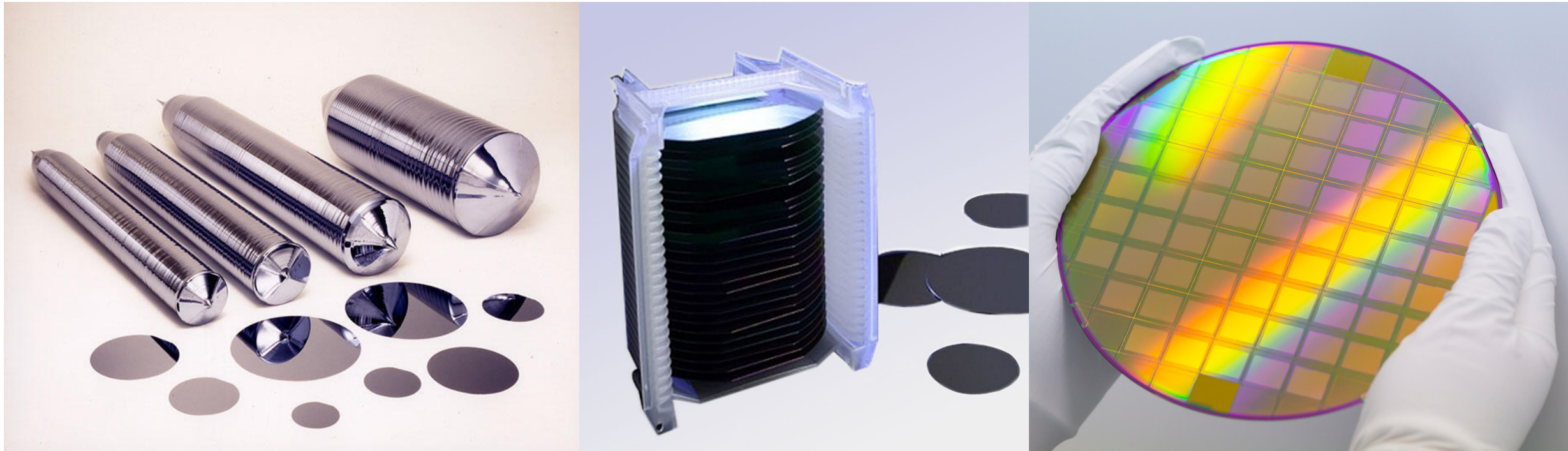


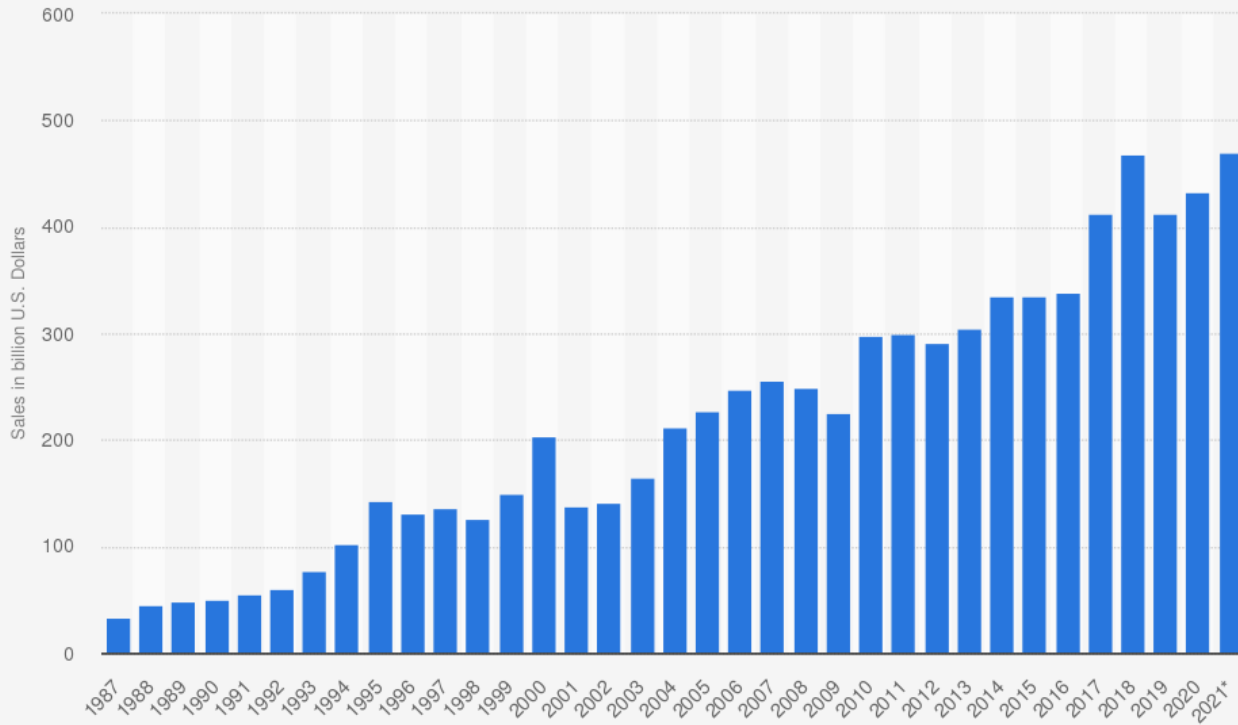
# Biosensori basati su FET – I bioFET

Il rapido avanzamento della tecnologia CMOS ha permesso, a partire dagli anni 70, di sfruttare le possibilità offerte dalle tecniche di micro-fabbricazione in ambito (bio)sensoristico. In particolare: **miniaturizzazione, alta densità di dispositivi, abbattimento dei costi** di produzione.



# Biosensori basati su FET – I bioFET

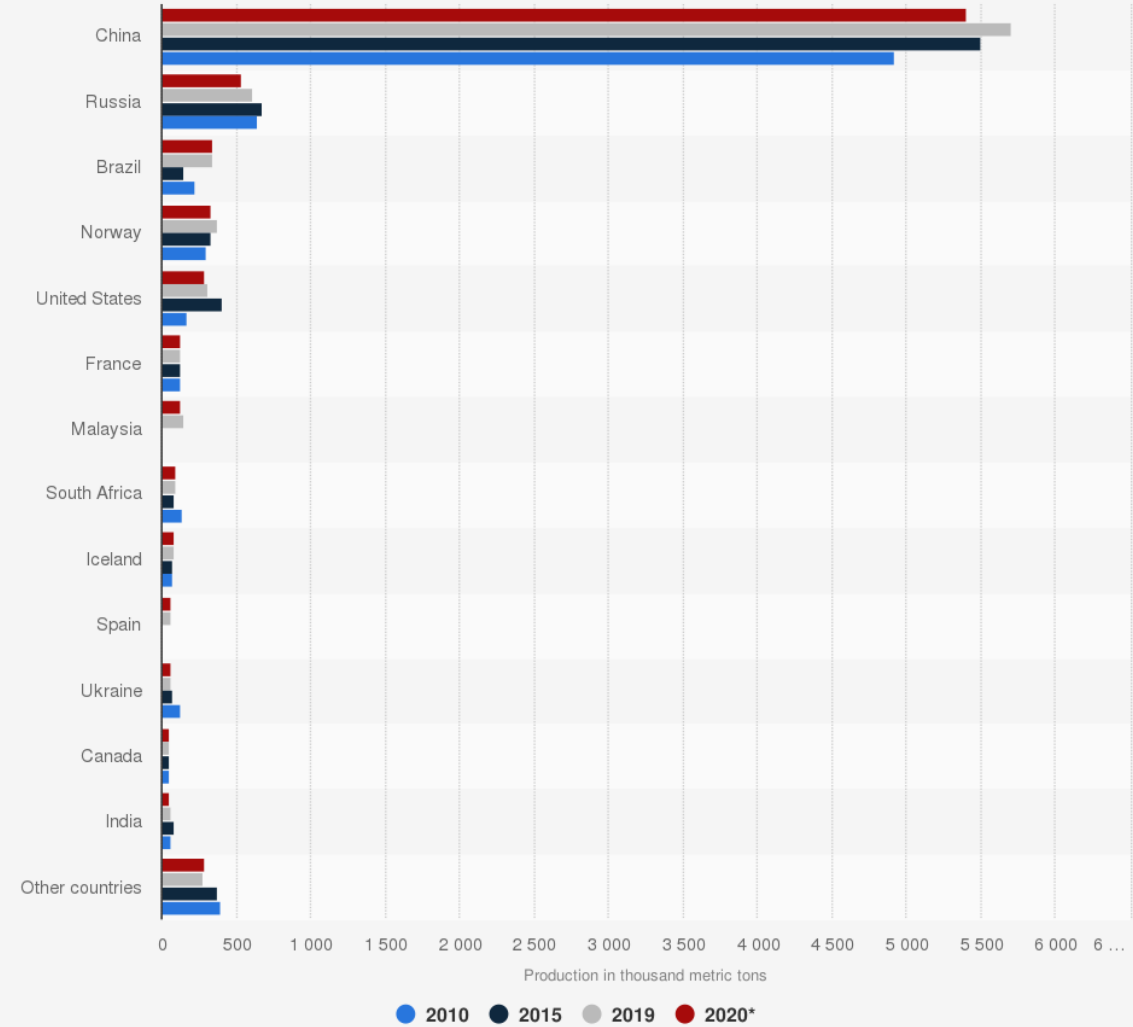
Semiconductor market size worldwide from 1987 to 2021 (in billion U.S. dollars)



Sources  
WSTS; SIA  
© Statista 2021

Additional Information:  
Worldwide; 1987 to 2020

Major countries in silicon production from 2010 to 2020 (in 1,000 metric tons)



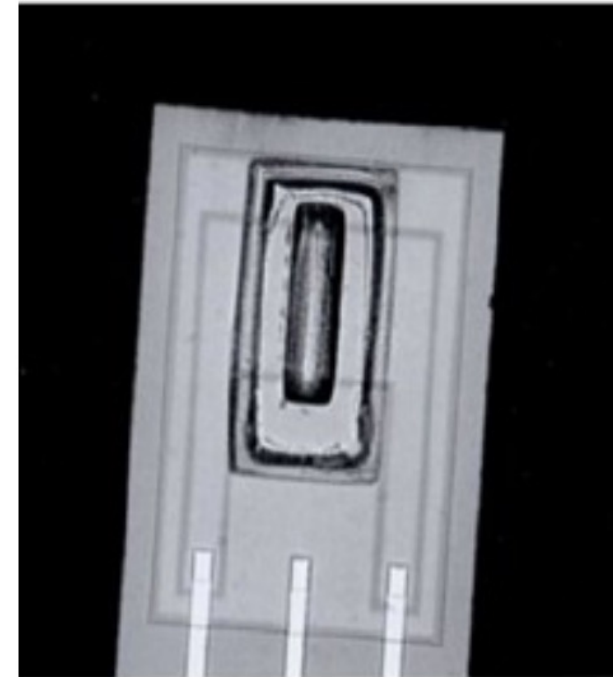
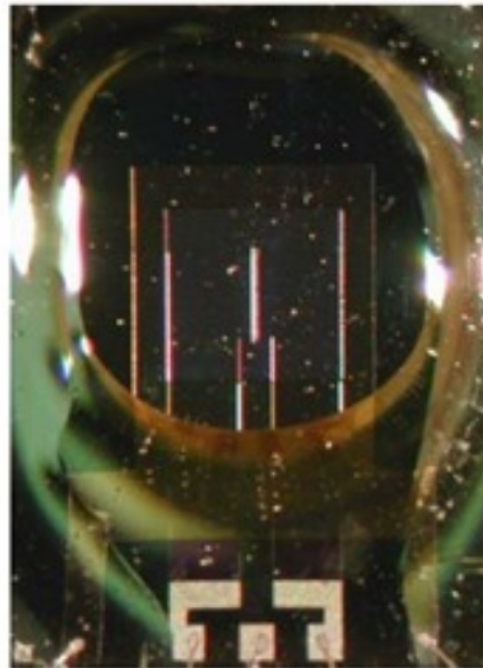
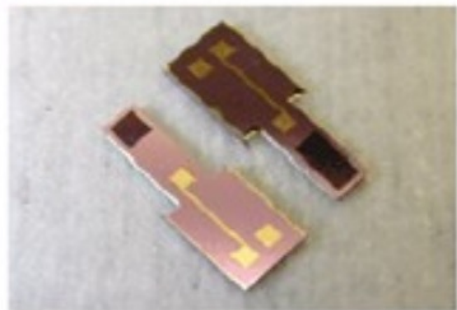
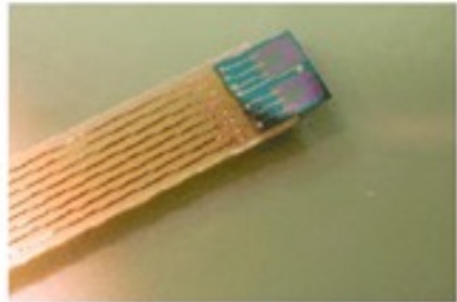
Source  
US Geological Survey  
© Statista 2021

Additional Information:  
Worldwide; 2010 to 2020

# Biosensori basati su FET – I bioFET

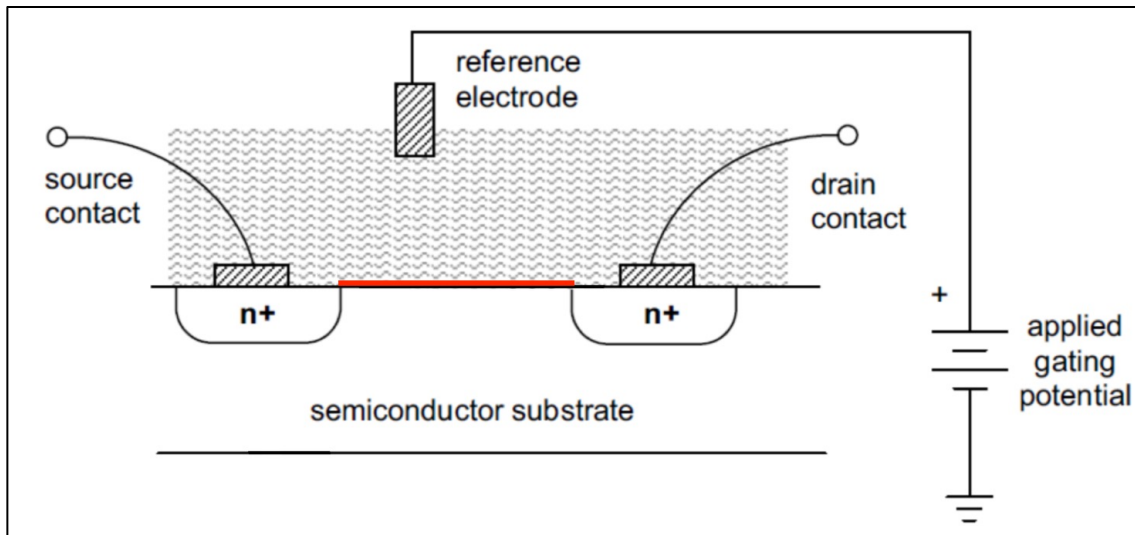
Questo approccio presenta anche dei problemi legati alla realizzazione degli elettrodi di riferimento, i quali sono realizzati con materiali non standard (in applicazioni CMOS l'Ag/AgCl è considerato non standard) e possono essere difficilmente miniaturizzati.

Utilizzo di **pseudo elettrodi di riferimento**: metalli nobili (Au, Pt) o **elettrodi di Ag ricoperti di Ag/Cl**.



# BioFET

Il principio di funzionamento dei BioFET è assimilabile a quello di un **ISFET**.



$$I_{DS} = \mu C_{ox} \frac{W}{L} \left[ (V_{GS} - V_{TH}) V_{DS} - \frac{V_{DS}^2}{2} \right]$$

$$V_{FB_{MOSFET}} = \phi_M - \phi_{Si} - \frac{Q_{ox}}{C_{ox}}$$

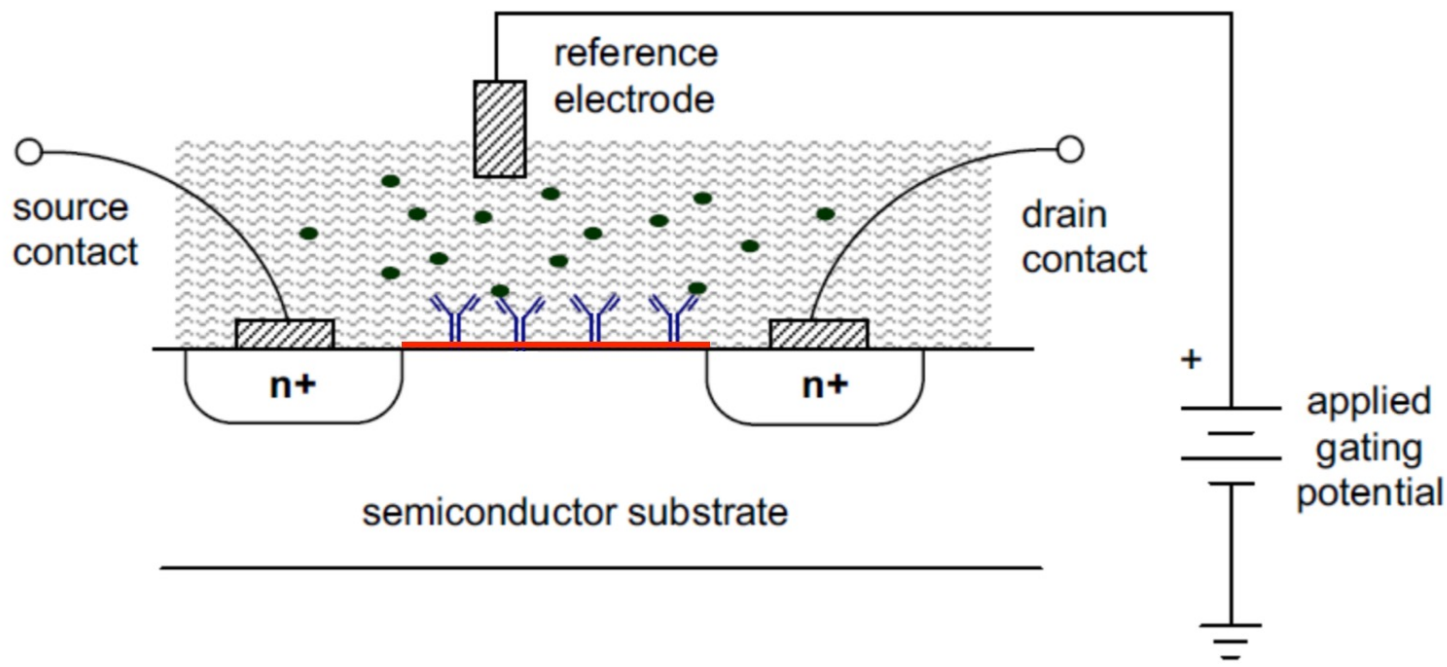
$$V_{FB_{ISFET}} = V_{FB_{MOSFET}} + E_{ref} + \varphi_{ij} + \chi_e + \varphi_{eo} - \phi_M$$

$$\varphi_{eo} = 2.3 \frac{kT}{q} (pH_{sup} - pH_{bulk})$$

$\varphi_{ij}$ : caduta di potenziale tra elettrodo di riferimento ed elettrolita  
 $\chi_e$ : potenziale dovuto ad eventuali dipoli superficiali  
 $Q_{ox}, C_{ox}$ : carica e capacità nell'ossido per unità di area  
 $\phi_M, \phi_{Si}$ : funzioni lavoro del metallo e del silicio

# BioFET

I sistemi FET per il monitoraggio della reazione fra antigene e anticorpo (immunoFET) consistono in uno strato di anticorpi immobilizzati sopra lo strato di ossido superficiale di un ISFET. **L'interazione Ag-Ac darà luogo ad una modulazione della carica superficiale** della membrana sensibile, con un conseguente **cambiamento della densità di carica nella zona d'inversione**.



Si-based BioFET: variazione delle  $V_{th}$ .

- $V_{GS}$  e  $V_{DS}$  fissate  $\rightarrow$  misura della  $\Delta I_{DS}$
- $I_{DS}$  e  $V_{DS}$  fissate  $\rightarrow$  misura della  $\Delta V_{GS}$

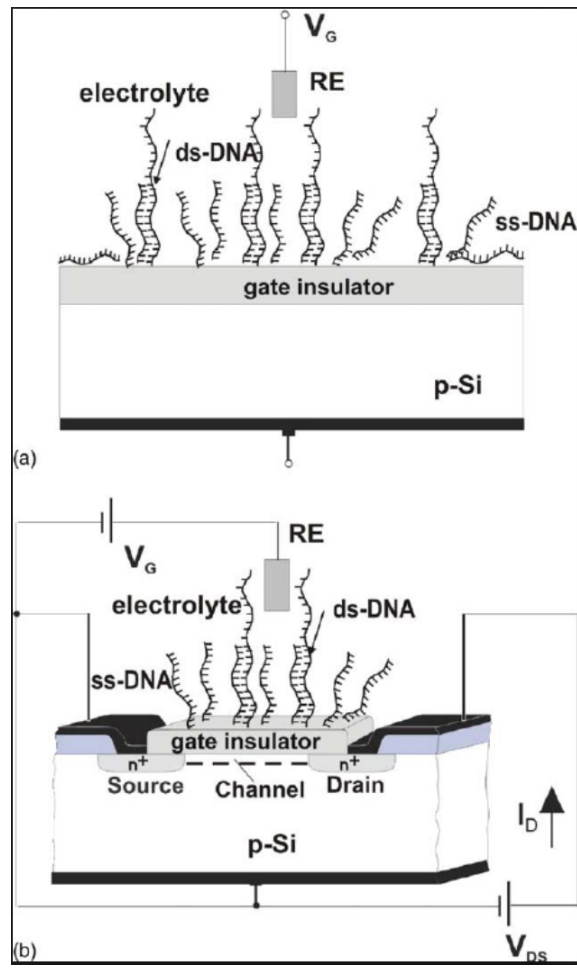
GrapheneFET: variazione della conduttanza del canale.

