle differenti proprietà chimiche e fisiche dei materiali indagati.

L'indagine non invasiva delle strutture interne di oggetti di interesse mediante tecniche di *imaging* in tomografia a raggi X permette di ottenere risultati difficilmente ottenibili mediante altre tecniche di analisi. Lo studio quantitativo degli spazi porosi in materiali lapidei può essere affrontato attraverso opportune tecniche di analisi di immagini acquisite a diverse scale di risoluzione che consentono, il calcolo dalla distribuzione dimensionale dei pori e la valutazione delle loro caratteristiche di connettività.

I tomografi di tipo medico diagnostico grazie alla elevata capacità di acquisizione delle immagini permettono di potere effettuare anche studi di tipo dinamico (risalita capillare). Inoltre, la possibilità di integrare le informazioni deducibili da immagini TC con quelle acquisite utilizzando metodi di misura diretta (gravimetrici) ha permesso di individuare e differenziare le dinamiche di risalita capillare all'interno di sistemi porosi (rocce sedimentarie) fortemente dipendenti dalla caratterizzazione della loro struttura. L'uso della tecnica microtomografica, permettendo non solo la tridimensionalità dell'informazione ma anche la visualizzazione della microstruttura interna dell'oggetto analizzato, consente di effettuare opportune misurazioni e di fornire informazioni di tipo morfologico-strutturale inerenti la distribuzione dei pori e la loro connettività. I risultati ottenuti confermano le notevoli potenzialità di applicazione delle tecniche tomografiche a raggi X e della μ -CT per lo studio delle strutture porose.

Questi approcci metodologici hanno fornito informazioni cruciali per la caratterizzazione di tre sistemi complessi completamente differenti aprendo nuove panoramiche di indagine sia per quanto riguarda il perfezionamento delle metodologie note sia per l'acquisizione di dati non ottenibili per altra via. In questa direzione, ulteriori sviluppi sono in corso allo scopo di acquisire ulteriori informazioni per una più accurata comprensione dei processi coinvolti.

I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale.

Marie Curie

RINGRAZIAMENTI

E adesso, come in ogni tesi che si rispetti, siamo giunti al momento dei ringraziamenti, mai come in questo caso opportuni e voluti!

Ringrazio il mio tutor, la Prof.ssa Maria Brai, per la disponibilità dimostrata nei miei confronti e per aver supportato ed incoraggiato ogni mia iniziativa scientifica.

Ringrazio il Prof. Leonardo Bellomonte che ha seguito con cura il mio percorso formativo e scientifico dalla laurea fino ad oggi.

Ringrazio la Prof.ssa Dominique Persano Adorno per aver saputo coniugare con eleganza il suo ruolo di docente *co-tutor* con quello di “amica”.

Per tutto questo e per avermi guidato nello svolgimento di questa tesi non posso far altro che rivolgere un enorme ringraziamento a tutti loro.

Desidero, altresì, ringraziare la Dott.ssa Maria Francesca Alberghina e il Dr. Tiziano Schillaci, con i quali ho condiviso l'esperienza di laboratorio, per i loro preziosi suggerimenti.

E come trascurare i miei colleghi di dottorato Giuseppe Cannella, Angelo La Cognata e Pasquale Caldara con i quali, oltre lo studio e gli animati dibattiti scientifici, ho condiviso le emozioni di questi tre anni!

Ed infine, ma non certo per importanza, desidero ringraziare mio marito e mio figlio, che, nonostante le loro rinunce, mi hanno fatto sempre sentire libera di scegliere ciò che ho ritenuto importante per me. Senza la loro pazienza, il loro continuo appoggio ed il loro amore raggiungere questa meta non sarebbe stato possibile!

Dietro l'orizzonte sorgono sempre nuovi orizzonti.

Michael Ende, La prigioniera della Libertà

APPENDICE 1

Unità di misura fotometriche

Intensità luminosa: si misura in **candele**.

Nuova candela (*cd*) è uguale ad $1/60$ dell'intensità della luce che emerge perpendicolarmente da un foro di 1 cm^2 praticato nella parete di un forno nel quale vi sia la temperatura di 2043^0K , pari cioè alla temperatura di fusione del platino (SI).

Flusso luminoso: si misura in **lumen**.

Lumen (*lm*) è il flusso che si ha in una sezione qualunque di un fascio ampio 1 steradiane ed emesso da una sorgente dell'intensità di 1 candela.