- $V_{GS}$  e  $V_{DS}$  fissate  $\rightarrow$  misura della  $\Delta I_{DS}$

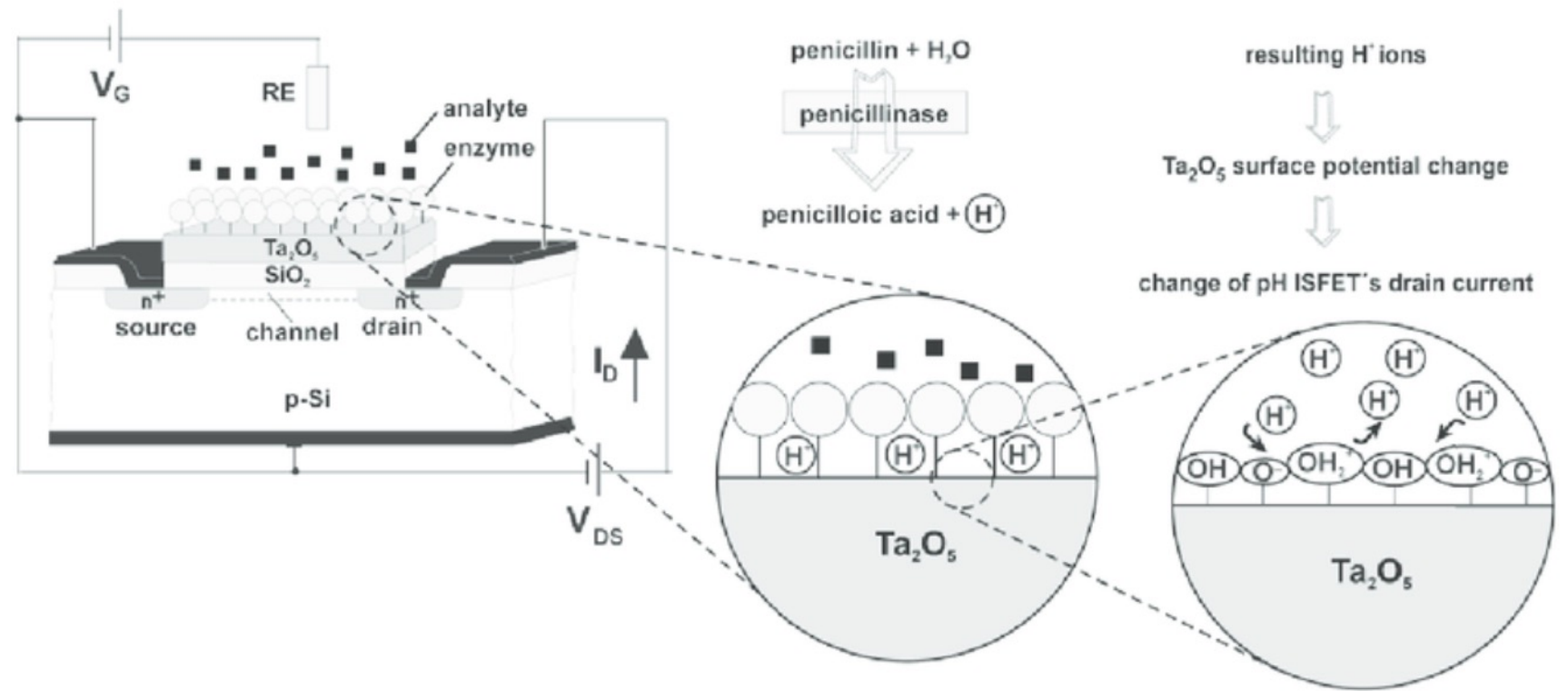
# BioFET

Con lo stesso approccio sono stati realizzati negli anni **DNA chip** e i cosiddetti **ENFET**, o **enzimatic FET**, biosensori catalitici potenziometrici in cui il layer di bioriconoscimento molecolare è ottenuto immobilizzando un enzima sulla superficie dell'ossido di gate.

**DNA chip**



**ENFET**

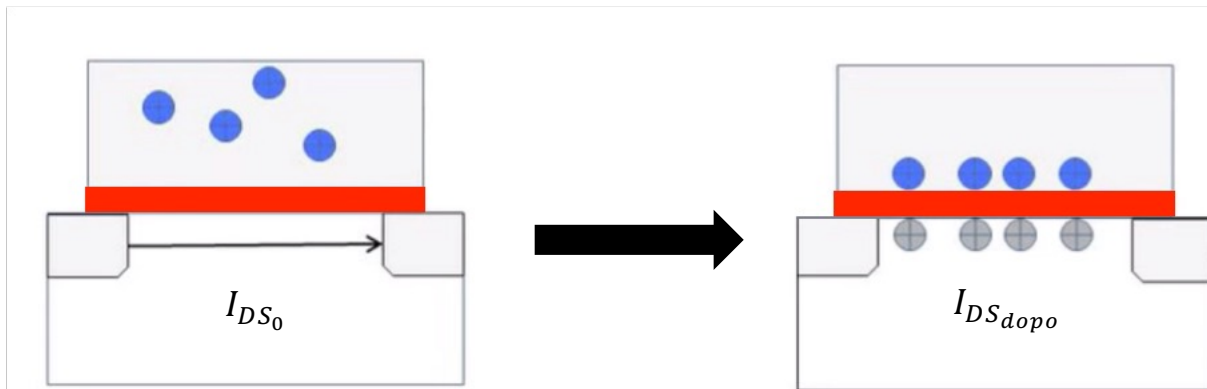
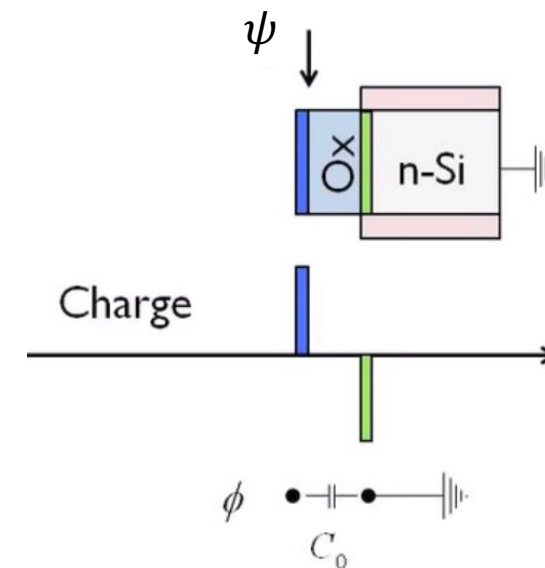


# BioFET

Limitazioni dei bioFET. **Nel caso ideale la sensibilità del bioFET aumenterebbe linearmente con la concentrazione** di analita (più carica presente, maggiore variazione di corrente).

$$S = \frac{I_{DS_{dopo}} - I_{DS_0}}{I_{DS_0}} = \frac{\Delta I_{DS}}{I_{DS_0}} \propto \rho_0$$

con  $\rho_0$  concentrazione dell'analita nel bulk.



Caso ideale

$$Q_{bio} = Q_{MOS} = C_{ox}\psi$$
$$I_{DS} \propto Q_{bio}$$

Nel caso ideale dunque la carica immobilizzata sulla superficie è indotta nella sua interezza nel canale del transistor. In realtà è stato dimostrato sperimentalmente che la sensibilità dipende **logaritmicamente dalla concentrazione...**

# BioFET e screening della carica

---

Da cosa deriva questa diminuzione di sensibilità? Da un fenomeno chiamato “screening della carica” dovuto alla presenza di ioni in soluzione. La presenza di **alte concentrazioni saline è infatti essenziale per permettere a biomolecole quali proteine e acidi nucleici di mantenere la loro conformazione.**

Come si presenta il sale in soluzione? Esempio NaCl.

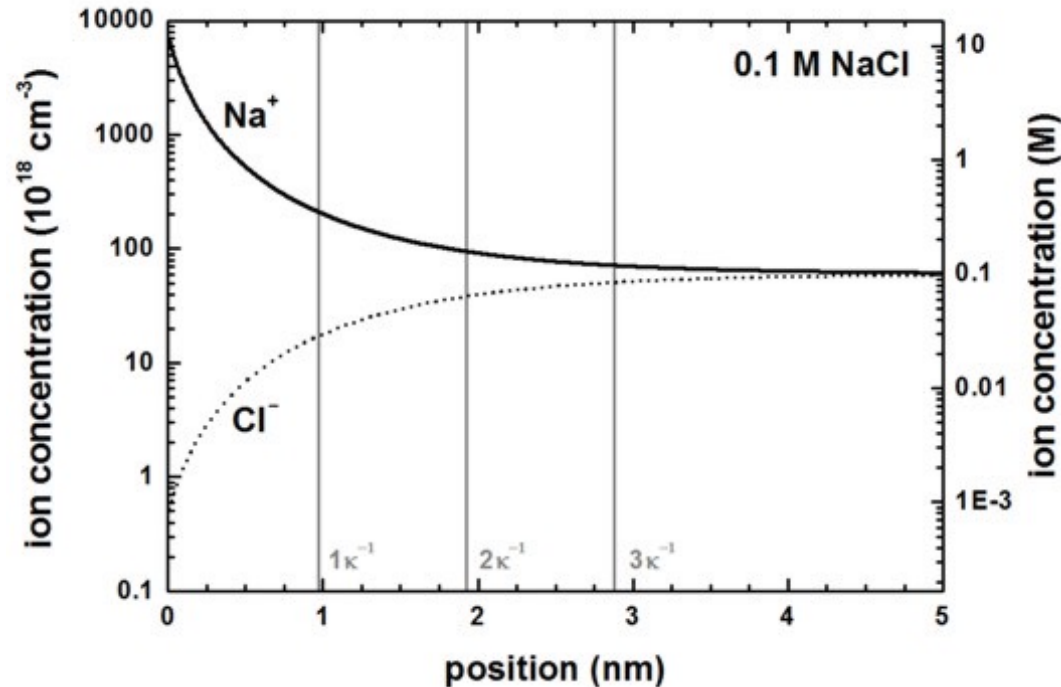
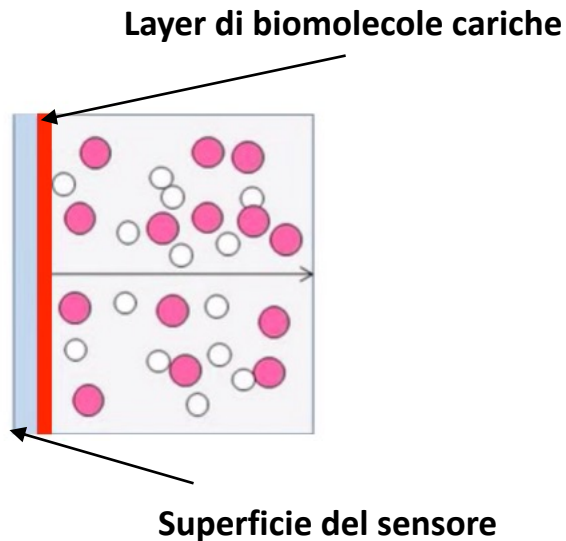
**Il sale ionizza in soluzione acquosa.** L'interazione tra gli atomi di sodio e cloro in una molecola di NaCl si riduce a causa della costante dielettrica dell'acqua ( $\epsilon_W \sim 80$ ), rendendola molto debole e permettendo agli atomi di separarsi e alla molecola di ionizzarsi. In particolare, considerando **l'energia di interazione tra due cariche** avremo che:

$$U = -\frac{q^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_W r^2}$$

con  $r$  distanza tra le cariche. Dunque in acqua **le forze che tengono legati gli atomi tra loro (permettendogli di formare un cristallo) diminuiscono drasticamente**, permettendo a volte alla semplice energia di agitazione termica di romperne il legame.

# BioFET e screening della carica

Nel caso in cui  $Q_{\text{bio}}$  (la carica dovuta al layer di bioriconoscimento e all'eventuale analita da esso legato) sia, per esempio, un layer di DNA (che come sappiamo ha una carica netta negativa) il **sodio verrà attratto sulla superficie** e il **cloro ne verrà respinto**. Il **sodio dunque neutralizzerà parte della carica**. Maggiore è la salinità (forza ionica), maggiore sarà l'effetto di screening della carica.



$$n^{-} \sim c_0 \cdot e^{q\psi/k_B T}$$

$$n^{+} \sim c_0 \cdot e^{-q\psi/k_B T}$$

$c_0$ : concentrazione ionica nel bulk  
 $\psi$ : potenziale

Con  $n^{+}$  densità superficiale di atomi di sodio e  $n^{-}$  densità superficiale di atomi di cloro: gli ioni  $\text{Cl}^{-}$  verranno respinti mentre quelli  $\text{Na}^{+}$  verranno attratti.

# BioFET e screening della carica

---

Nel caso reale dunque **parte della carica viene neutralizzata dalla presenza del sale**. Dato che la somma delle cariche deve essere costante (principio di conservazione della carica), **meno carica verrà indotta sul canale**. Il fenomeno si può vedere in termini di capacità di double layer.

$$Q_{bio} = Q_{ox} + Q_{DL} = C_{ox}\psi + C_{DL}\psi$$

$$\psi = \frac{Q_{bio}}{C_{DL} + C_{ox}}$$

$$Q_{MOS} = \frac{C_{ox}}{C_{ox} + C_{DL}} Q_{bio}$$

Caso ideale:

$$Q_{MOS} = C_{ox}\psi = Q_{bio}$$

# BioFET e screening della carica

---

La densità di carica nel double layer  $\rho_{DL}$  dipenderà dunque da quanti ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  sono presenti:

$$\rho_{DL} = q(n^+ - n^-) = c_0 q \cdot [e^{-q\psi/k_B T} - e^{q\psi/k_B T}]$$

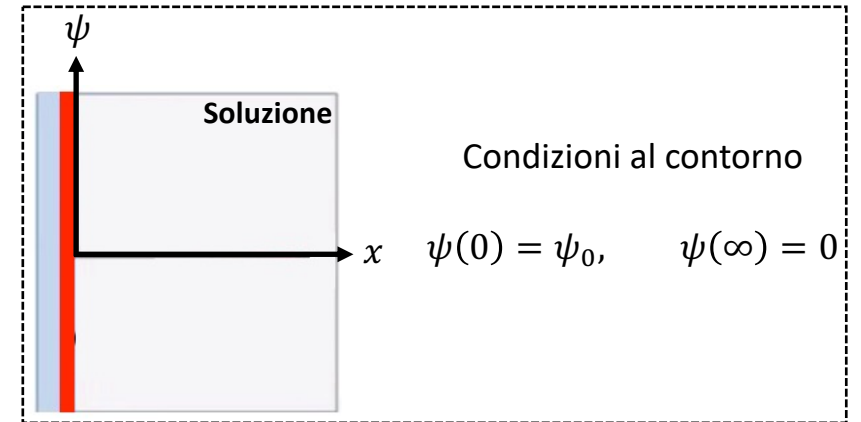
Il l'andamento del potenziale in prossimità della superficie sarà dunque descritto dall'equazione di Poisson-Boltzmann:

$$\frac{d^2\psi}{dx^2} = \frac{c_0 q}{\epsilon_W \epsilon_0} (n^+ - n^-) = \frac{c_0 q}{\epsilon_W \epsilon_0} \cdot [e^{-q\psi/k_B T} - e^{q\psi/k_B T}]$$

# BioFET e screening della carica

Sotto l'ipotesi di **bassi potenziali** ( $\psi \sim k_B T$ ) e di **bassa concentrazione ionica**, la soluzione dell'equazione precedente può essere espressa nella sua forma semplificata:

$$\psi = \psi_0 e^{-\frac{x}{L_D^2}}$$



con  $\psi_0$  potenziale superficiale indotto dal layer di biomolecole. **Il termine  $L_D$  è chiamato lunghezza di Debye** ed è un parametro di fondamentale importanza in ambito biosensoristico ( $N_{av}$  numero di Avogadro e  **$I_0$  forza ionica della soluzione**):

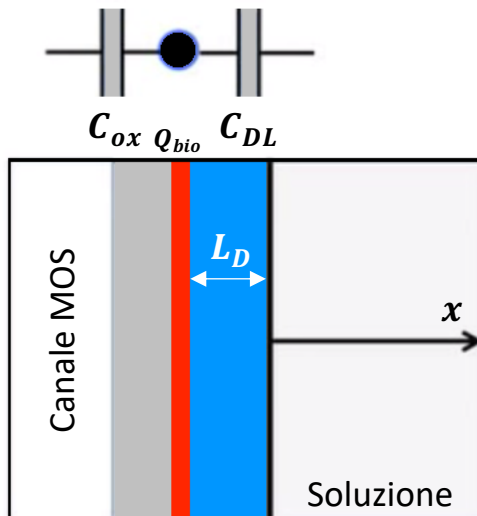
$$L_D^2 = \frac{\epsilon_W \epsilon_0 k_B T}{2 N_{av} I_0 (zq)^2}$$

# BioFET e screening della carica

La lunghezza di Debye determinerà dunque **l'estensione del double layer** (tipicamente pochi nanometri). La **capacità di double layer**  $C_{DL}$  può essere scritta in funzione di  $L_D$  (consideriamo il caso monodimensionale dunque trascuriamo l'area):

$$C_{DL} = \frac{\epsilon_W \epsilon_0}{L_D}$$

Sostituendo questa formulazione della capacità di double layer nell'espressione della carica indotta sul MOS è possibile trarre le prime considerazioni:



$$Q_{MOS} = \frac{C_{ox}}{C_{ox} + C_{DL}} Q_{bio} = \frac{\epsilon_{ox} \epsilon_0 / T_{ox}}{\epsilon_{ox} \epsilon_0 / T_{ox} + \epsilon_W \epsilon_0 / L_D} Q_{bio}$$

Dunque in questo caso **la carica indotta nel MOS sarà solo una frazione della carica del biolayer.**

# BioFET e screening della carica

---

Svolgendo l'equazione precedente considerando che  $\epsilon_W \gg \epsilon_{ox}$  avremo:

$$Q_{MOS} \cong \frac{\epsilon_{ox}}{\epsilon_W} \frac{L_D}{T_{ox}} Q_{bio} \Rightarrow \rho_{canale} \cong \frac{\epsilon_{ox}}{\epsilon_W} \frac{L_D}{T_{ox}} \rho_{bio}$$

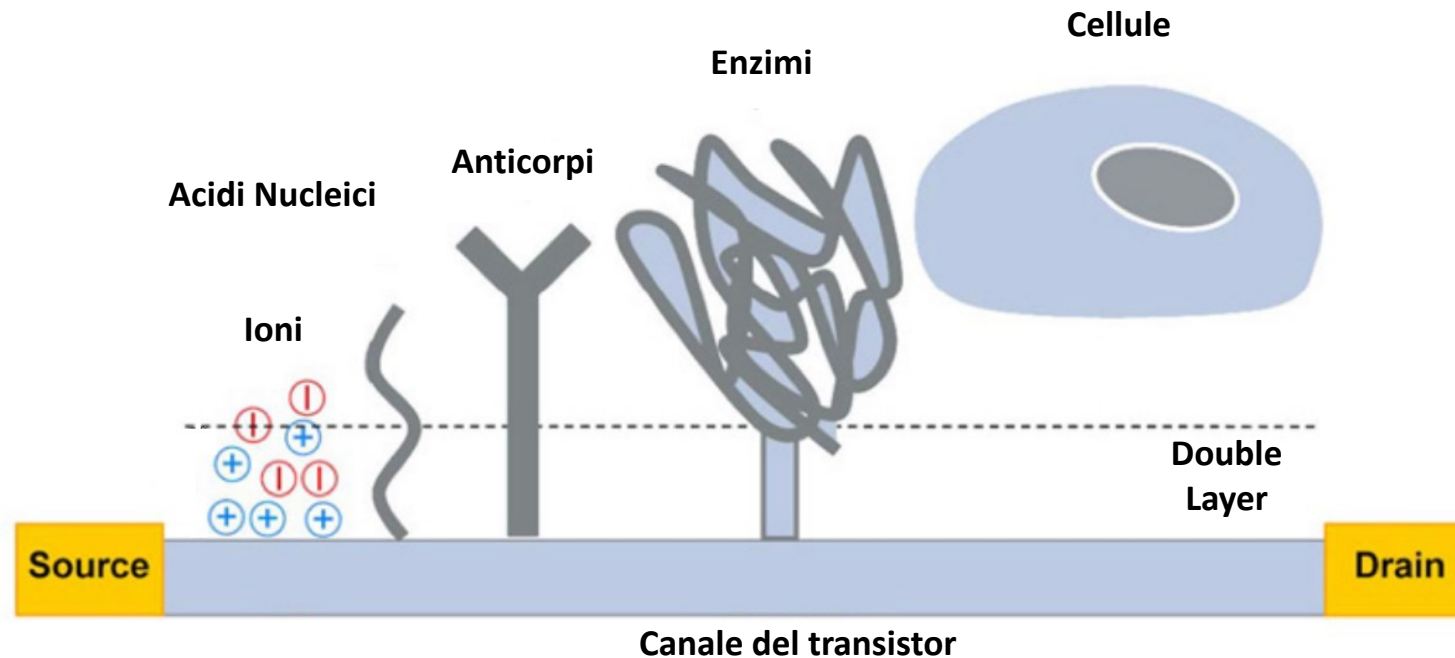
Ricordandoci l'espressione della lunghezza di Debye possiamo ridefinire la dipendenza della risposta del sensore non solo in termini di **densità di carica superficiale** ma anche in termini di **concentrazione del sale** (e dunque di forza ionica della soluzione):

$$L_D^2 = \frac{\epsilon_W \epsilon_0 k_B T}{2 N_{av} I_0 (zq)^2}$$

$$Q_{MOS} \propto \frac{\rho_{bio}}{\sqrt{c_0}}$$

# BioFET e screening della carica

Alta concentrazione di sale  $\rightarrow$  alta forza ionica  $\rightarrow$  Piccola lunghezza di Debye  $\rightarrow$  Alta  $C_{DL}$   $\rightarrow$  Maggiore effetto schermante