Steradiane (*sr*) è un'unità di misura di un angolo solido pari all'angolo solido sotto il quale una calotta sferica di area 1 m^2 , appartenente ad una sfera di 1 m di raggio, viene vista dal centro.

Illuminescenza o intensità di illuminazione: si misura in **lux**.

Lux (*lx*) è l'illuminazione prodotta su di una superficie da una sorgente posta perpendicolarmente ad 1 m di distanza e della intensità di 1 candela.

Luminanza (flusso riflesso dall'unità di superficie illuminata da una sorgente standard): si misura in **lambert**.

Lambert (*l*) è il flusso luminoso che proviene da una superficie che diffonda perfettamente quando colpita da una sorgente luminosa di 1 candela posta perpendicolarmente ad 1 cm di distanza.

Illuminazione retinica: si misura in **troland**.

Troland (*td*) è l'intensità della stimolazione che utilizza un'area pupillare di 1 mm^2 ed uno stimolo esterno della luminanza di 1cd/m^2 .

BIBLIOGRAFIA

- [1] Gabor D., *Theory of communication* J. IEE (London), vol. 93, 1946, 429-57.
- [2] Haar A., *Zur Theorie der orthogonalen Funktionensysteme*, Mathematische Annalen, 69, 1910, 331-71.
- [3] Grossmann A. and Morlet J. *Decomposition of Hardy functions into square integrable wavelets of constant shape*. SIAM J. Math. Anal., 15: 1984 723-36.
- [4] Meyer Y. *Orthonormal wavelets* in J.M. Combers, A. Grossmann, P. Tachamitchian, eds., *Wavelets, Time-frequency Methods and Phase Space*, Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1989, 21-37.
- [5] Mallat S.G. *A theory of multiresolution signal decomposition: The wavelet representation* IEEE Trans. on Pattern Anal. Mach. Intel., vol. 11, 1989. 674-93.
- [6] Daubechies I. *Ten Lectures on Wavelets*, CBMS-NSF Lecture Notes nr. 61, SIAM, 1992.
- [7] Daubechies I. The wavelet transform, time-frequency localization and signal analysis, IEEE Trans. Inf. Theory, 36 1990 961-1005.
- [8] Durka P.J. *From wavelets to adaptive approximation: time-frequency parametrization of EEG*. Biomed Eng online 2, 1, 2003.
- [9] Forte JD, Bui BV, Vingrys AJ, *Wavelet analysis reveals dynamics of rat oscillatory potential*, Journal of Neuroscience Methods 169 2008, 191-200.
- [10] Astaf'eva NM. *Wavelet analysis: basic theory and some applications*, Physics-Uspekhi Fizicheskikh Nauk 39 1996 1085-1108.
- [11] Jędrzejczak W.W., Blinowska K.J., Konopka W., *Time-frequency analysis of transiently evoked otoacoustic emissions of subjects exposed to noise*. Hearing Research 2005, 205:249-255.
- [12] Kilby, H. Gholam Hosseini, *Extracting Effective Features of SEMG Using Continuous Wavelet Transform*, Proceedings of the 28th IEEE EMBS Annual International Conference New York City, USA, Aug 30-Sept 3, 2006.
- [13] X. Hu, Q. Yu, W. Liu, J. Qin, *Feature Extraction of Surface EMG Signal Based on Wavelet Coefficient Entropy*, IEEE Xplore, 978-1-4244-1748-3/08.
- [14] C. Saritha, V. Sukanya, Y. Narasimha Murthy, *ECG Signal Analysis Using Wavelet Transforms*, Bulg. J. Phys. **35** (2008) 68–77.
- [15] S. Pal and M. Mitra, *Detection of ECG characteristic points using Multiresolution Wavelet Analysis based Selective Coefficient Method*, Measurement 43 (2010) 255–261.
- [16] Hounsfield, G.N., *Computed Medical Imaging, Medical Physics*, 7 (4), 283-290 (1980).

- [17] Malmivuo J, Plonsey R *Bioelectromagnetism* Oxford University Press 1995.
- [18] R. Granit, *The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve*, Journal of Physiology (London) **77** (1933) 207-239.
- [19] Tomita T. *Studies on the intraretinal action potential I. Relation between the localization of micropipette in the retina and the shape of the intraretinal action potential*. Japanese Journal of physiology Vol. 1, 1950, 110-117.
- [20] Hofer H, Carroll J, Neitz J and Williams D R, *Organization of the Human Trichromatic Cone Mosaic*, J. Neurosci. 25 2005 9669-79.
- [21] Hood D.C. and Birch D.G. *Light adaptation of human rod receptors: the leading edge of the human a-wave and models of rod receptor activity* Vision Res. 33, 1993, 1605-18.
- [22] Hood D.C. and Birch D.G. *A quantitative measure of the electrical activity of human rod photoreceptors using electroretinography* Visual Neuroscience, 5, 1990, 379-387.
- [23] Baylor D.A., Nunn B.J., Schnaph J. L., *The photocurrent, noise and spectral sensitivity of rods of the monkey Macaca fascicularis*. Journal of Physiology 1984: 575-607.
- [24] Penn RD and Hagings WA *Kinetics of the photocurrent of the retinal rods*. Biophys. J. 12, 1972, 1073.
- [25] Hood D.C. and Birch D.G. *The a-wave of the human electroretinogram and rod receptor function*, Investigative Ophthalmology and Visual Science 31, 1990, 2070-208.
- [26] Lamb T D and Pugh E N Jr, *A quantitative account of the activation steps involved in phototransduction in amphibian photoreceptors* J.Physiol 449,1992. 719-758.
- [27] Hood D.C. and Birch D.G. *Computational models of rod driven retinal activity* IEEE engineering in Medicine and Biology 1995 59-66.
- [28] Barraco R., Bellomonte L., Brai M., Anastasi M., *Analysis of the human a-wave ERG-component*, Physiol. Meas. 27, 2006, 881-899.
- [29] Pugh E N Jr and Lamb T D, *Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction*, Biochim. Biophys. Acta 1141, 1993, 111-149.
- [30] Mohand-Said S., Hicks D., L  veillard T., Picaud S., Porto F., Sahel J., *Rod-Cone Interactions: Developmental and Clinical Significance*, Progress in retinal Eye Research 4, 2001 451-67.
- [31] Sun H., Pokorny J., Smith V. C., *Rod-cone interactions assessed in inferred magnocellular and parvocellular postreceptoral pathways*, Journal of Vision 1 2001 42-54.
- [32] Colón Vélez M A, Hernández D J, Rodríguez Bernier U, Van Laarhoven J and Camacho E, *Matematical models for photoreceptor interactions* Technical Report BU-1640-M 2003, 1-45.

- [33] Cideciyan A.V., Jacobson S.G. *An alternative phototransduction model for human rod and cone ERG a-waves: normal parameters and variation with age*, Vision Res 36 1996 2609-21.
- [34] Hood D.C. and Birch D.G. *Light adaptation of human rod receptors: the leading edge of the human a-wave and models of rod receptor activity* Vision Res. 33, 1993, 1605-18.
- [35] Tzekov R T, Locke K G, Hood D C and Birch D G, *Cone and rod ERG phototransduction parameters in retinitis pigmentosa*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 44, 2003, 3993-4000.
- [36] Barraco R., Persano Adorno D., Bellomonte L. and Brai M., *A study of the human rod and cone ERG a-wave component*, Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment 2009, P03007-11.
- [37] Barraco R., Bellomonte L., Brai M. and Persano Adorno D, *Functional analysis of Normal and CSNB a-wave ERG component*, IFMBE Proceedings of the 4th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Biomedical Engineering, *EMBEc 2008*, pag. 2668-71, ISBN 978-3-540-89207-6.
- [38] Hood D.C. and Birch D.G. *A quantitative measure of the electrical activity of human rod photoreceptors using electroretinography* Visual Neuroscience, 5, 1990, 379-387.
- [39] Hamilton R and Bees M A, Chaplin C.A., McCulloch D.L., *The luminance-response function of the human photopic electroretinogram: A mathematical model* Vis. Res. 47. 2007, 2968-72.
- [40] Symon K.R., *Fluctuations in energy loss by high energy charged particles in passing through matter*, Thesis, Department of Physics, Harvard University, Cambridge, MA, 1948.
- [41] Vavilov P.V., Sov. Phys.-JETP 5. 1957, 749.
- [42] Barraco R, Persano Adorno D, Brai M, *ERG signal Analysis using wavelet transform* under review in Theory Biosci. 2010.
- [43] Barraco R., Persano Adorno D., Bellomonte L, Brai M.: *Time-frequency analysis of the human photoreceptor response*, in Proceedings of the European Conference on Complex Systems (ECCS 09), Warwick (UK) pag. 126-2 - ISBN 0-9554123-1-5/8.
- [44] S. Varadharajan, K. Fitzgerald, V. Lakshminarayanan, *A novel method for separating the components of the clinical electroretinogram*, J Mod Opt 54 (2007) 1263-1280.
- [45] J. G. Robson, S. M. Saszik, J. Ahmed, L. Frishman, *Rod and cone contributions to the a-wave of the electroretinogram of the macaque*, Journal of Physiology 547.2 (2003) 509-530.
- [46] P. Bisegna, G. Caruso, D. Andreucci, L. Shen, V. Gurevich, H. E. Hamm, and E. Di Benedetto, *Diffusion of the Second Messengers in the Cytoplasm Acts as a Variability Suppressor of the Single Photon Response in Vertebrate Phototransduction*, Biophys. J. 94 (2008) 3363–3383.