In altre parole: **ciò che accade fuori dalla regione di double layer** (dunque oltre la zona definita dalla lunghezza di Debye) **non può essere rilevata da un bioFET.**

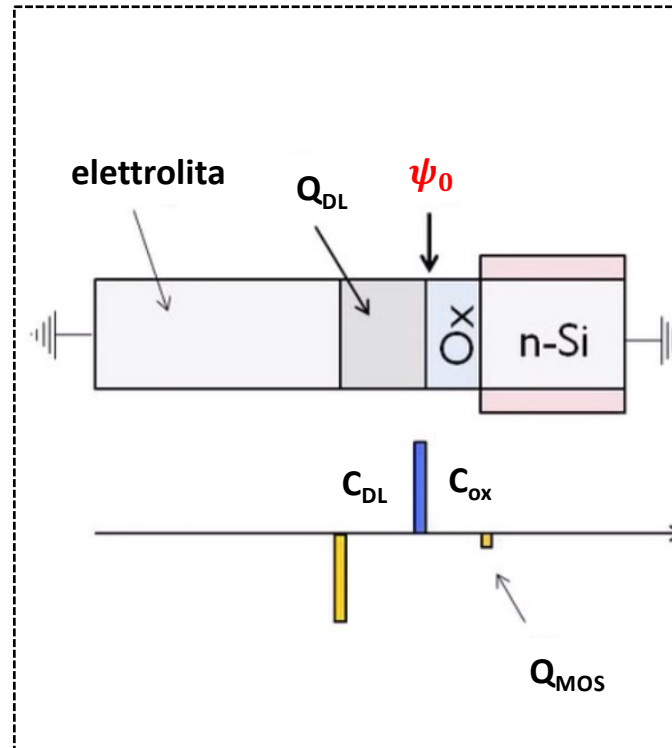
# BioFET e screening della carica

Ma, come accennato in precedenza, **la dipendenza sperimentale della sensibilità dalla concentrazione è logaritmica**...da cosa deriva? I discorsi fatti fino ad ora valgono sotto l'ipotesi di basse concentrazioni saline: **nei sistemi biologici le forze ioniche sono però molto elevate** e dunque le approssimazioni nell'equazione di Poisson non sono più valide.

## Approssimazione lineare

$$Q_{DL} \propto C_{DL}\psi_0 = \frac{\epsilon_W \epsilon_0}{L_D} \psi_0$$

$\psi_0$ : potenziale superficiale indotto dal biolayer



## Senza approssimazione

$$Q_{DL} = Q_0 \exp\left(\frac{zq\psi_0}{2k_B T}\right)$$

$$Q_0 = \sqrt{2k_B \epsilon_W \epsilon_0 c_0}$$

$$Q_{bio} = Q_{MOS} + Q_{DL}$$

$$Q_{bio} = C_{ox}\psi_0 + Q_0 \exp\left(\frac{zq\psi_0}{2k_B T}\right)$$

Equazione non lineare!

# BioFET e screening della carica

Per concentrazioni molto elevate di sale (nell'ordine di 100 mM), la carica indotta dal biolayer può essere modellata nel seguente modo:

$$Q_{bio} = C_{ox}\psi_0 + Q_0 \exp\left(\frac{zq\psi_0}{2k_B T}\right) \Rightarrow Q_{bio} \approx Q_0 \exp\left(\frac{zq\psi_0}{2k_B T}\right)$$

Il potenziale superficiale potrà dunque essere espresso nel seguente modo:

$$\psi_0 = \frac{2k_B T}{zq} \ln\left(\frac{Q_{bio}}{Q_0}\right)$$

Sostituendo nell'equazione della carica nel MOS otteniamo la **carica che effettivamente viene indotta nel canale**:

$$Q_{MOS} \approx C_{ox}\psi_0 \propto \frac{2k_B T}{zq} \ln\left(\frac{Q_{bio}}{Q_0}\right)$$

# BioFET e screening della carica

---

Possiamo a questo punto **ridefinire  $Q_{bio}$  tenendo conto della carica delle singole molecole  $\sigma_M$**  (single strand di DNA, anticorpi etc...) e **del numero di siti superficiali occupati in un dato istante temporale** (quello che abbiamo definito  **$N(t)$**  nelle scorse lezioni):

$$Q_{bio} = \sigma_M N(t)$$

Sostituendo nella precedente equazione della carica indotta nel MOS avremo:

$$Q_{MOS} \approx C_{ox} \psi_0 \propto \frac{2k_B T}{zq} \ln \left( \frac{\sigma_M N(t)}{Q_0} \right)$$

Come vedremo più avanti quando parleremo di tempo di risposta di un sensore al variare della geometria,  **$N(t)$  dipenderà dalla concentrazione di analita nel bulk e dal tempo** secondo la seguente relazione:

$$N(t) = \rho_0 \times t^{(3-D_F)/2}$$

con  $D_F$  dimensione frattale (un **termine legato alla geometria del sensore** che approfondiremo più avanti).

# BioFET e screening della carica

---

L'equazione diventerà dunque:

$$Q_{MOS} \approx \frac{2k_B T}{zq} \ln \left( \frac{\sigma_M \rho_0 \times t^{(3-D_F)/2}}{Q_0} \right)$$

Ecco dunque da dove deriva la **dipendenza logaritmica della sensibilità di un bioFET dalla concentrazione di analita**.

Dal punto di vista fisico dunque cosa accade? Man mano che l'analita raggiunge la superficie, maggiormente verrà schermato a causa della presenza di un'alta concentrazione di sale in soluzione. In seguito a questa schermatura, il **transistor sentirà una porzione via via minore di carica**.

# BioFET – esempio applicativo

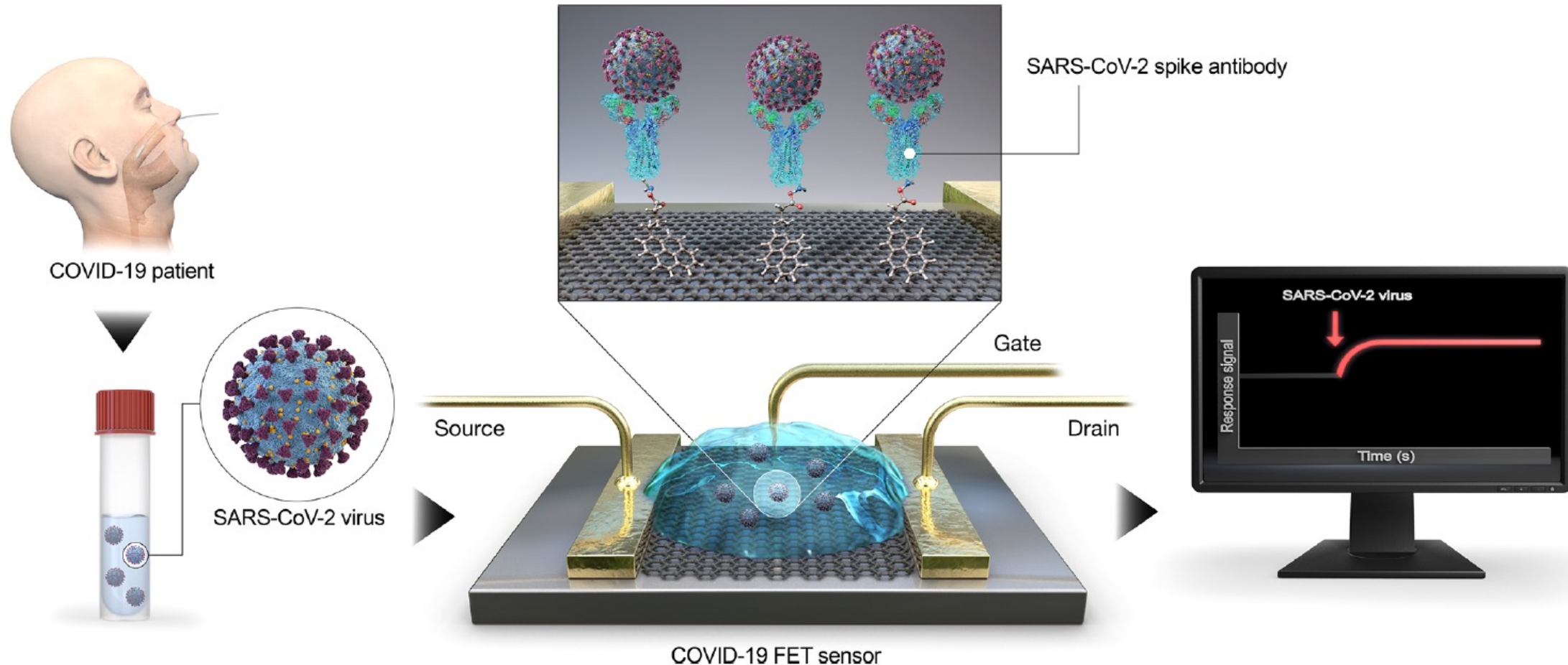


Figure 1. Schematic diagram of COVID-19 FET sensor operation procedure. Graphene as a sensing material is selected, and SARS-CoV-2 spike antibody is conjugated onto the graphene sheet *via* 1-pyrenebutyric acid *N*-hydroxysuccinimide ester, which is an interfacing molecule as a probe linker.

# BioFET – esempio applicativo

**“Before immobilizing SARS-CoV-2 spike antibody onto the FET, we verified the performance of the antibody by enzymelinked immunosorbent assay (ELISA).”**

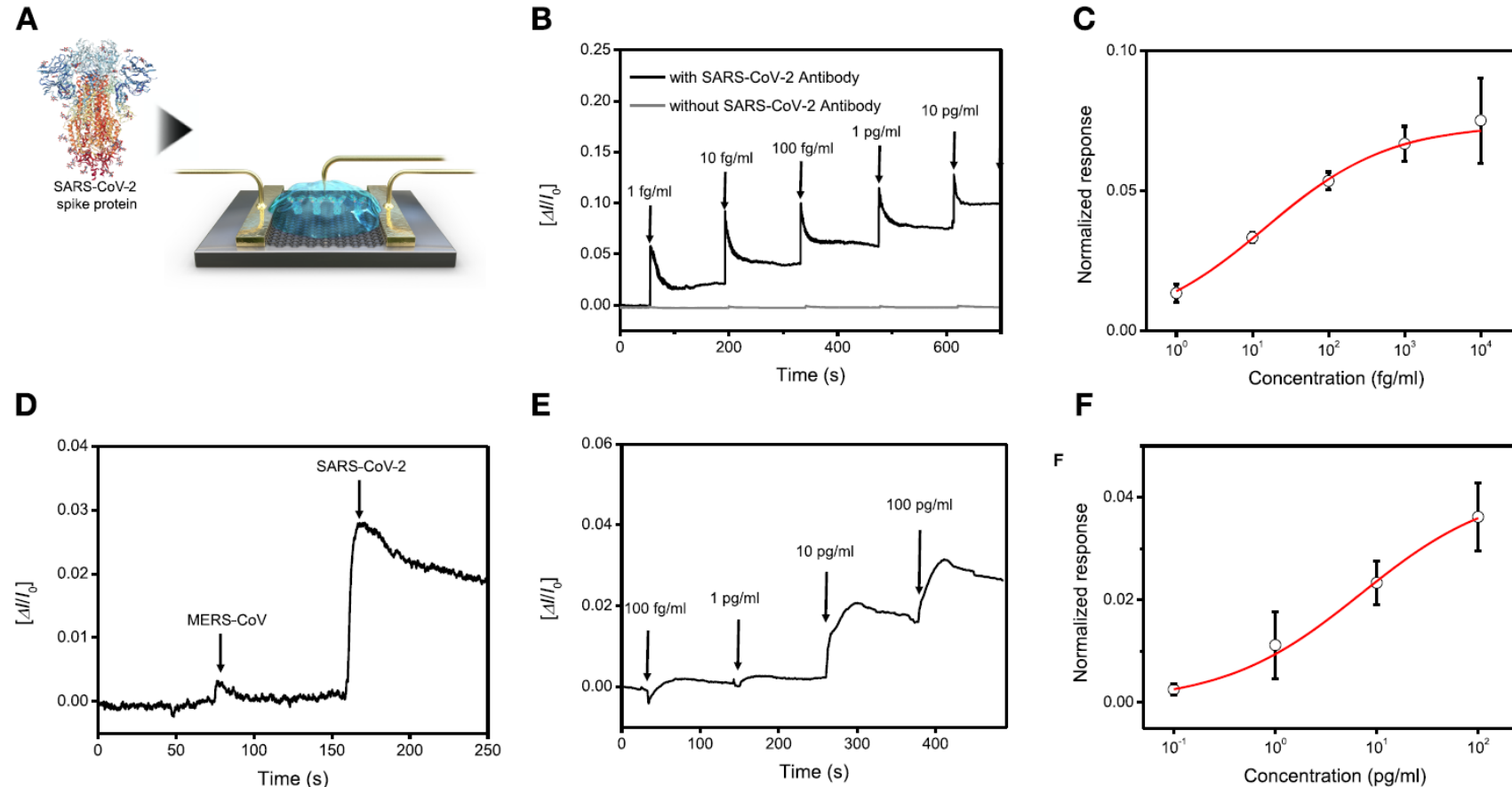


Figure 4. Detection of SARS-CoV-2 antigen protein. (A) Schematic diagram for the COVID-19 FET sensor for detection of SARS-CoV-2 spike protein. (B) Real-time response of COVID-19 FET toward SARS-CoV-2 antigen protein in PBS and (C) related dose-dependent response curve ( $V_{DS} = 0.01$  V). Graphene-based FET without SARS-CoV-2 antibody is presented as negative control. (D) Selective response of COVID-19 FET sensor toward target SARS-CoV-2 antigen protein and MERS-CoV protein. (E) Real-time response of COVID-19 FET toward SARS-CoV-2 antigen protein in UTM and (F) related dose-dependent response curve.

# BioFET – esempio applicativo

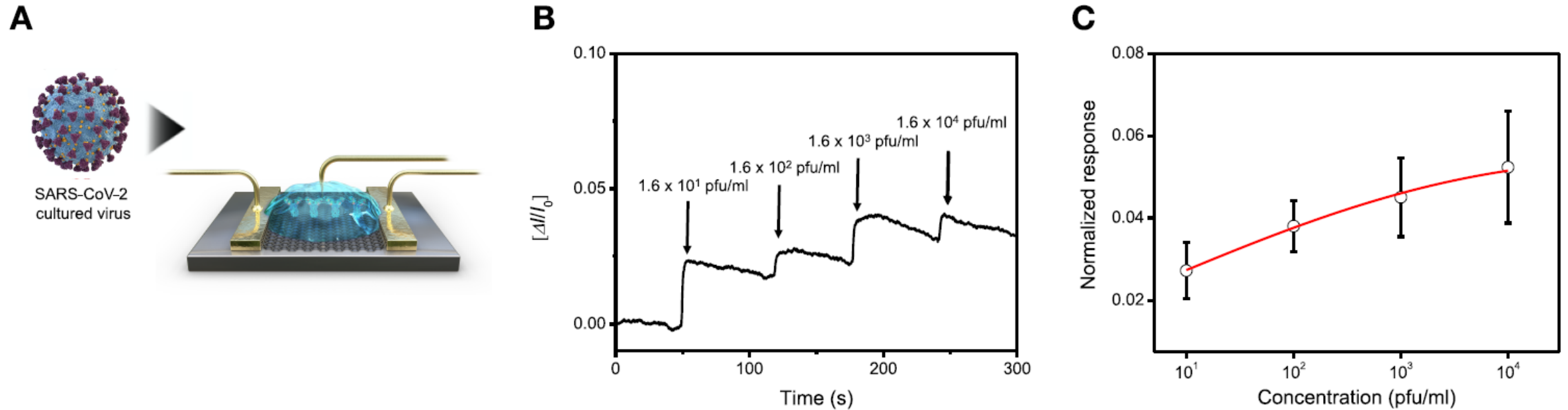
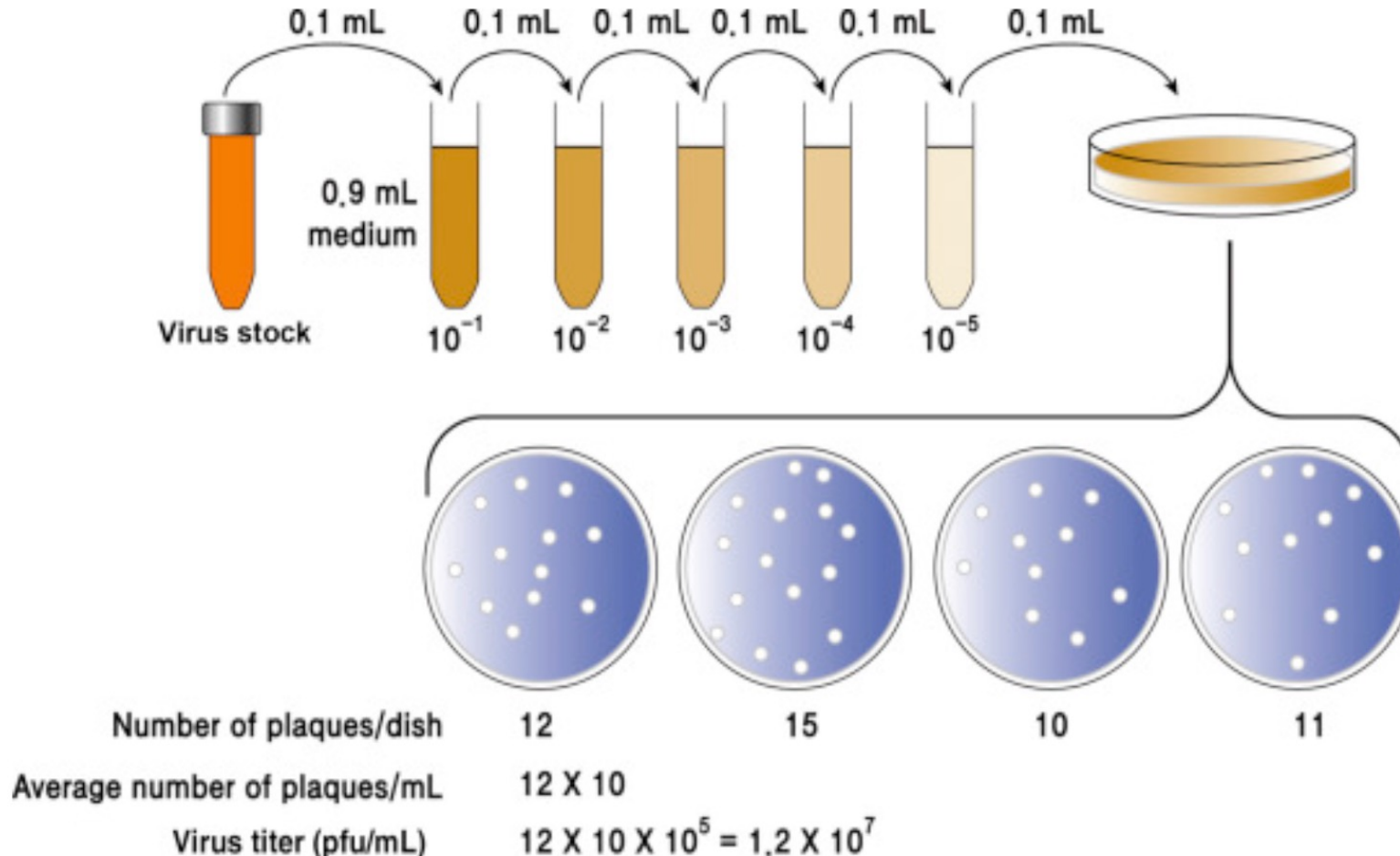