- [47] F. Rieke and D.A. Baylor, *Origin of reproducibility in the responses of retinal rods to single photons*, Biophys. J. 75, 1998, 1836-57.
- [48] Barraco R, Persano Adorno D, Brai M, *An approach based on wavelet analysis for feature extraction in the a-wave of the electroretinogram* under review in Computer Methods and Programs in Biomedicine 2010.
- [49] Barraco R, Persano Adorno D, Brai M, *Wavelet analysis of human photoreceptor response*, IEEE Proceedings 3rd International Symposium on Applied Science in Biomedical and Communication Technologies, 2010, 978-1-4244-8132-3/10.
- [50] G.M. Ingo, T. De Caro, C. Riccucci, E. Angelini, S. Grassini, S. Balbi, P. Bernardini, D. Salvi, L. Bousselmi, A. Cilingiroglu, M. Gener, V.K. Gouda, O. Al Jarrah, S. Khosroff, Z. Mahdjoub, Z. Al Saad, W. El-Saddik, P. Vassiliou, *Large scale investigation of chemical composition, structure and corrosion mechanism of bronze archeological artefacts from Mediterranean basin*, Appl. Phys. A 83, (2006) 513–520.
- [51] L. Robbiola, J.M. Blengino, C. Fiaud, *Morphology and mechanisms of formation of natural patinas on archaeological Cu-Sn alloys*, Corrosion Science, Vol. 40, No. 12 (1998) 2083-2111.
- [52] E. Figueiredo, P. Valerio, M.F. Araujo, J.C. Senna-Martinez, *Micro-EDXRF surface analyses of a bronze spear head: Lead content in metal and corrosion layers*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A 580 (2007) 725–727.
- [53] I. De Ryck, E. Van Biezen, K. Leyssens, A. Adriaens, P. Storme, F. Adams, *Study of tin corrosion: the influence of alloying elements*, Journal of Cultural Heritage 5 (2004) 189–195.
- [54] G.M. Ingo, T. De Caro, C. Riccucci, S. Khosroff, *Uncommon corrosion phenomena of archaeological bronze alloys*, Appl. Phys. A 83 (2006) 581–588.
- [55] I. Constantinides, M. Gritsch, A. Adriaens, H. Hutter, F. Adams, *Microstructural characterisation of five simulated archaeological copper alloys using light microscopy, scanning electron microscopy, energy dispersive X-ray microanalysis and secondary ion mass spectrometry*, Analytica Chimica Acta 440 (2001) 189–198.
- [56] H. Hassairi, L. Bousselmi, E. Triki, and G. M. Ingo, *Assessment of the interphase behaviour of two bronze alloys in archaeological soil*, Materials and Corrosion 58, No. 2 (2007) 121-128.
- [57] J.A. Perez-Serradilla, A. Jurado-Lopez, M.D. Luque de Castro, *Complementarity of XRFs and LIBS for corrosion studies*, Talanta 71 (2007) 97–102.
- [58] M. Ferretti, G. Cristoforetti, S. Legnaioli, V. Palleschi, A. Salvetti, E. Tognoni, E. Console, P. Palaia, *In situ study of the Porticello Bronzes by portable X-ray fluorescence and laser-induced breakdown spectroscopy*, Spectrochimica Acta Part B 62 (2007) 1512–1518.

- [59] L. Cartechini, R. Rinaldi, W. Kockelmann, S. Bonamore, D. Manconi, I. Borgia, P. Rocchi, B. Brunetti, A. Sgamellotti, *Non-destructive characterization of compositional and textural properties of Etruscan bronzes: a multi-method approach*, Appl. Phys. A 83 (2006) 631–636.
- [60] F.J. Fortes, M. Cortés, M.D. Simón, L.M. Cabalín, J.J. Laserna, *Chronocultural sorting of archaeological bronze objects using laser-induced breakdown spectrometry*, Analytica Chimica Acta 554 (2005) 136–143.
- [61] A. Elhassan, A. Giakoumaki, D. Anglos, G.M. Ingo, L. Robbiola, M.A. Harith, *Nanosecond and femtosecond Laser Induced Breakdown Spectroscopic analysis of bronze alloys*, Spectrochimica Acta Part B 63 (2008) 504–511.
- [62] F.J. Fortes, L.M. Cabalín, J.J. Laserna, *The potential of laser-induced breakdown spectrometry for real time monitoring the laser cleaning of archaeometallurgical objects*, Spectrochimica Acta Part B 63 (2008) 1191–1197.
- [63] A. De Giacomo, M. Dell’Aglia, F. Colao, R. Fantoni, V. Lazic, *Double-pulse LIBS in bulk water and on submerged bronze samples*, Applied Surface Science 247 (2005) 157–162.
- [64] L. Fornarini, F. Colao, R. Fantoni, V. Lazic, V. Spizzichino, *Calibration analysis of bronze samples by nanosecond laser induced breakdown spectroscopy: A theoretical and experimental approach*, Spectrochimica Acta Part B 60 (2005) 1186–1201.
- [65] A. Giakoumaki, K. Melessanaki, D. Anglos, *Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) in archaeological science—applications and prospects*, Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 749–760.
- [66] M.F. Alberghina, R. Barraco, M. Brai, T. Schillaci, L. Tranchina, *Double laser LIBS and micro-XRF spectroscopy applied to characterize materials coming from the Greek-Roman theater of Taormina*, Proceedings of SPIE Europe optics metrology, Optics for Arts, Architecture and Archaeology II, Vol. 7391, 739107, Munich, Germany.
- [67] M. Brai, T. Schillaci, L. Tranchina, *Double laser LIBS applied to natural and artificial materials from cultural heritage. A comparison with micro-XRF analysis*, Spectrochimica Acta Part B 64 (2009) 1119–1127.
- [68] Alberghina M. F., Barraco R., Brai M., Schillaci T., Tranchina L., *Complementary of the XRF and LIBS analyses in the conservation science: the case studies of the bronze alloys*, Quaderno degli Abstract II YOUTH in CONSERVATION OF CULTURAL HERITAGE - YOCOCU, Palermo (Italy), 24th – 26th May 2010, p.37.
- [69] Alberghina, M.F.; Barraco, R.; Brai, M.; Schillaci, T.; Tranchina L., *Metodologie spettroscopiche integrate per la caratterizzazione dei prodotti di corrosione nei bronzi archeologici*, Quaderno degli

- Abstracts del VI Congresso Nazionale di Archeometria. Scienza e Beni Culturali – A.I.Ar. (Associazione Italiana di Archeometria) - 15-18 Febbraio 2010, Pavia, p.77.
- [70] M. F. Alberghina, R. Barraco, M. Brai, T. Schillaci, L. Tranchina, *Integrated analytical methodologies for the study of corrosion processes in archaeological bronzes*, in press su Spectrochimica Acta Part B (2011).
- [71] I. Constantinides, A. Adriaens, F. Adams, *Surface characterization of artificial corrosion layers on copper alloy reference materials*, Applied Surface Science 189 (2002) 90-101.
- [72] C. Chiavari, A. Colledan, A. Frignani, G. Brunoro, *Corrosion evaluation of traditional and new bronzes for artistic castings*, Materials Chemistry and Physics 95 (2006) 252–259.
- [73] E. Tognoni, G. Cristoforetti, S. Legnaioli, V. Palleschi, *Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: State of the art*, Spectrochimica Acta Part B 65 (2010) 1-14.
- [74] Brai, M., Bellia S., Cimino, A., Fantazzini, P., Lo Casto, A., Maccotta, A., S., Brai, M., Raso, G., Schillaci, T., *Integrated techniques to study sedimentary rocks from Sicily used in cultural heritage*, Proceedings of the 8th International Conference on Non-Destructive Investigations and Microanalysis for the Diagnostic and Conservation of the Cultural and Environment Heritage, Lecce, Italy (2005)
- [75] Milind V. Karkare and Tomlinson F., *Water Movement in Unsaturated Porous Media due to Pore Size and Surface Tension Induced Capillary Pressure Gradients*, Langmuir, 9, 2398-2403 (1993).
- [76] Aker, E., and Maloy, K.J., *A two-dimensional network simulator for two-phase flow in porous media*, Transport in Porous Media, 32, 163–186 (1998).
- [77] Amaral, L.A.N., Barabási, A.L., Makse, H.A., and Stanley, H.E., *Scaling properties of driven interfaces in disordered media*, Phys. Rev. Lett. E, 52, 4087-4104 (1995).
- [78] Buldyrev, S.V., Havlin, S., and Eugene, H., *Anisotropic percolation and d-dimensional surface roughening problem*, Physica A: Statistical and Theoretical Physics, 20 (1-4), 200-211 (1993).
- [79] Barabási A.L., Stanley H.E., [Fractal Concepts in Surface Growth], Cambridge University Press (1995).
- [80] Edwards, S.F., and Wilkinson, D.R., *The Surface Statistics of a Granular Aggregate*, Proc. R. Soc. London, Ser. A, Mathematical and Physical Sciences, 381, 17-31 (1982)
- [81] Kardar, M., Parisi, G. and Zhang, Y.C., *Dynamic scaling of growing interfaces*, Phys. Rev. Lett., 56, 889-892 (1986).
- [82] Leschhorn, H., *Interface depinning in a disordered medium - numerical results*, Physica A, 195, (1-4), 324-335 (1993).