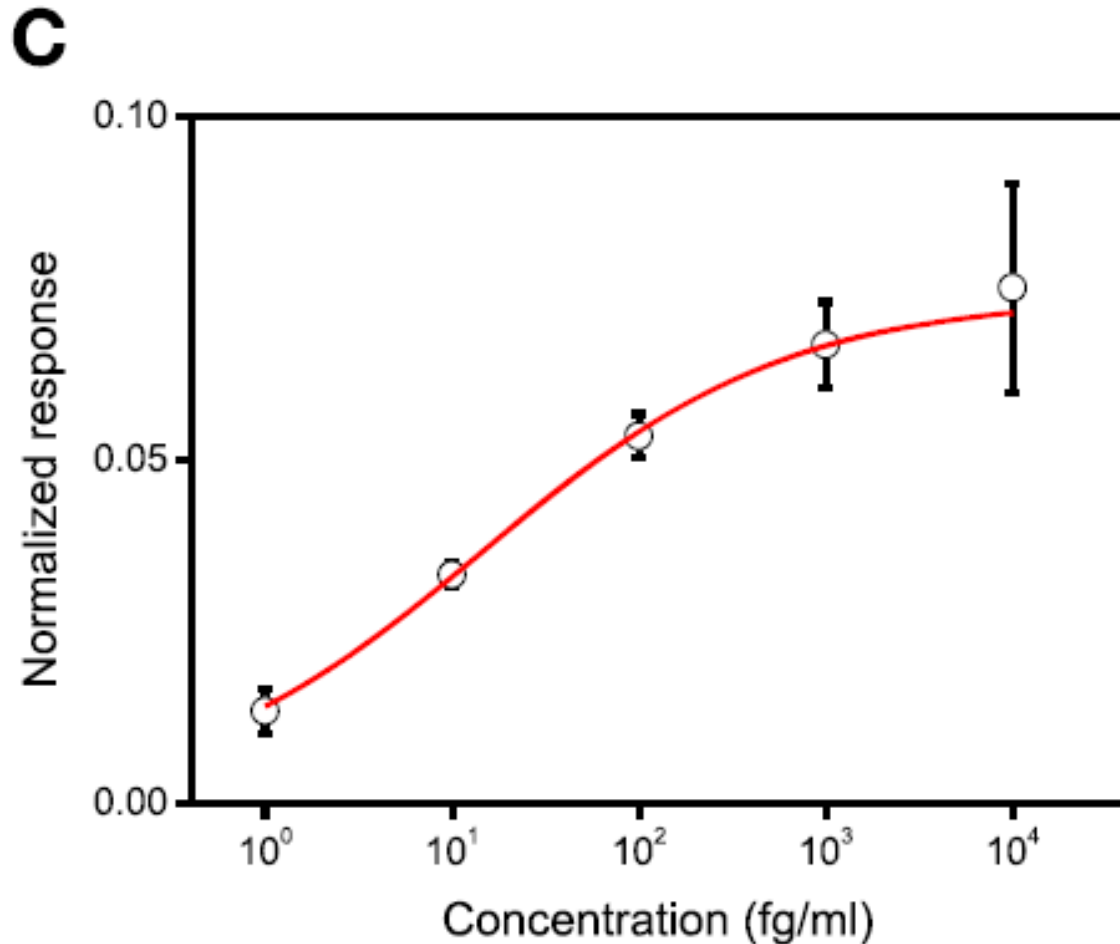
Figure 5. Detection of cultured SARS-CoV-2 virus. (A) Schematic diagram for the COVID-19 FET sensor for detection of SARS-CoV-2 cultured virus. (B) Real-time response of COVID-19 FET toward SARS-CoV-2 cultured virus and (C) related dose-dependent response curve.

# BioFET – esempio applicativo

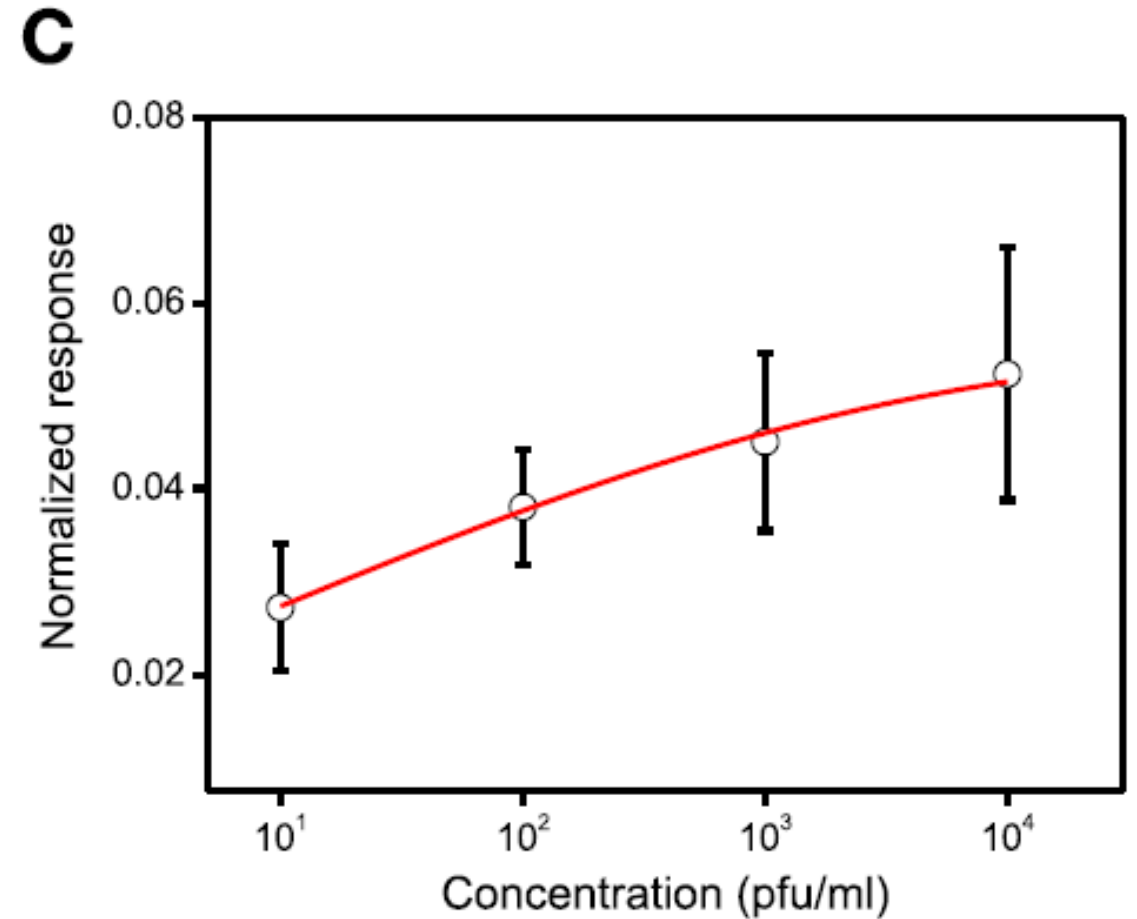
Plaque forming units (PFU) danno una misura della quantità di virus capaci di lisare le cellule attaccate formando una cosiddetta placca.



# BioFET – esempio applicativo



**Validazione con spike protein isolate**



**Risposta al Virus**

# BioFET – esempio applicativo

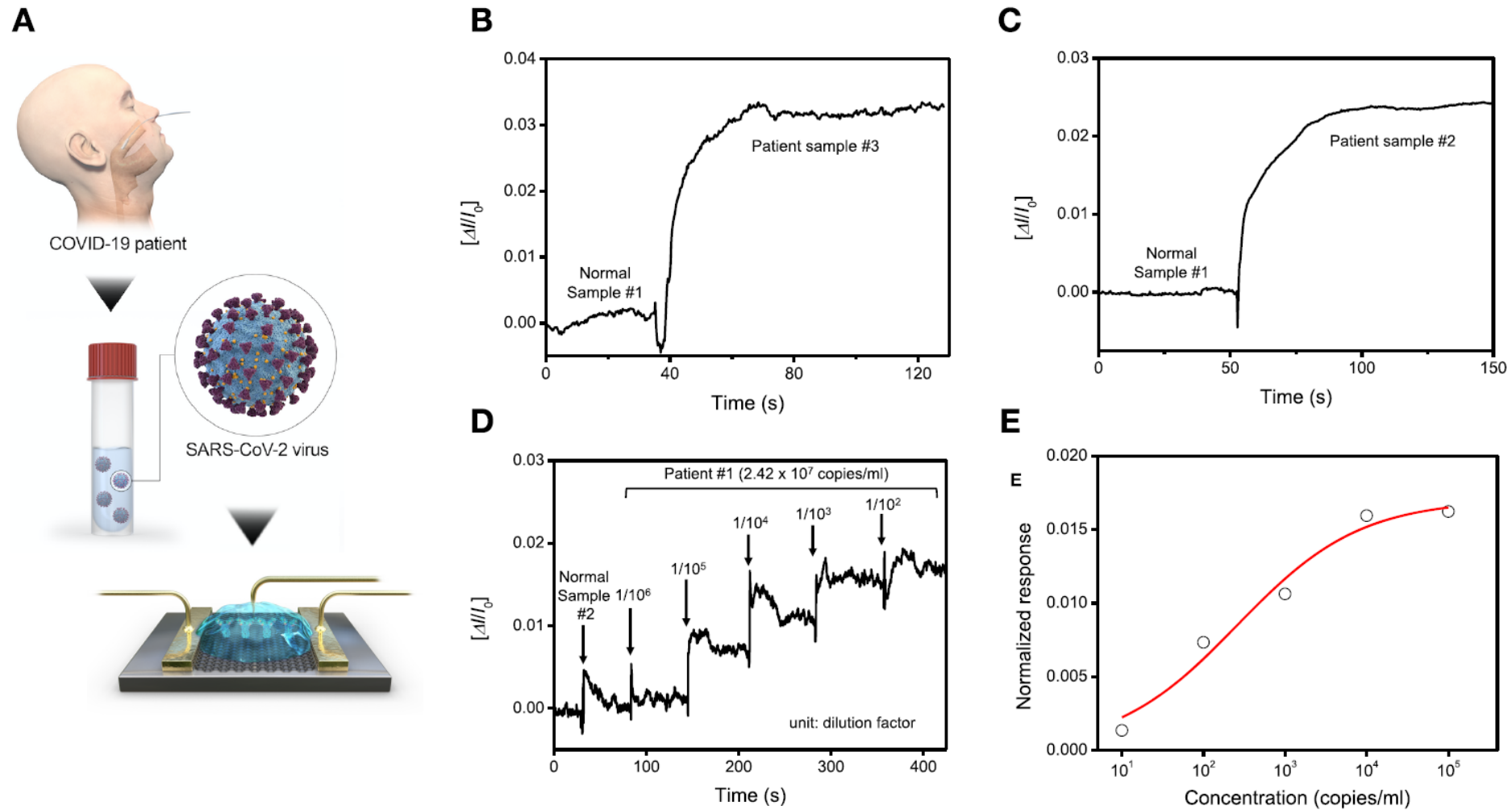


Figure 6. **Detection of SARS-CoV-2 virus from clinical samples.** (A) Schematic diagram for the COVID-19 FET sensor for detection of SARS-CoV-2 virus from COVID-19 patients. (B,C) Comparison of response signal between normal samples and patient ones. (D) Real-time response of COVID-19 FET toward SARS-CoV-2 clinical sample and (E) related dose-dependent response curve.

# BioFET

---

## Riassunto concetti principali.

I **bioFET** possono dunque essere utilizzati per **la rilevazione di biomolecole che presentano una carica netta diversa da zero**. La carica indotta dal legame della molecola d'interesse con un sito di legame sulla superficie del sensore determina uno squilibrio di carica che ne fa variare l'uscita. Sono considerati biosensori potenziometrici (**trasduzione di una carica**).

Biomolecole come le proteine hanno solitamente necessità di alte concentrazioni di sale per mantenere la loro conformazione funzionale.

**Alte concentrazioni di sale** però determinano un **forte screening delle cariche**, il quale **riduce fortemente la sensibilità** di questi sensori. Lo screening dipende da diversi fattori tra cui la **temperatura**, la **costante dielettrica dell'acqua**, la **dimensione della biomolecola** d'interesse e di quella utilizzata come layer di bioriconoscimento, la **dimensione e tipologia degli ioni** presenti in soluzione...

# Come affrontare lo screening

---

Torniamo al problema dello **screening della carica**. Esiste un modo per risolvere il problema? Continuiamo ad analizzare il caso di un sensore planare.

Il sale come abbiamo visto è necessario e **il suo effetto di screening della carica non è eliminabile "fisicamente"**. È possibile però aggirare il problema:

- De-screening ad alta frequenza

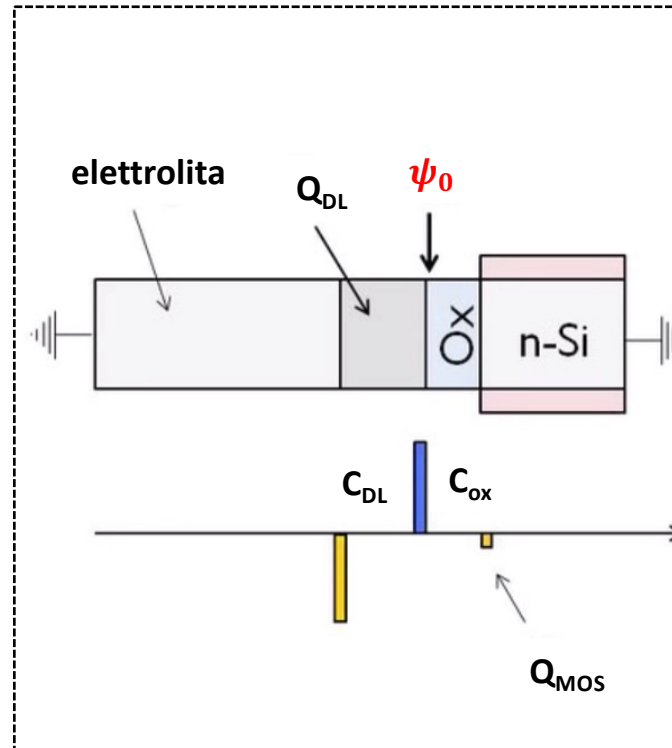
# BioFET e screening della carica (slide ripetuta)

Ma, come visto in precedenza, **la dipendenza sperimentale della sensibilità dalla concentrazione è logaritmica**...da cosa deriva? I discorsi fatti fino ad ora valgono sotto l'ipotesi di basse concentrazioni saline: **nei sistemi biologici le forze ioniche sono però molto elevate** e dunque le approssimazioni nell'equazione di Poisson non sono più valide.

## Approssimazione lineare

$$Q_{DL} \propto C_{DL}\psi_0 = \frac{\epsilon_W \epsilon_0}{L_D} \psi_0$$

$\psi_0$ : potenziale superficiale indotto dal biolayer



## Senza approssimazione

$$Q_{DL} = Q_0 \exp\left(\frac{zq\psi_0}{2k_B T}\right)$$

$$Q_0 = \sqrt{2k_B \epsilon_W \epsilon_0 c_0}$$

$$Q_{bio} = Q_{MOS} + Q_{DL}$$

$$Q_{bio} = C_{ox}\psi_0 + Q_0 \exp\left(\frac{zq\psi_0}{2k_B T}\right)$$

Equazione non lineare!

# BioFET e screening della carica (slide ripetuta)

Per concentrazioni molto elevate di sale (nell'ordine di 100 mM), la carica indotta dal biolayer può essere semplificata nel seguente modo:

$$Q_{bio} = C_{ox}\psi_0 + Q_0 \exp\left(\frac{zq\psi_0}{2k_B T}\right) \Rightarrow Q_{bio} \approx Q_0 \exp\left(\frac{zq\psi_0}{2k_B T}\right)$$

Il potenziale superficiale potrà dunque essere espresso nel seguente modo:

$$\psi_0 = \frac{2k_B T}{zq} \ln\left(\frac{Q_{bio}}{Q_0}\right)$$

Sostituendo nell'equazione della carica nel MOS otteniamo la **carica che effettivamente viene indotta nel canale**:

$$Q_{MOS} \approx C_{ox}\psi_0 \propto \frac{2k_B T}{zq} \ln\left(\frac{Q_{bio}}{Q_0}\right)$$

# BioFET e screening della carica (slide ripetuta)

Possiamo a questo punto **ridefinire  $Q_{bio}$  tenendo conto della carica delle singole molecole  $\sigma_M$**  (single strand di DNA, anticorpi etc...) e **del numero di siti superficiali occupati in un dato istante temporale** (quello che abbiamo definito  **$N(t)$**  nelle scorse lezioni):

$$Q_{bio} = \sigma_M N(t)$$

Sostituendo nella precedente equazione della carica indotta nel MOS avremo:

$$Q_{MOS} \approx C_{ox}\psi_0 \propto \frac{2k_B T}{zq} \ln \left( \frac{\sigma_M N(t)}{Q_0} \right)$$

Come vedremo più avanti quando parleremo di tempo di risposta di un sensore al variare della geometria,  **$N(t)$  dipenderà dalla concentrazione di analita nel bulk e dal tempo** secondo la seguente relazione:

$$N(t) = \rho_0 \times t^{(3-D_F)/2}$$

con  $D_F$  dimensione frattale (un **termine legato alla geometria del sensore** che approfondiremo più avanti).

# BioFET e screening della carica (slide ripetuta)

---

L'equazione diventerà dunque:

$$Q_{MOS} \approx \frac{2k_B T}{zq} \ln \left( \frac{\sigma_M \rho_0 \times t^{(3-D_F)/2}}{Q_0} \right)$$

Ecco dunque da dove deriva la **dipendenza logaritmica della sensibilità di un bioFET dalla concentrazione di analita**.

Dal punto di vista fisico dunque cosa accade? Man mano che l'analita raggiunge la superficie, maggiormente verrà schermato a causa della presenza di un'alta concentrazione di sale in soluzione. In seguito a questa schermatura, il **transistor sentirà una porzione via via minore di carica**.

# De-screening ad alta frequenza

---

In **condizioni statiche** e sotto l'ipotesi di bassi potenziali ( $\psi < k_B T$ ), il potenziale in soluzione avrà il seguente andamento:

$$\psi = \psi_0 e^{-x/L_D^2}$$

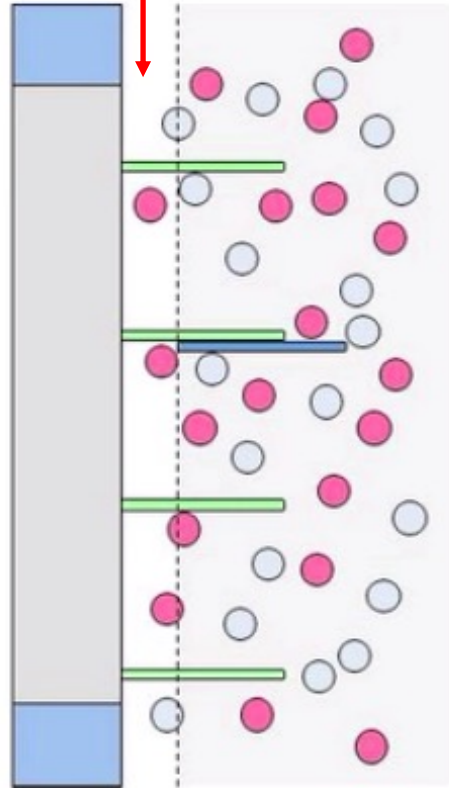
Come visto in precedenza, il **parametro caratteristico** che ci dà indicazioni sull'effetto del sale sulla sensibilità del dispositivo è la **lunghezza di Debye**  $L_D$ .

$$L_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_W \varepsilon_0 k_B T}{2N_{av} I_0 (zq)^2}}$$

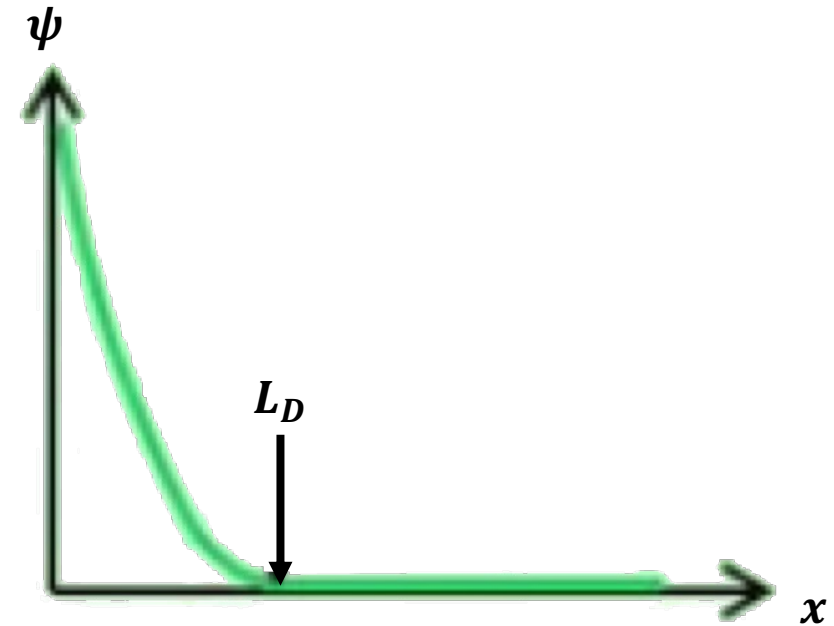
Con  $N_{av}$  numero di Avogadro e  $I_0$  forza ionica della soluzione salina.