- [83] Luís A., Amaral N., Barabási A.L., Stanley H.E., *Universality classes for interface growth with quenched disorder* Ph. Rev. Letters, 73 (1), 62-65 (1994).
- [84] Luís A., Amaral N., Barabási A.L., Buldyrev S. V., Harington S. T., Havlin S., *Avalanches and the directed percolation depinning model: experiments, simulations, and theory*, Phys. Rev. E, 51 (5), 4665-4683 (1995).
- [85] Parisi, G., *On surface growth in random media*, Europhysics Letters, 17, 673-678 (1992).
- [86] Wilkinson D., and Willemsen, J.F., *Invasion percolation: a new form of percolation theory*, J. Phys. A Math. Gen., 16, 3365-3376 (1983)
- [87] Graham J. W., Richardson J. G., Petroleum Transaction, AIME, 216, 377-380 (1959).
- [88] Green, W. H. and Ampt, G. A., *Studies on soil physics - Part I. The flow of air and water through soils*, The Journal of Agricultural Science, 4, 1-24 (1911).
- [89] Handy L.L., *Theory and application of imbibition phenomena in recovery of oil* Petroleum Transaction, AIME, 219, 75-80 (1960).
- [90] Washburn, E.W.: *The Dynamics of Capillary Flow*, Phys. Rev. **17**, 273–283 (1921).
- [91] Hughes, R.G, Brigham, W.E. and Castanier, L.M., *CT imaging of two phase flow in fractured porous media*, Proceedings of the 21st Workshop on Geothermal Reservoir Engineering, Stanford University, Stanford, CA, USA, 22-24 (1996).
- [92] Oren, P.E, and Baker S., *Reconstruction of Berea sandstone and pore scale modelling of wettability effects*, J. of petroleum Science and Eng., 39, 177-199 (2003).
- [93] Pacelli L., Zitha J., Nguyen Q.P., Currie P.K. and M.A. Buijse *Coupling of Foam Drainage and Viscous Fingering in Porous Media Revealed by X-ray Computed Tomography*, Transport in Porous Media, 64, 301–313 (2006).
- [94] M.F. Alberghina, R. Barraco, M. Brai, A. Lo Casto, A. Mazzocchio, T. Schillaci, *X-ray CT imaging as a scientific tool to study the capillary water absorption in sedimentary rocks used in cultural heritages*, Proceedings of SPIE Europe optics metrology, Optics for Arts, Architecture and Archaeology II, Vol. 7391, 73910Y, 17-19 June 2009, Munich, Germany, ISBN 978-0-8194-7674-6 (2009).
- [95] UNI 10859:2000 Standard, *Cultural heritage - Natural and artificial stones - Determination of water absorption by capillarity*, 1-6 (2000) www.uni.com com.
- [96] Alberghina M.F., Barraco R., Brai M., Lo Casto A., Mazzocchio A., Mele G., Schillaci T. *Tecniche tomografiche a raggi X per lo studio dei beni culturali* Quaderno degli abstracts del XCVI Congresso Nazionale della Società Italiana di Fisica (SIF), 20 -24 settembre 2010, Bologna

- [97] Mele G. *Proposta di una tecnica tomografica per l'analisi della struttura del suolo* Riv. di Ing. Agr.(2001), 2, 93-100.
- [98] Serra J *Image analysis and matematical morphology*, Academic Press. London (1982).