# De-screening ad alta frequenza

$$L_D = \sqrt{\frac{\epsilon_W \epsilon_0 k_B T}{2N_{av} I_0 (zq)^2}}$$



$$\psi = \psi_0 e^{-x/L_D^2}$$

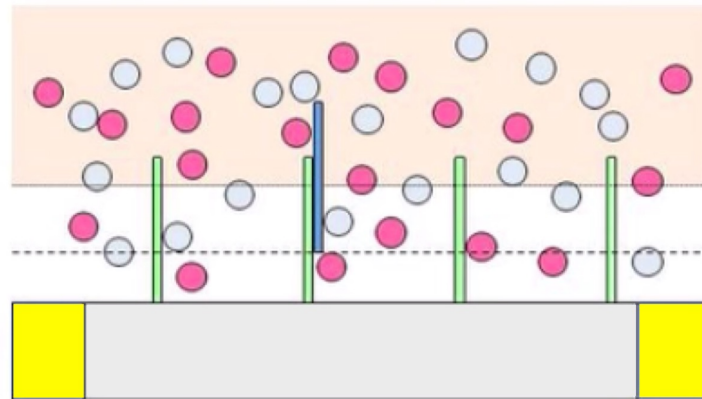


Per una concentrazione di sale di 100 nM avremo una  $L_D$  di circa 1 nm.

# De-screening ad alta frequenza

La situazione cambia in condizioni di polarizzazioni tempo-varianti. In particolare, se eccitiamo il sistema con un segnale AC, **oltre una certa frequenza "critica"** che dipenderà dalla concentrazione del sale, **gli ioni del sale stesso non saranno più in grado di seguire lo stimolo, rimanendo di fatto "congelati"** a differenza delle cariche presenti nelle biomolecole che invece riusciranno a seguire il segnale. È possibile dimostrare che **il potenziale, oltre quella frequenza, varia linearmente con la distanza**. In particolare si avrà:

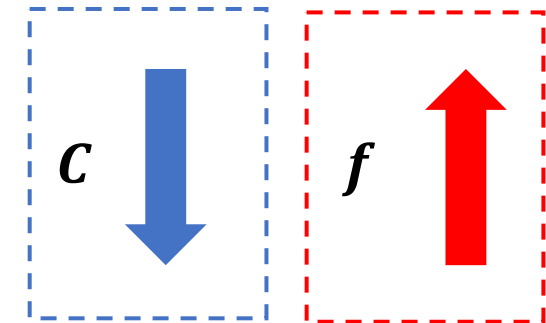
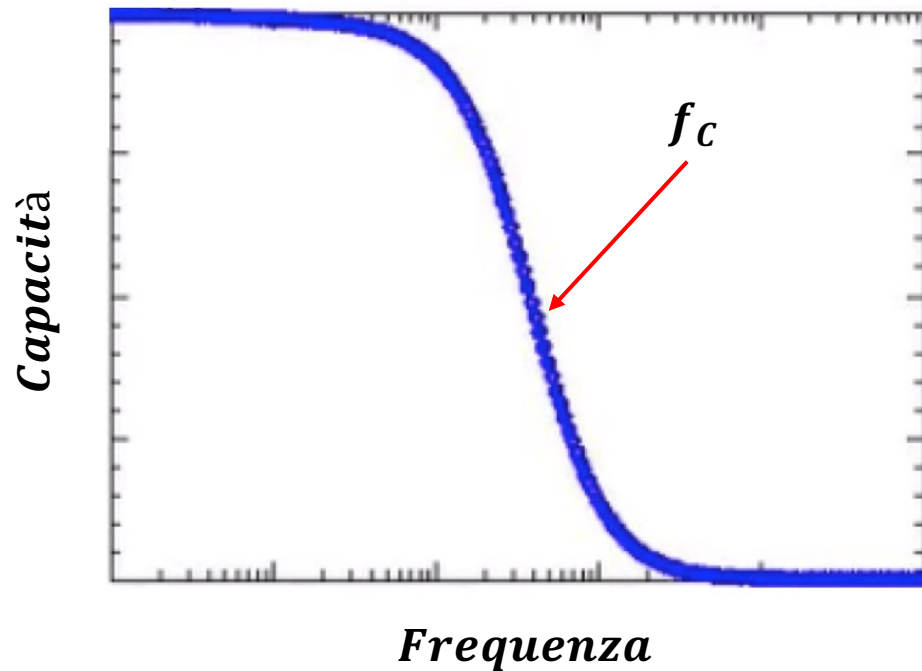
$$\psi = \psi_0 e^{-x/L_D^2} \rightarrow \psi = \psi_0 \frac{1}{1 + x/L_D}$$



Effetto finale: aumento della lunghezza di Debye effettiva.

# De-screening ad alta frequenza

Qual è il fenomeno che spiega questo comportamento? Consideriamo in prima istanza un sistema RC e monitoriamo la capacità in funzione della frequenza.

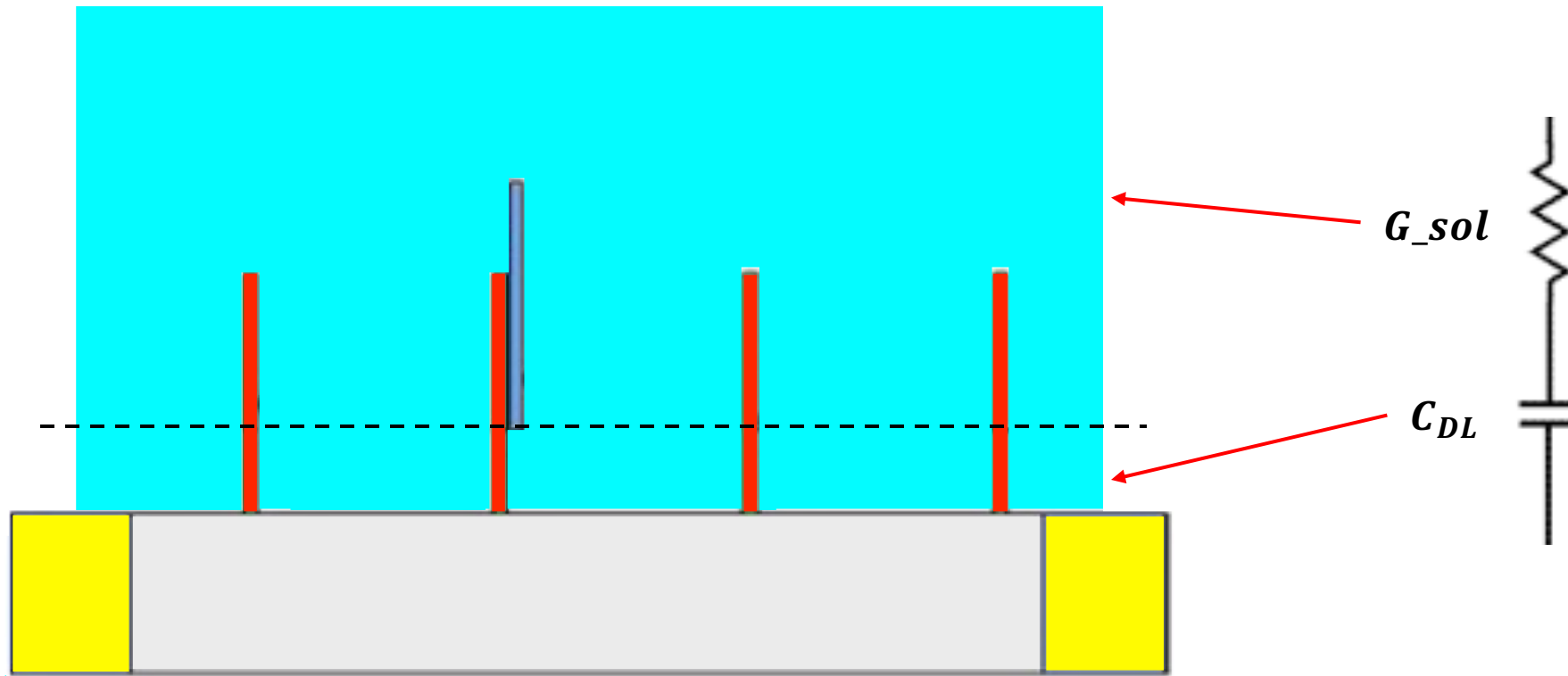


La frequenza critica (cutoff) è:

$$f_c = \frac{1}{2\pi RC} \propto \frac{1}{RC} = \frac{G}{C}$$

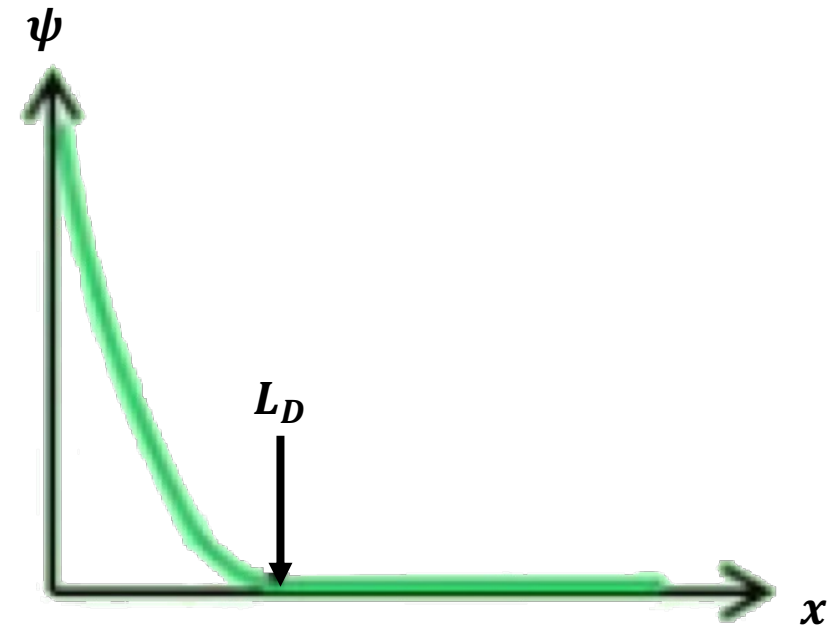
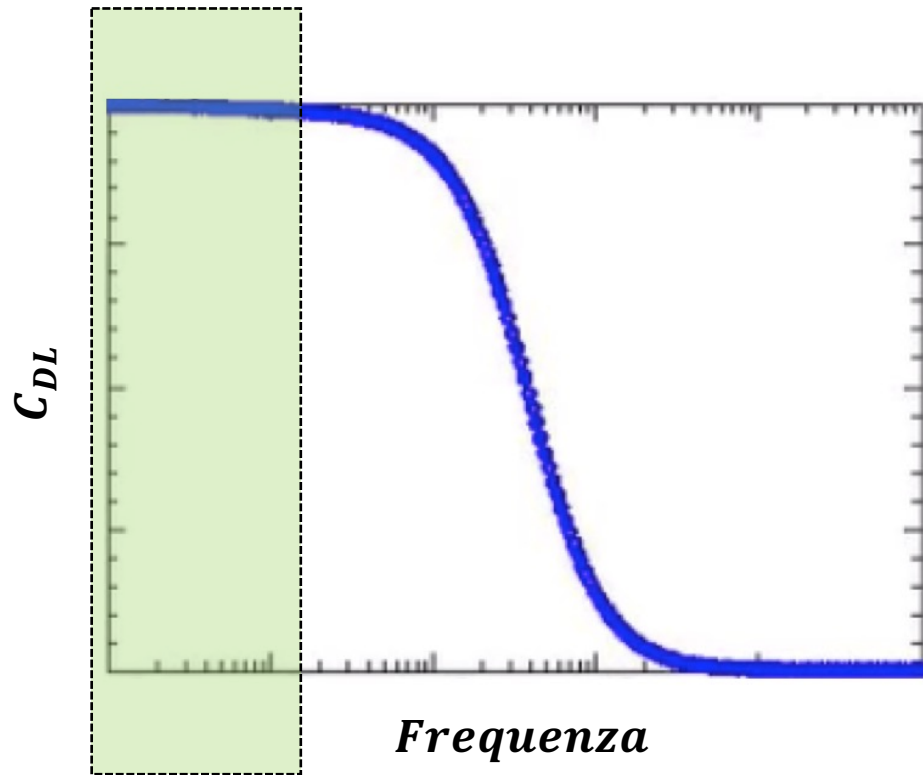
# De-screening ad alta frequenza

Il sistema che stiamo considerando è in effetti un sistema RC, in cui  $C = C_{DL}$  e  $G = G_{sol}$ .



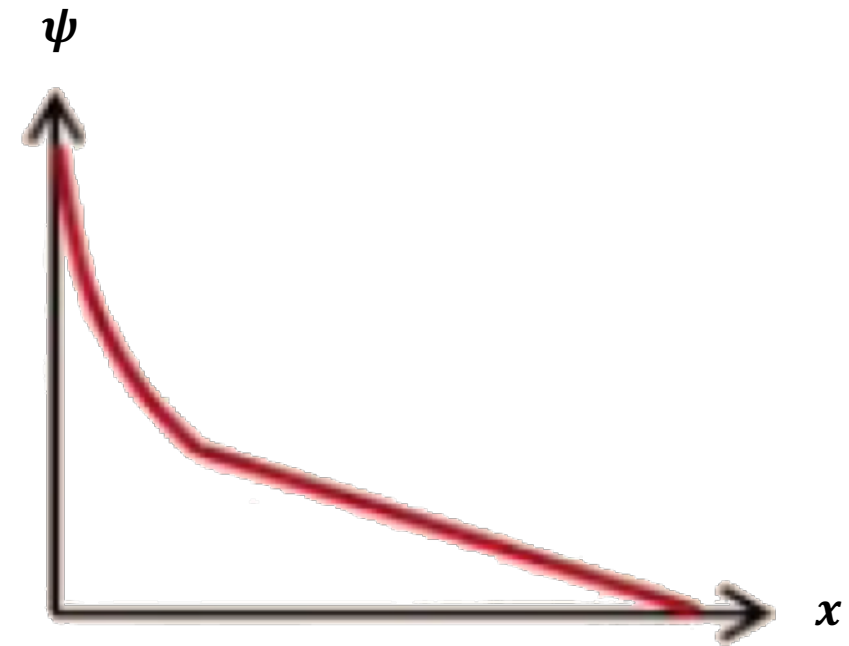
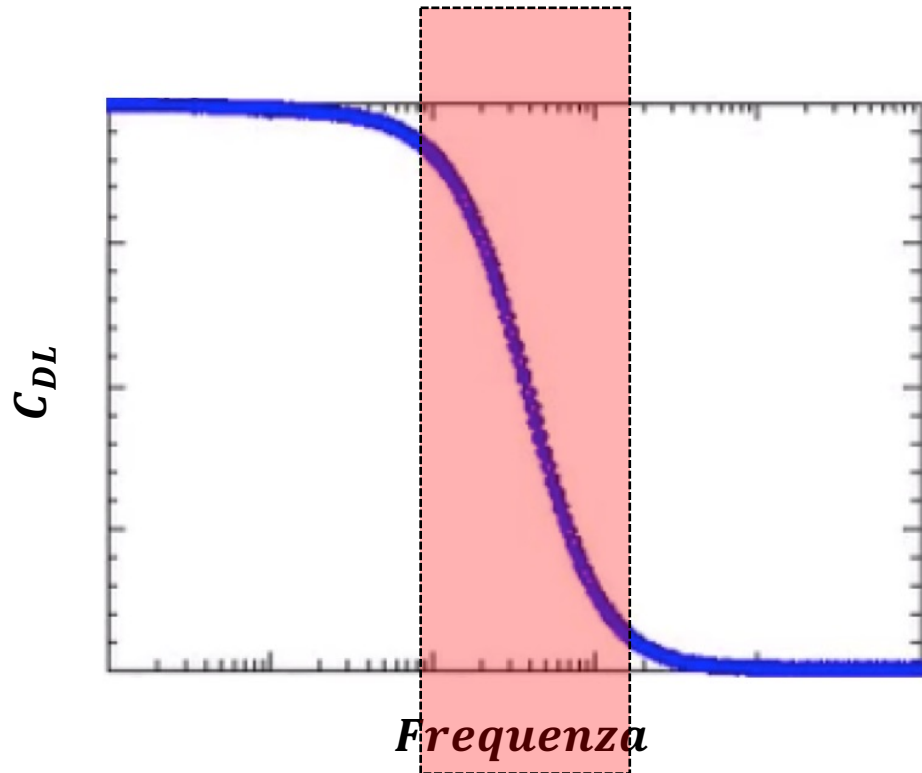
# De-screening ad alta frequenza

Per **basse frequenza**, il sistema si comporta come nel caso inizialmente affrontato e **il potenziale varierà esponenzialmente** con la distanza.



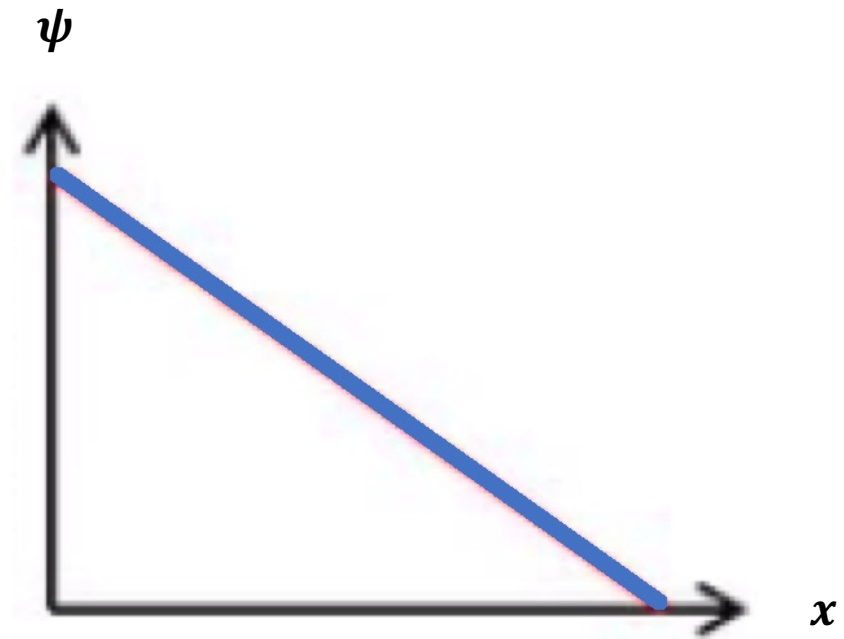
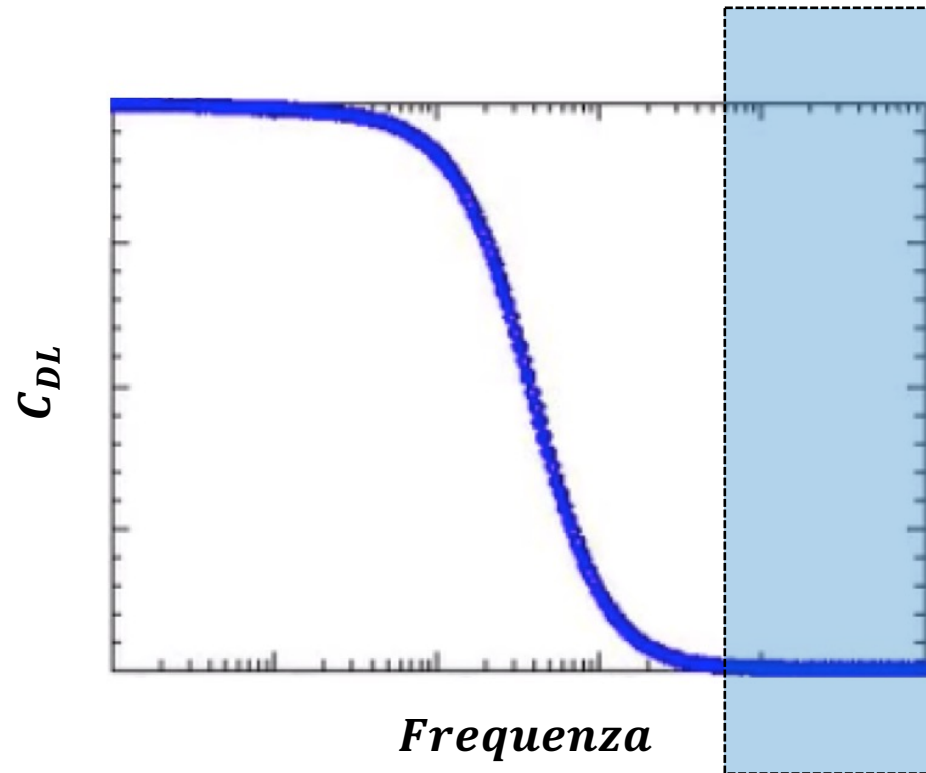
# De-screening ad alta frequenza

Per frequenze **attorno alla frequenza critica**, il peso di  $C_{DL}$  comincerà a diminuire sensibilmente e il sensore comincerà a vedere cariche presenti un po' oltre la lunghezza di Debye iniziale.



# De-screening ad alta frequenza

Per frequenza oltre la frequenza critica, **la serie è dominata dalla resistenza della soluzione.** L'effetto di screening è **soppresso** e il campo varia linearmente con la distanza.



# De-screening ad alta frequenza

In che modo la **concentrazione del sale e la sua composizione influenza la scelta della frequenza**? Dalla risoluzione dell'**equazione di Poisson** (che non verrà trattata in questo corso) nel caso più generale è possibile derivare la seguente espressione per la capacità di double layer:

$$C_{DL} = \frac{\varepsilon_W \varepsilon_0}{L_D}$$
$$L_D^2 = \frac{\varepsilon_W \varepsilon_0 k_B T}{2 N_{av} I_0 (zq)^2}$$
$$C_{DL} = \sqrt{\frac{2q^2 \varepsilon_W \varepsilon_0 N_{av} I_0}{k_B T}} \cosh\left(\frac{q\psi}{k_B T}\right)$$

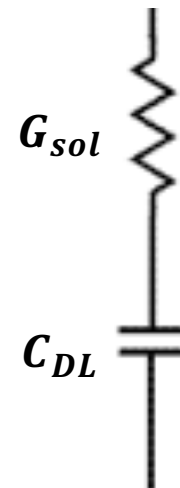
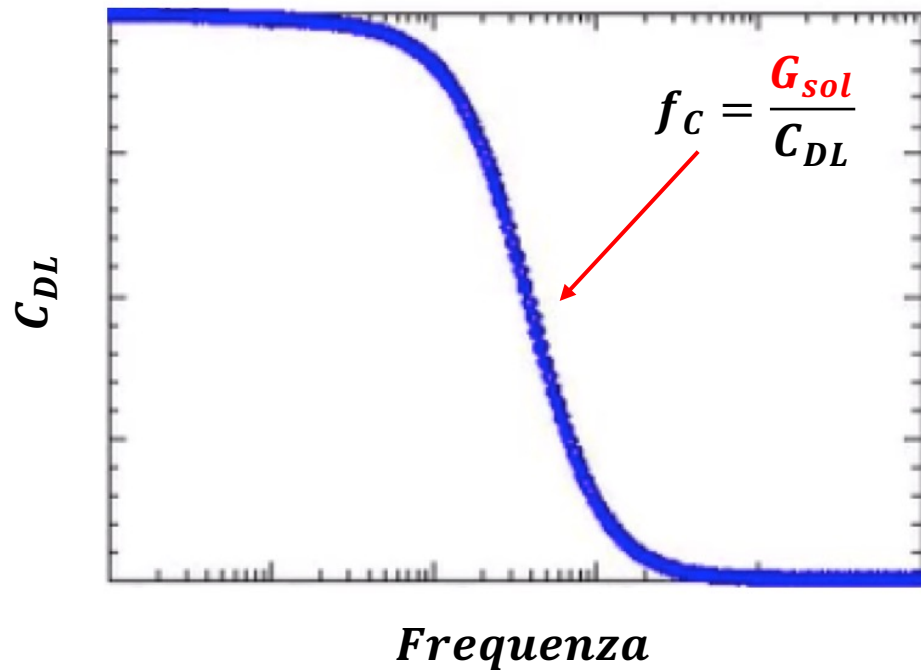
con  $N_{av}$  numero di Avogadro e  $I_0$  forza ionica della soluzione. La conducibilità dell'elettrolita può anch'essa venire espressa in termini di forza ionica della soluzione, in particolare:

$$G_{sol} \propto q N_{av} I_0 \mu_{TOT}$$

Con  $\mu_{TOT}$  mobilità degli ioni.  $\mu_{TOT}$  è data dalla somma delle mobilità degli ioni in gioco ( $\mu_{Na^+}$  e  $\mu_{Cl^-}$  nel nostro esempio).

# De-screening ad alta frequenza

Come visto, la conduttanza dipende dalla **mobilità degli ioni**, la quale è ovviamente **legata alla loro massa**. Maggiori sono le dimensioni degli ioni (e dunque la loro massa), minore sarà la mobilità e dunque, a parità di  $C_{DL}$ , più bassa sarà la frequenza necessaria per eliminare lo screening.



$$G_{sol} \propto I_0 \mu$$

$$C_{DL} \propto \sqrt{I_0}$$

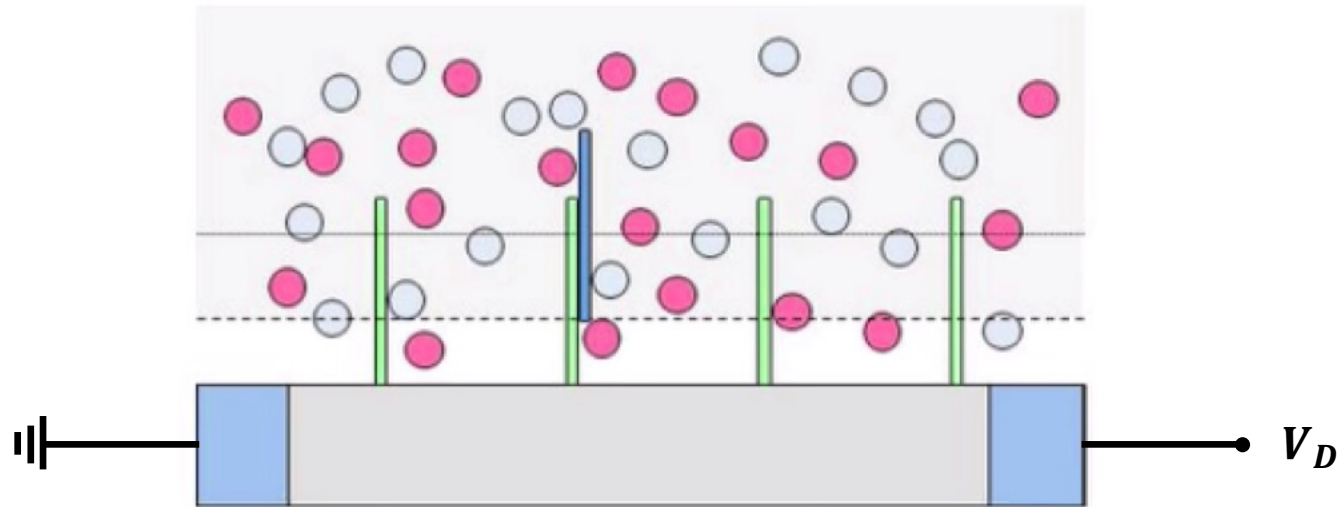
$$f_c \propto \sqrt{I_0}, \mu$$

# De-screening ad alta frequenza

Un valore tipico di frequenza utilizzata per il de-screening è 1 MHz per concentrazioni saline intorno ai 100 mM, che è considerato un valore accettabile per applicazioni biosensoristiche. Ma come è effettuato nella pratica il de-screening? Un metodo può essere l'applicazione di una  $V_D$  del tipo:

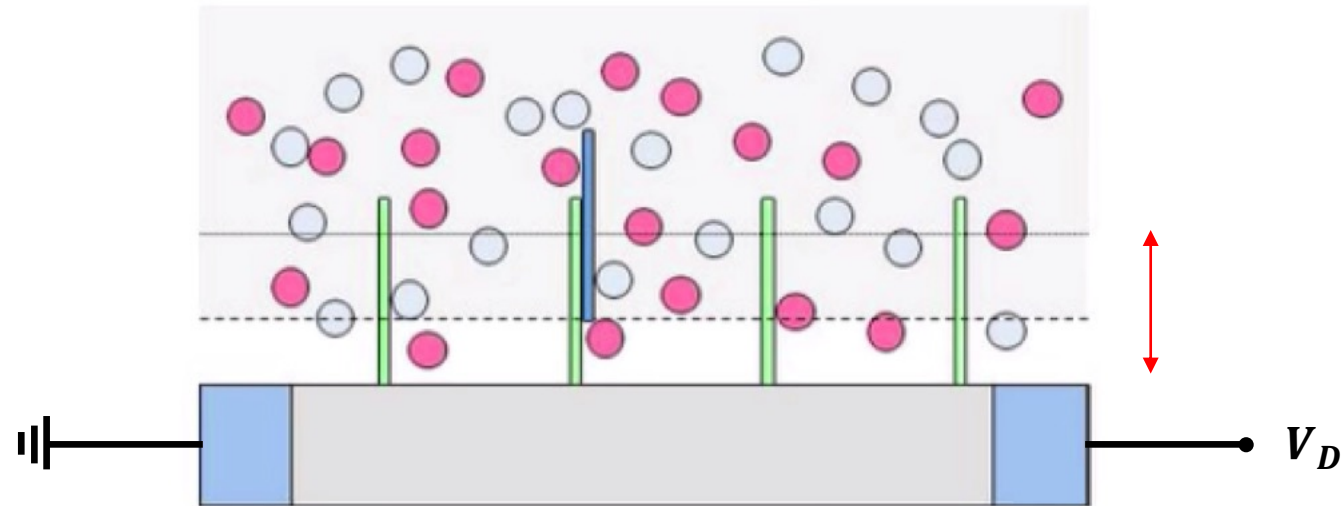
$$V_D = v_{ac} [1 + m \cos(\omega_m t)] \cos(\omega_c t)$$

con  $v_{ac}$  e  $\omega_c$  ampiezza e frequenza dell'onda portante e  $m$  e  $\omega_m$  ampiezza e frequenza dell'onda modulante.



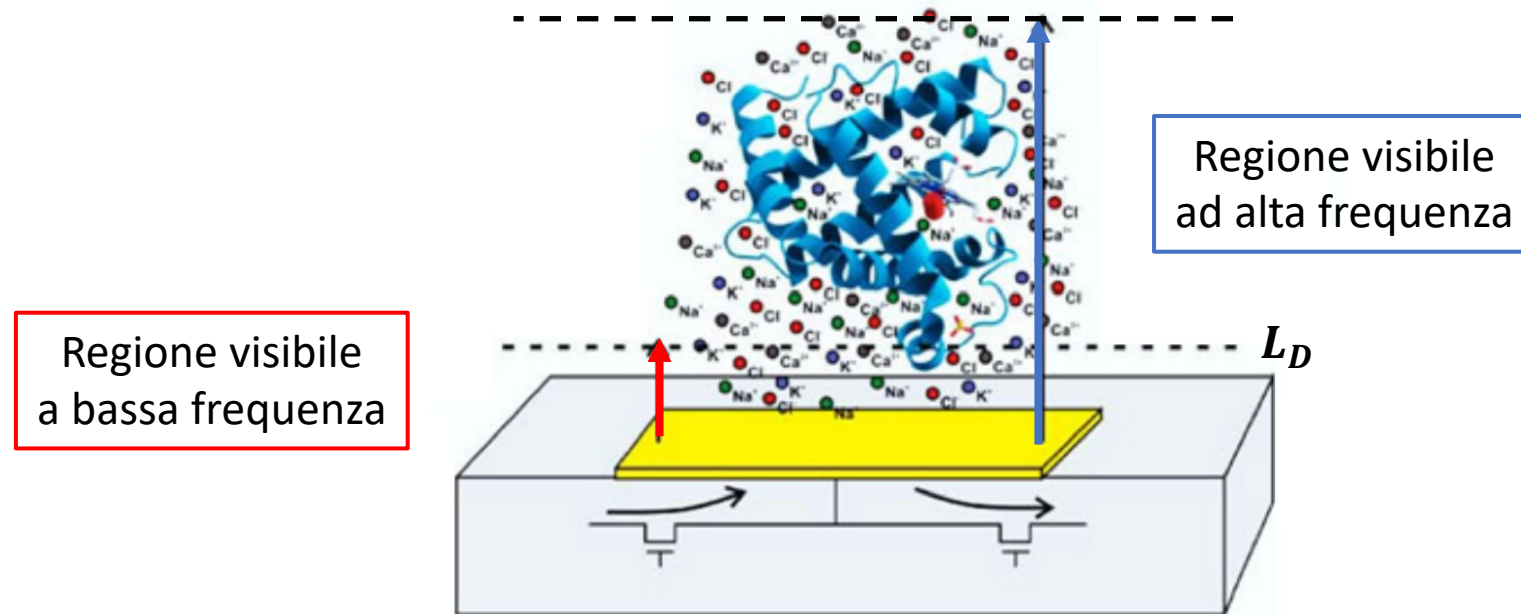
# De-screening ad alta frequenza

A frequenze intorno al MHz (o maggiori), **gli ioni non riusciranno a seguire il segnale modulante** i quali rimarranno fermi a differenza degli **elettroni** nelle molecole di DNA che invece, avendo mobilità più alte in virtù della minore massa, **potranno seguire il segnale modulante..**



# De-screening ad alta frequenza

Il fenomeno di de-screening permette di **estendere la regione all'interno della quale il sensore può rilevare la carica**, allargando dunque la regione precedentemente definita dalla lunghezza di Debye.



# Come affrontare lo screening - conclusioni

---

Metodo per aggirare il problema dello screening della carica nei sensori potenziometrici.

## **De-screening ad alte frequenze**

**PRO:** permette di **aumentare considerevolmente la lunghezza di Debye.**

**CONTRO:** Utilizzare circuiti che lavorano ad alte frequenza **spesso non è una soluzione pratica,** specialmente per applicazioni biosensoristiche point-of-care.

# Superamento del limite di Nernst

Un altro possibile modo per **aggirare** (non risolvere) il problema della perdita di sensibilità dovuta allo screening è basato **sul "superamento" del limite di Nernst utilizzando particolari strutture**. Rivediamo il concetto di limite di Nernst per un ISFET:

$$V_{FBISFET} = V_{FBMOSFET} + E_{ref} + \varphi_{ij} + \chi_e + \varphi_{eo} - \phi_M$$

$$\varphi_{eo} = 2.3 \frac{kT}{q} (pH_{sup} - pH_{bulk})$$

$$[H^+]_S = [H^+]_B e^{-q\varphi_{eo}/k_B T}; \quad [H^+]_B = e^{-2.303pH}$$

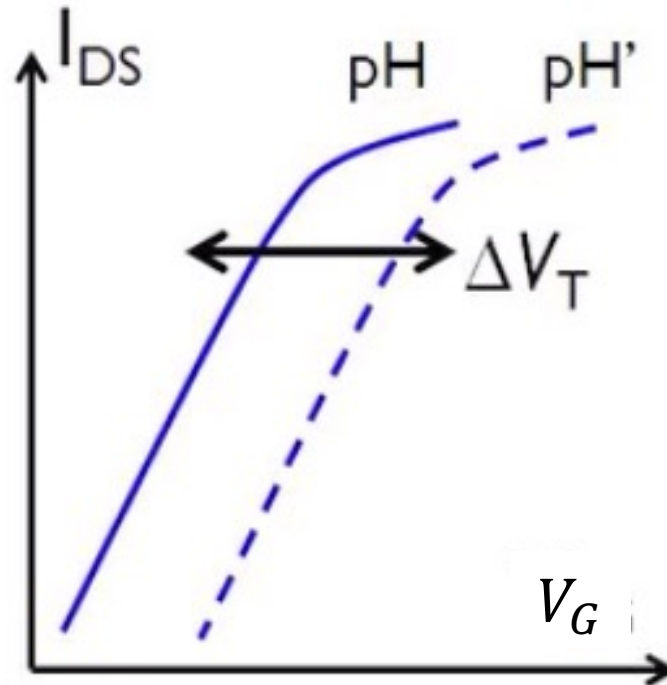
$$[H^+]_S = e^{-2.303pH - q\varphi_{eo}/k_B T}$$

$$\frac{\Delta V_{TH}}{\Delta pH} = 59 \left[ \frac{mV}{pH} \right]$$

# Transistor a doppio gate

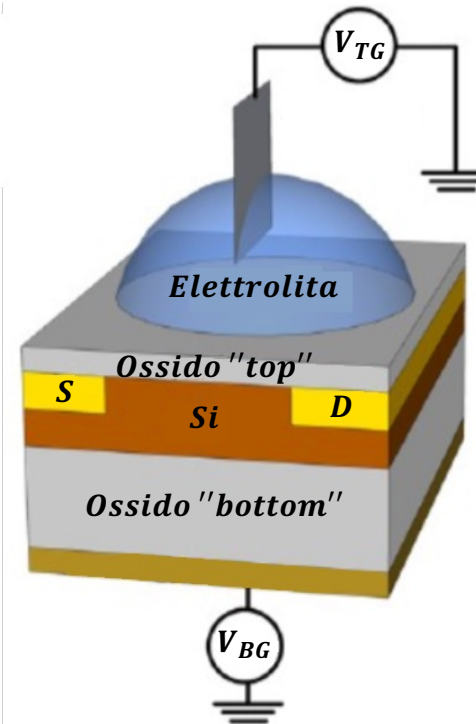
Dunque è possibile dire che la variazione di un punto di pH corrisponde all'applicazione di 59 mV al gate:

$$\frac{\Delta V_G}{\Delta pH} = 59 \left[ \frac{mV}{pH} \right]$$



# Transistor a doppio gate

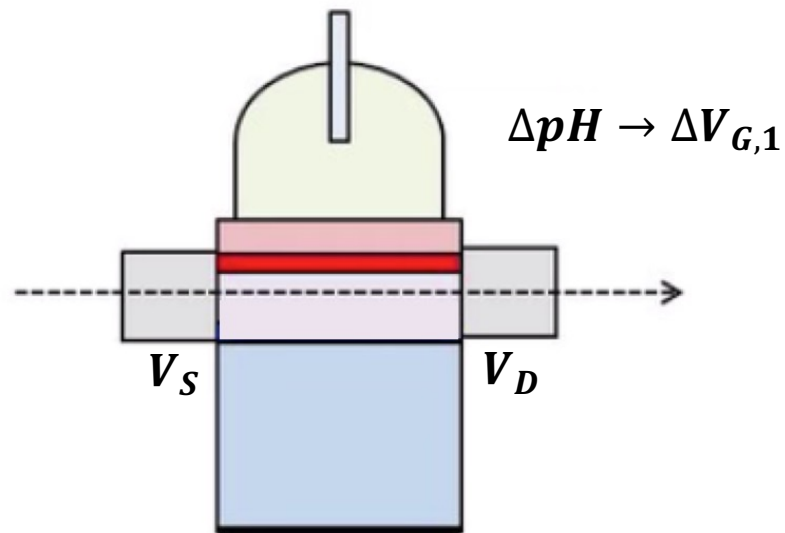
Questo per quanto riguarda un normale ISFET. È però possibile sfruttare la fisica del dispositivo in modo da ottenere una risposta superiore a quella imposta dal limite di Nernst, di fatto **amplificando la sua sensibilità al pH**. Questo è possibile utilizzando dispositivi cosiddetti "double-gated", che presentano cioè due gate.



# Transistor a doppio gate

Supponiamo di **variare il pH della soluzione**. In questo modo indurremo una carica nel canale che farà variare la tensione di soglia e di conseguenza la corrente del transistor nel canale superiore. Questo può essere visto come **l'applicazione al gate superiore di una  $\Delta V_{G,1}$** :

$$\Delta I_{D, TOP} = \mu_1 C_{ox, TOP} \left( \frac{W}{L} \right)_1 V_{DS} \Delta V_{G,1}$$

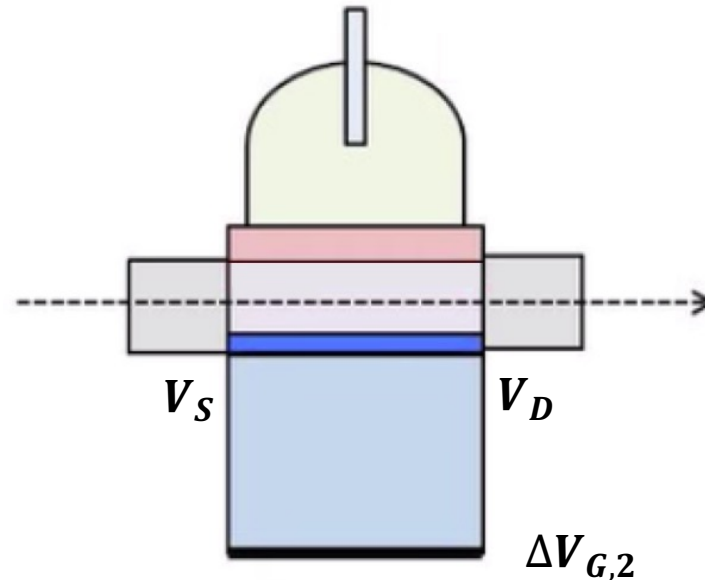


# Transistor a doppio gate

---

Applicando invece una  $\Delta V_{G,2}$  al gate inferiore indurremo una corrente nel canale pari a:

$$\Delta I_{D,BOTTOM} = \mu_1 C_{ox,BOTTOM} \left( \frac{W}{L} \right)_1 V_{DS} \Delta V_{G,2}$$



# Transistor a doppio gate

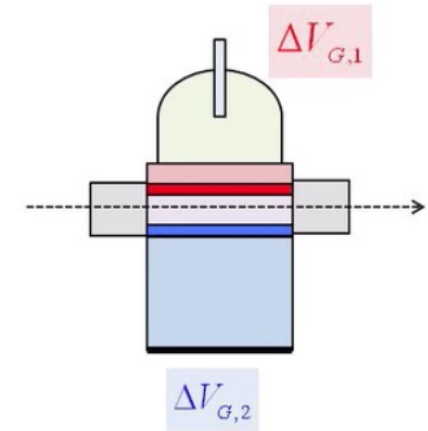
La corrente nel canale è ovviamente una. Scegliendo opportunamente  $\Delta V_{G,2}$  possiamo controbilanciare le variazioni indotte dal pH e fare in modo che la variazione della corrente totale del transistor sia nulla (la  $\Delta I_D$ , non la  $I_D$  ovviamente). In altre parole **fissiamo la  $I_D$  e misuriamo le variazioni di potenziale di bottom gate**.

$$\Delta I_D = \Delta I_{D, TOP} + \Delta I_{D, BOTTOM} = 0$$

La  $\Delta V_{G,2}$  necessario per ottenere questo scenario sarebbe:

$$\Delta pH \rightarrow \Delta V_{G,1}$$

$$\left| \frac{\Delta V_{G,2}}{\Delta V_{G,1}} \right| = \left| \frac{\Delta V_{G,2}}{\Delta pH} \right| = 59 \frac{mV}{pH} \times \left( \frac{C_{ox, TOP}}{C_{ox, BOTTOM}} \right)$$



Dunque se si polarizza il sistema dal bottom gate e si **mantiene costante la corrente di uscita**, una qualunque variazione indotta sul top viene amplificata di un fattore pari al rapporto tra le capacità di top gate e di bottom gate, dato che  $C_{ox, BOTTOM}$  è tipicamente molto più piccola di  $C_{ox, TOP}$ .

# Transistor a doppio gate

---

Come siamo arrivati a questa relazione?

$$\left| \frac{\Delta V_{G,2}}{\Delta pH} \right| = 59 \frac{mV}{pH} \times \left( \frac{C_{ox, TOP}}{C_{ox, BOTTOM}} \right)$$

Siamo a corrente costante dunque:

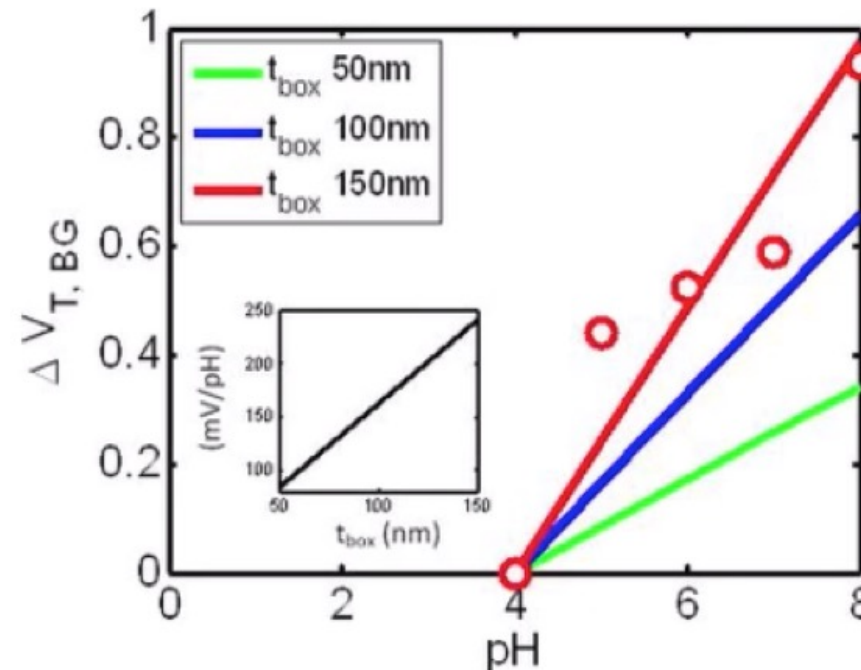
$$\begin{aligned} \Delta I_D &= \Delta I_{D, TOP} + \Delta I_{D, BOTTOM} = 0 \\ \mu_1 C_{ox, TOP} \left( \frac{W}{L} \right)_1 V_{DS} \Delta V_{G,1} &= -\mu_1 C_{ox, BOTTOM} \left( \frac{W}{L} \right)_2 V_{DS} \Delta V_{G,2} \\ \Delta V_{G,2} &= -\frac{C_{ox, TOP}}{C_{ox, BOTTOM}} \Delta V_{G,1} \end{aligned}$$

Considerando la  $\Delta V_{G,1}$  provocata dalla variazione di una unità di pH sulla superficie avremo, nel migliore dei casi, una variazione di 59 mV/pH.

# Transistor a doppio gate

Nel caso della configurazione esaminata fino ad ora, la variazione  $\Delta V_{G,2}$  associata ad una variazione  $\Delta V_{G,1}$  (che come detto prima è possibile associare ad una relativa variazione di pH della soluzione, o comunque di potenziale superficiale) si riduce a:

$$\left| \frac{\Delta V_{G,2}}{\Delta pH} \right| = 59 \frac{mV}{pH} \times \left( \frac{C_{ox, TOP}}{C_{ox, BOTTOM}} \right) = 59 \frac{mV}{pH} \times \left( \frac{T_{ox, BOTTOM}}{T_{ox, TOP}} \right) \leftarrow \text{Spessore dei due ossidi}$$



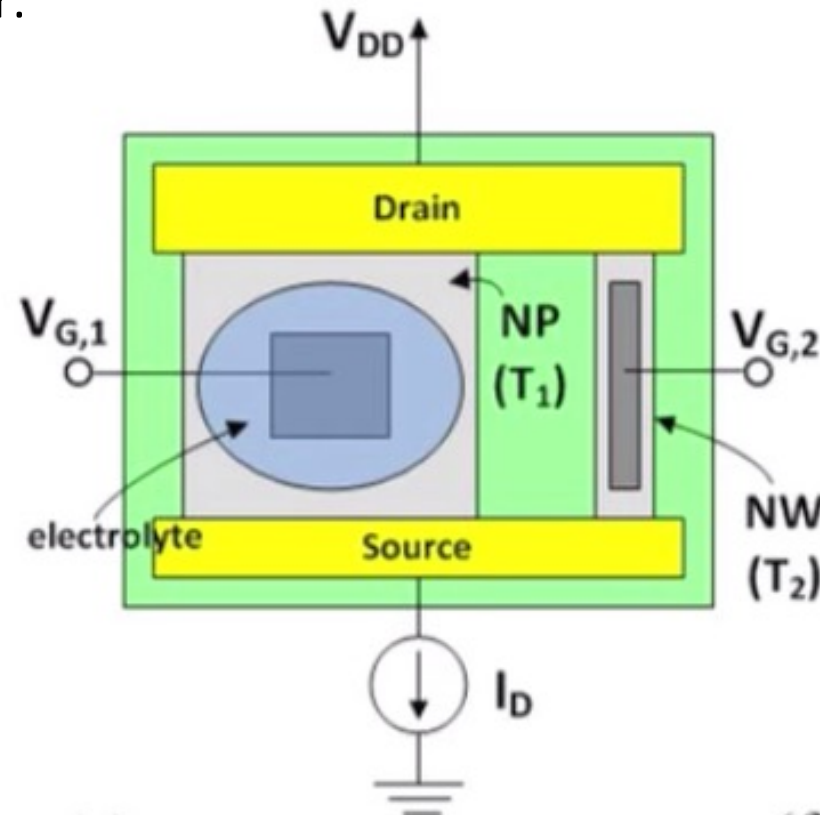
# Transistor a doppio gate

La configurazione di base può però essere modificata in modo da ottimizzare l'effetto di amplificazione. Un possibile approccio può essere basato **sull'utilizzo di un ISFET planare insieme, per esempio, ad un NWFET**. In questo modo non solo si può sfruttare lo spessore dell'ossido di gate ma anche le differenze nelle dimensioni e nei materiali dei due transistor:

$$\Delta I_{D,1} = \mu_1 C_{ox,1} \left(\frac{W}{L}\right)_1 V_{DS} \Delta V_{G,1}$$

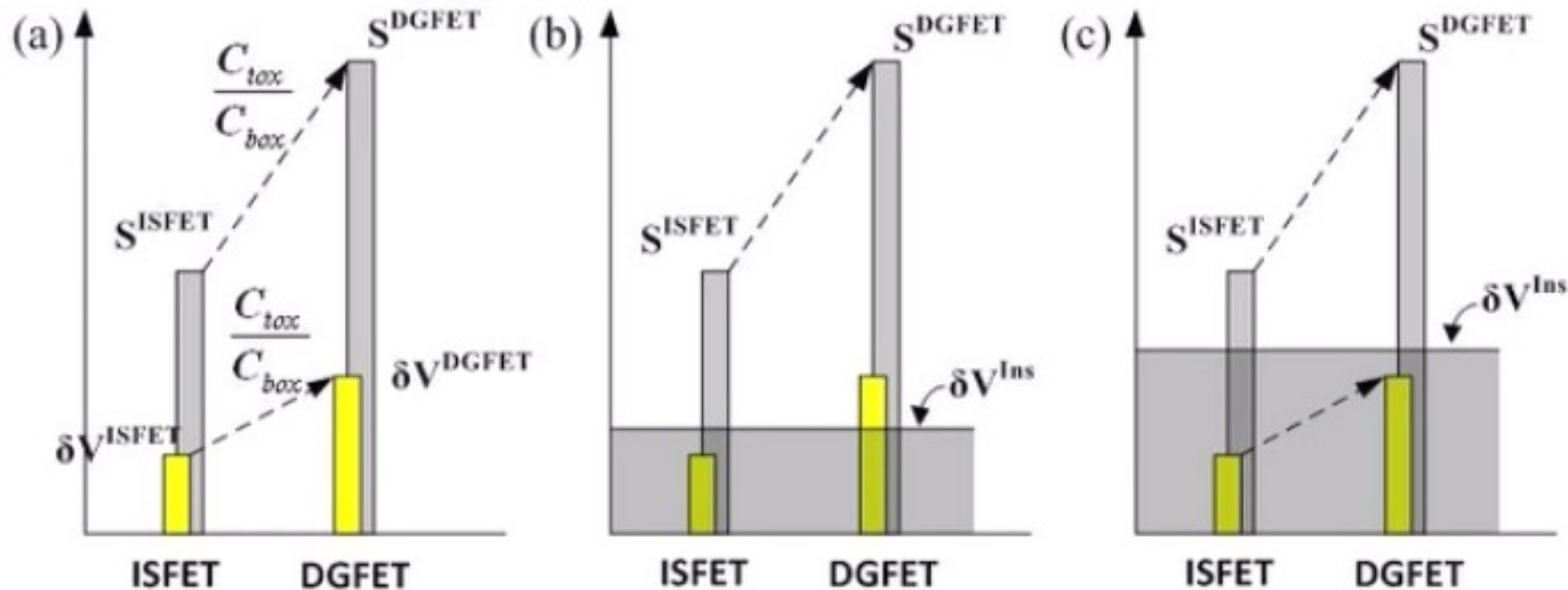
$$\Delta I_{D,2} = \mu_2 C_{ox,2} \left(\frac{W}{L}\right)_2 V_{DS} \Delta V_{G,2}$$

$$\frac{\Delta V_{G,1}}{\Delta V_{G,2}} = \left(\frac{\mu_1 \left(\frac{W}{L}\right)_1}{\mu_2 \left(\frac{W}{L}\right)_2}\right) \frac{C_{ox,1}}{C_{ox,2}}$$



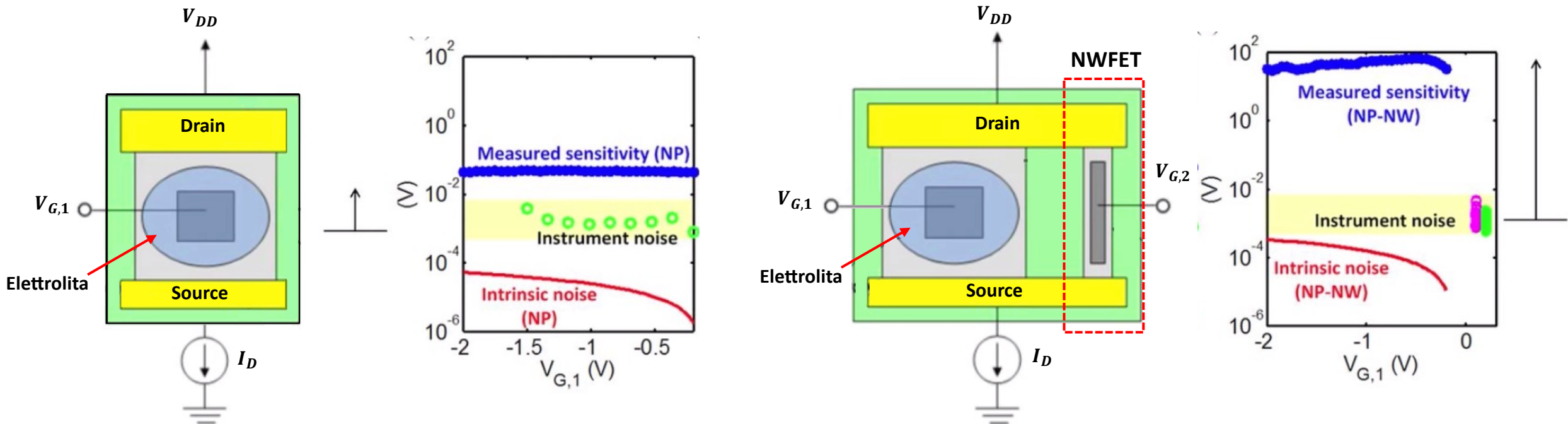
# Transistor a doppio gate

Dunque questo metodo permette facilmente di superare il limite di Nernst...**NO**. Infatti con questo approccio il rumore viene amplificato insieme al segnale e **dunque il rapporto segnale rumore rimane sostanzialmente invariato**. Qual è allora il vantaggio? Se il **rumore del sistema è dominato dalla strumentazione** utilizzata (è spesso questo il caso) il rapporto segnale rumore effettivo (il segnale che “svetta” sopra la zona grigia che descrive il livello di rumore del sistema) in questo caso può aumentare considerevolmente.



# Transistor a doppio gate

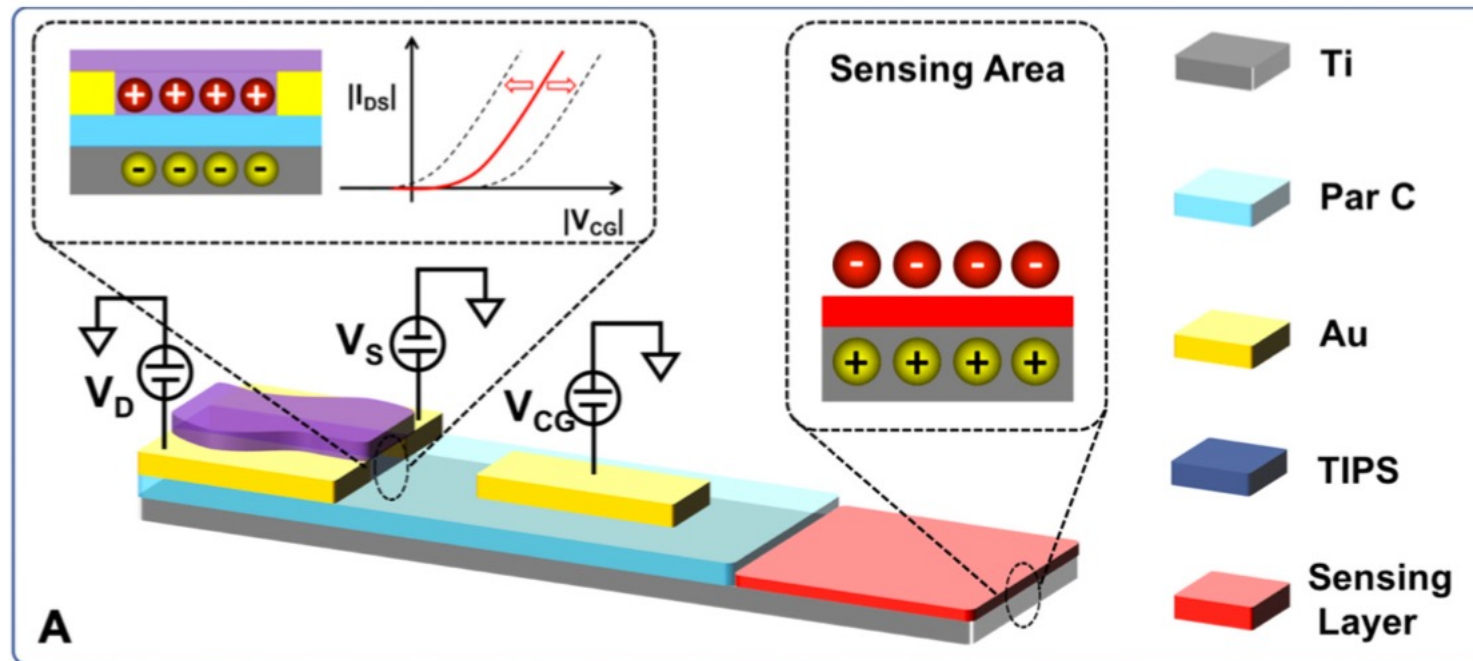
Dunque questo metodo permette facilmente di superare il limite di Nernst...**NO**. Infatti con questo approccio il rumore viene amplificato insieme al segnale e **dunque il rapporto segnale rumore rimane sostanzialmente invariato**. Qual è allora il vantaggio? Se il **rumore del sistema è dominato dalla strumentazione** utilizzata (è spesso questo il caso) il rapporto segnale rumore effettivo (il segnale che “svetta” sopra la zona grigia che descrive il livello di rumore del sistema) in questo caso può aumentare considerevolmente.



# Transistor a doppio gate

Esempio di sensore **supernernstiano**: l'OCMFET per il sensing di pH

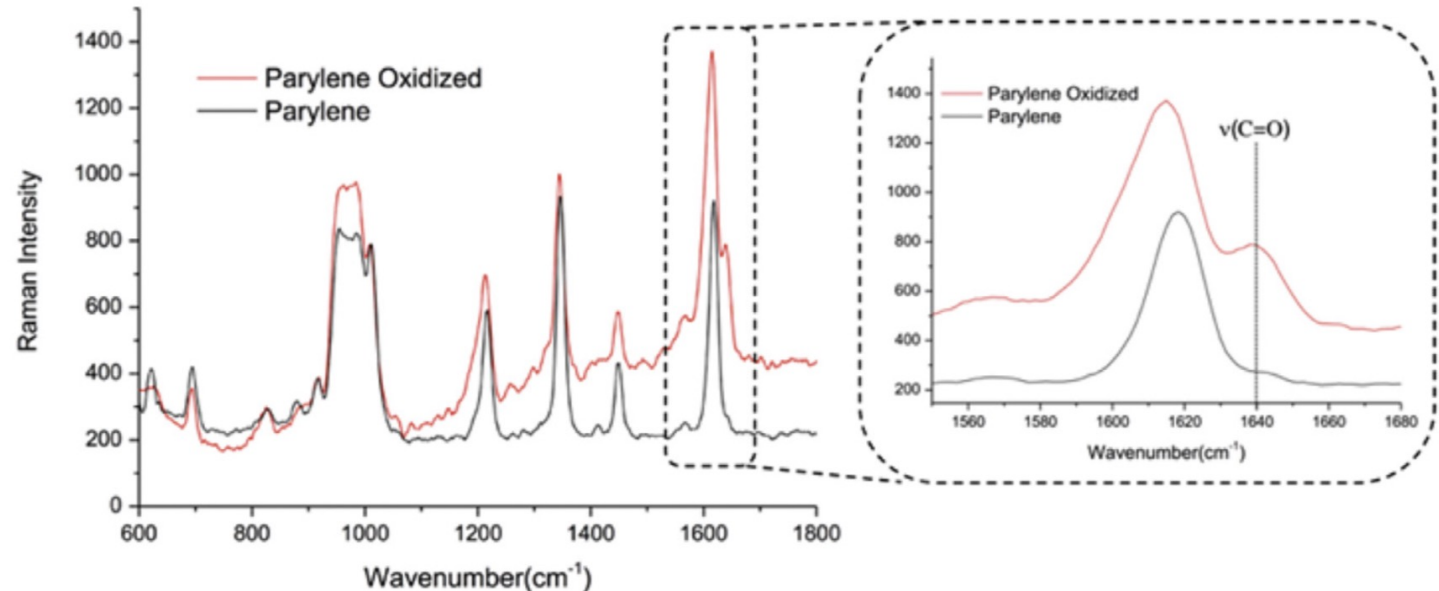
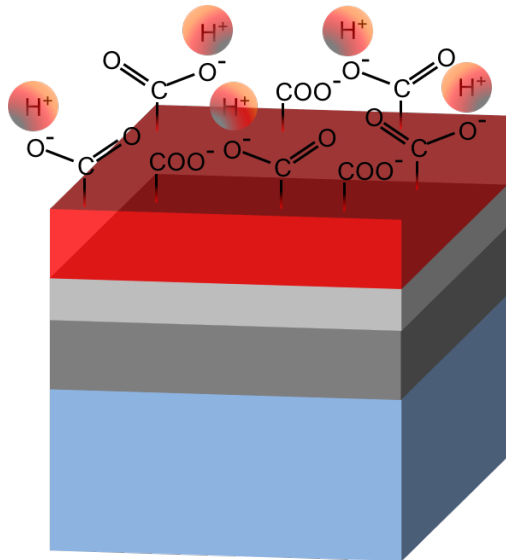
L'OCMFET, come abbiamo visto, è un particolare transistor organico che presenta una struttura a doppio gate. **Grazie alla sua particolare struttura può essere trasformato in un sensore di pH ultra sensibile.**



# Transistor a doppio gate

Esempio di sensore **supernernstiano**: l'OCMFET per il sensing di pH

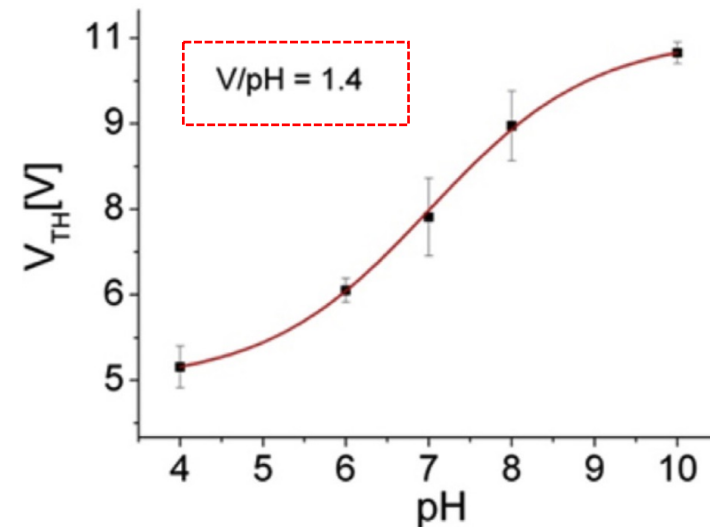
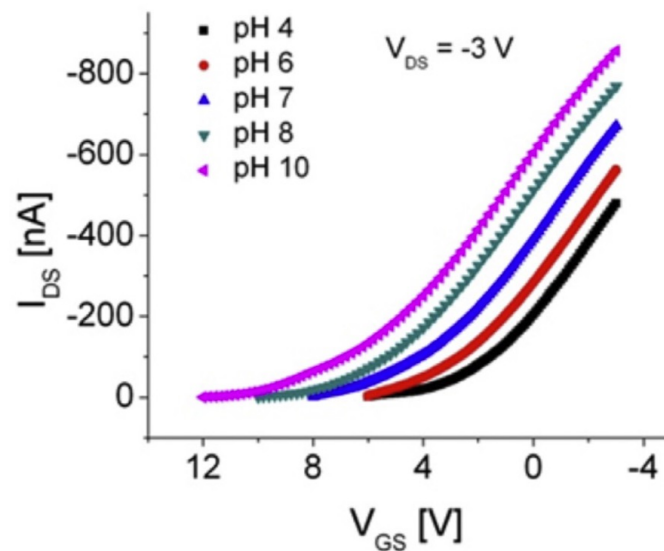
In questo caso il sensing layer è costituito da un layer polimerico opportunamente funzionalizzato in modo da esporre gruppi funzionali che potessero essere protonati e deprotonati in funzione del pH del bulk della soluzione. **Funzionalizzazione fisica**.



# Transistor a doppio gate

Esempio di sensore **supernernstiano**: l'OCMFET per il sensing di pH

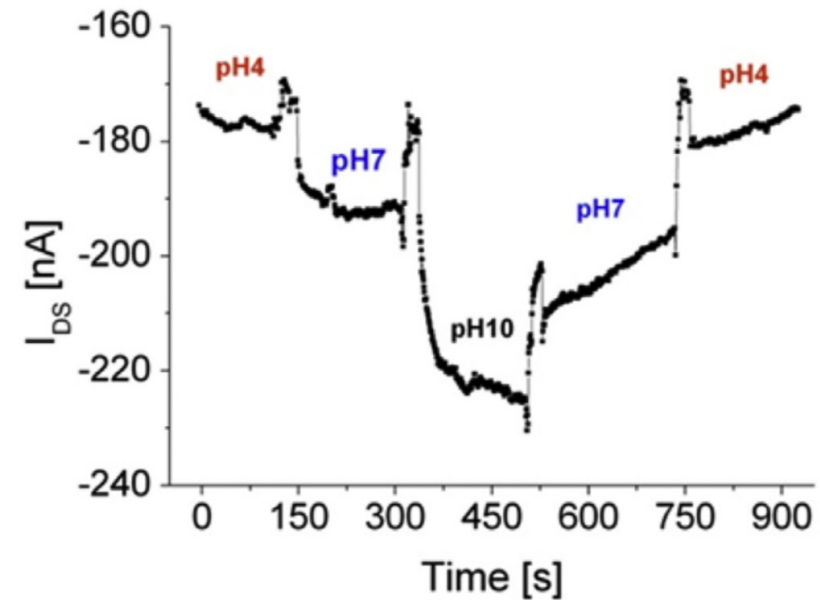
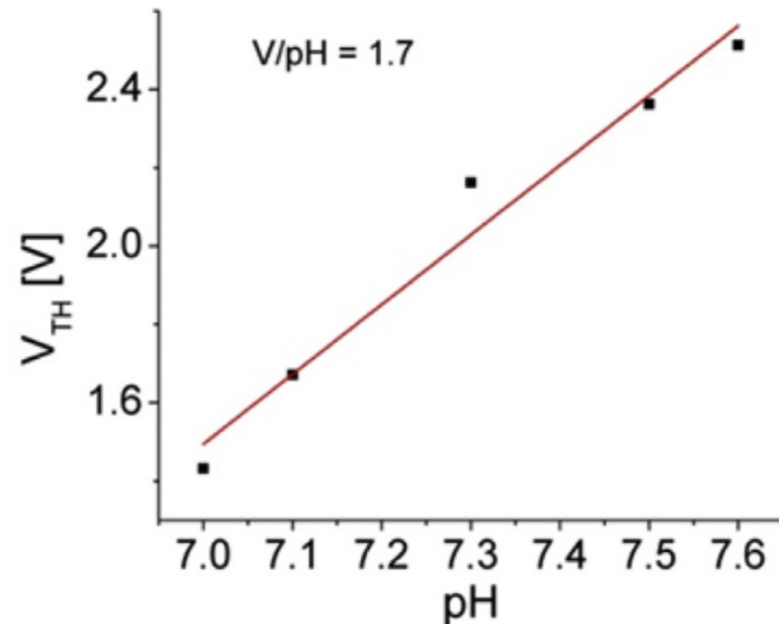
Il sensore è stato **tarato** misurando lo **shift della tensione di soglia del dispositivo** in seguito all'aggiunta di **soluzioni a pH noto nella zona dell'area sensibile**. La sensibilità è stata calcolata come la **pendenza della retta ai minimi quadrati** estrapolata in zona lineare (il sensore mostra un comportamento sigmoidale). In che modo varia la tensione di soglia in funzione del pH?



# Transistor a doppio gate

Esempio di sensore **supernernstiano**: l'OCMFET per il sensing di pH

Due importanti aspetti del sensore sono, oltre ovviamente la sensibilità supernernstiana, la linearità nella zona di interesse per applicazioni cellulari (6.8, 7.8) e la possibilità di rilevare variazioni di pH nel tempo.



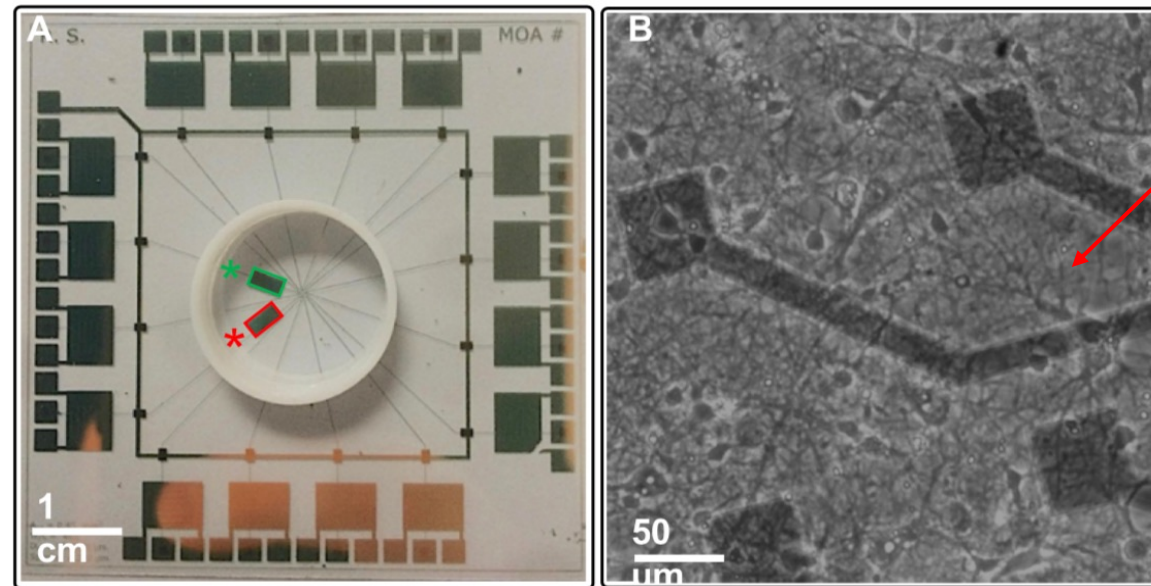
# Transistor a doppio gate

Esempio di sensore **supernernstiano**: l'OCMFET per il sensing di pH

Una delle applicazioni d'interesse è infatti il **monitoraggio dell'attività metabolica neuronale per applicazioni farmacologiche**.

OCMFET sensibile al pH

OCMFET identico ma  
NON sensibile al pH

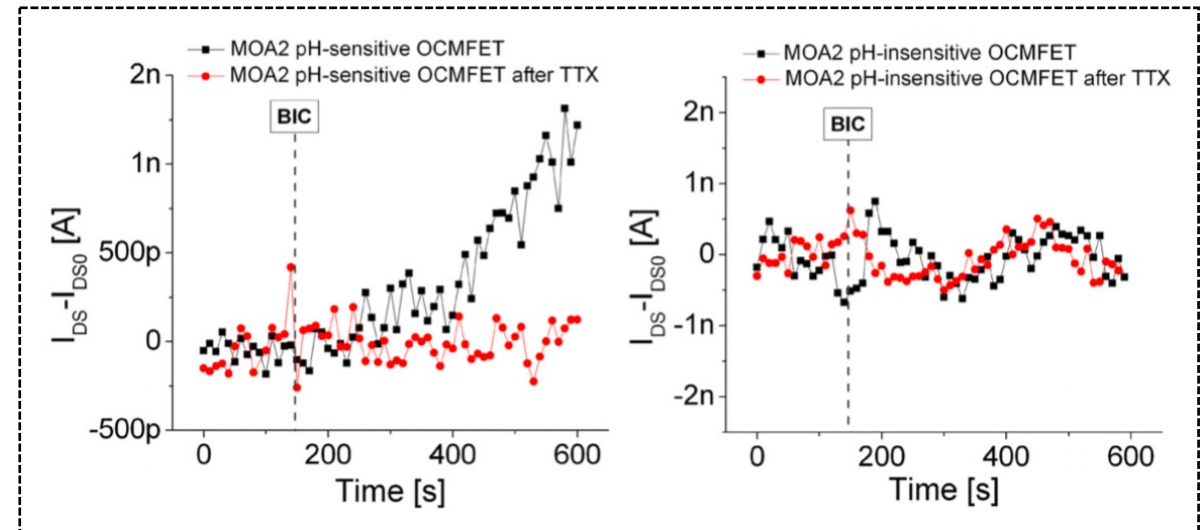
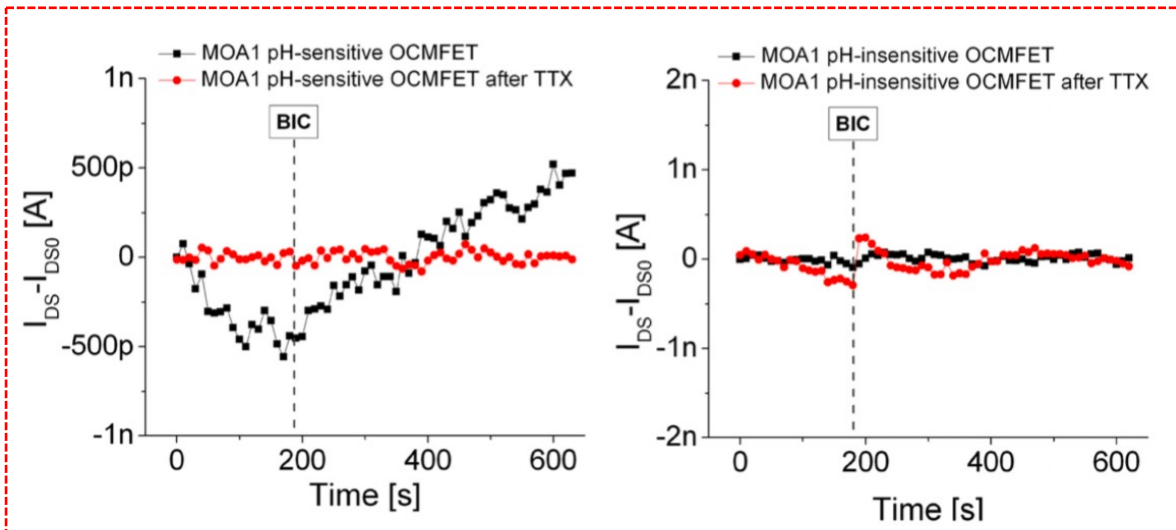


Neuroni ippocampali di ratto  
(coltura primaria DIV15)

# Transistor a doppio gate

Esempio di sensore **supernernstiano**: l'OCMFET per il sensing di pH

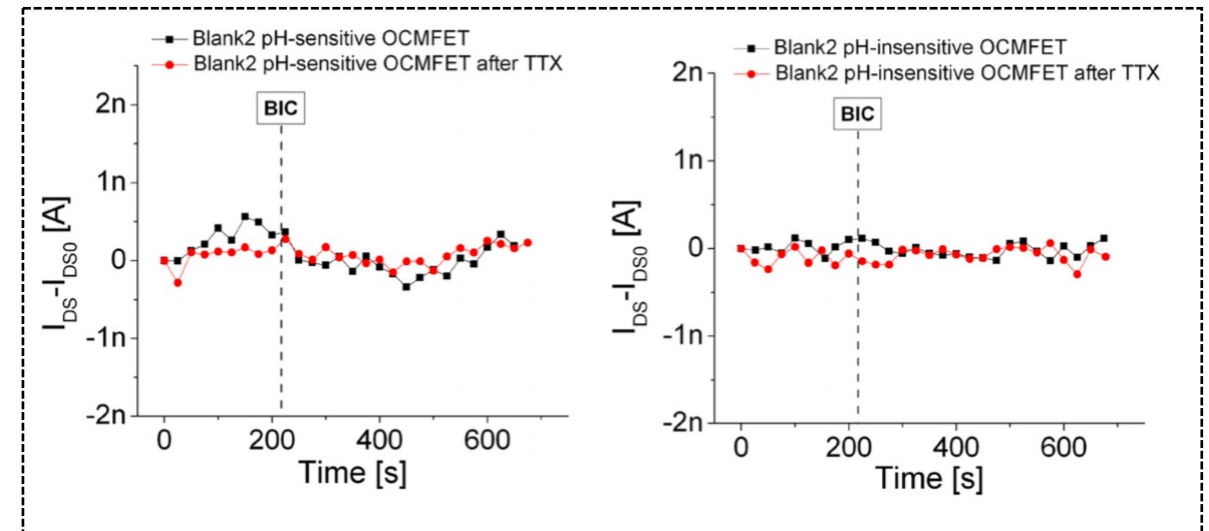
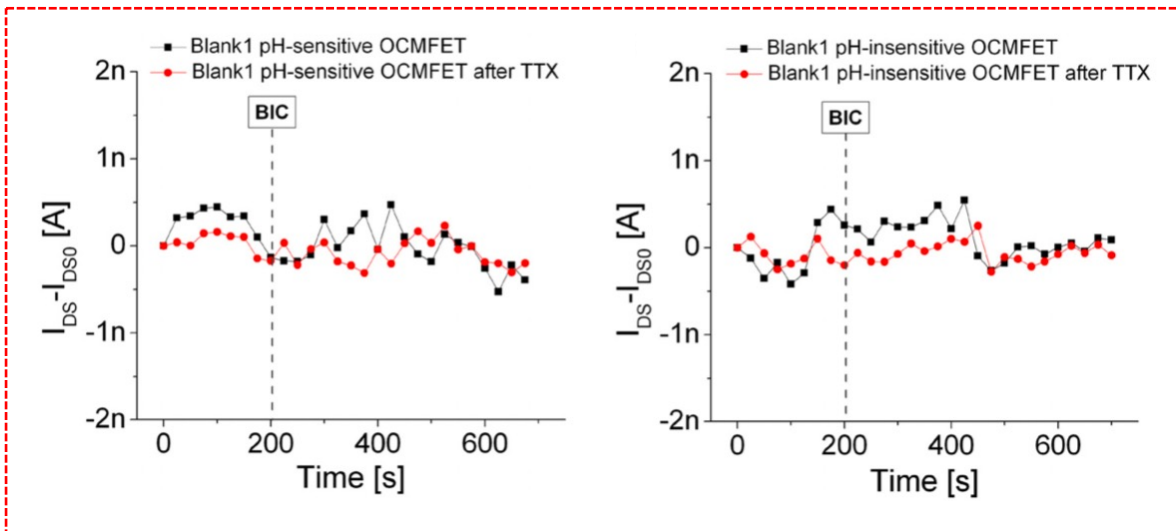
La possibilità di rilevare l'attività neuronale è stata dimostrata monitorando **l'acidificazione del liquido extracellulare indotta dal metabolismo** in due differenti stati metabolici: uno stato ad alto metabolismo (mediato dal farmaco BIC) e uno stato a basso metabolismo (indotto con la tossina TTX).



# Transistor a doppio gate

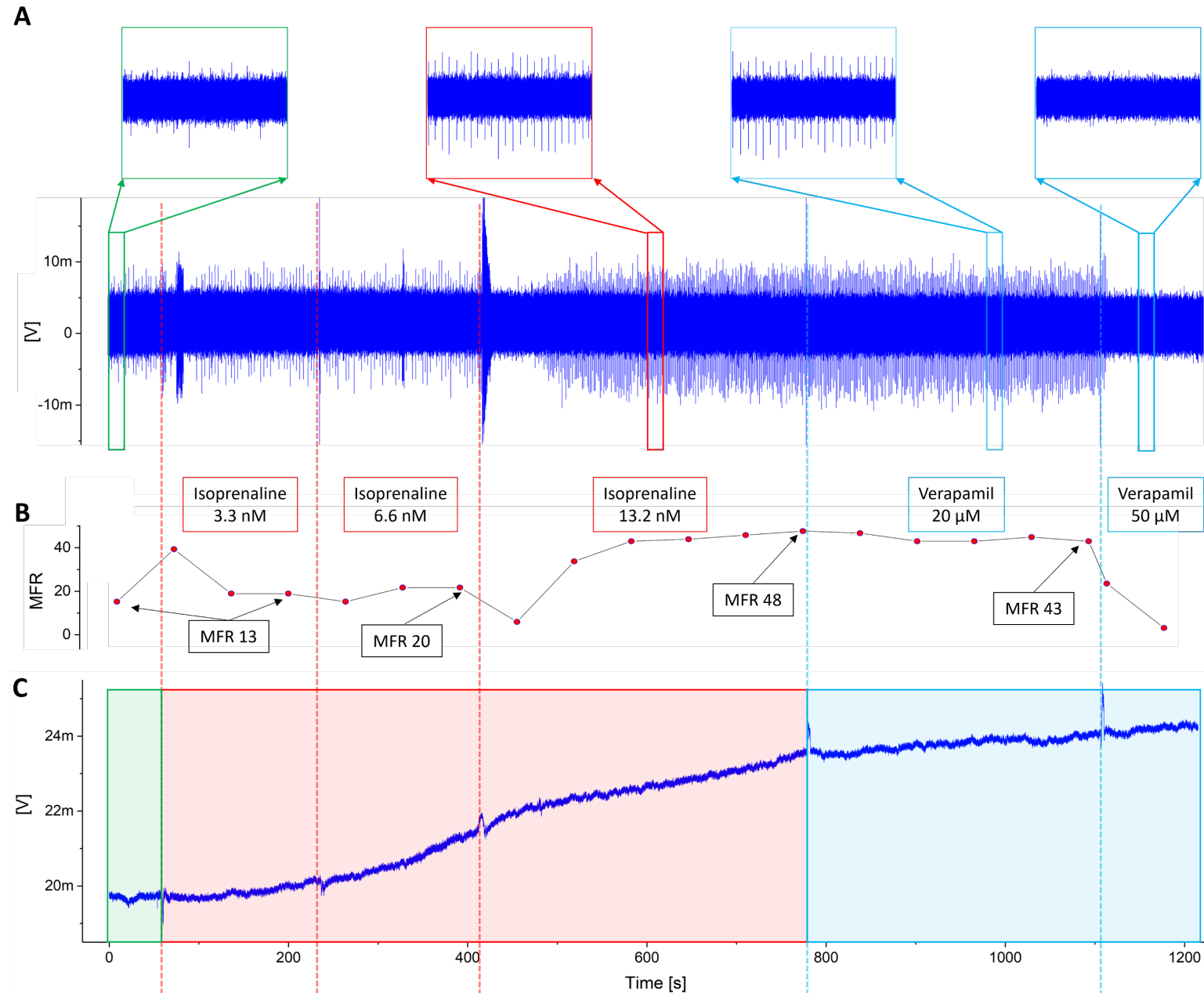
Esempio di sensore superernstiano: l'OCMFET per il sensing di pH

Un importante parte di ogni esperimento atto a validare un nuovo dispositivo prevede l'utilizzo dei cosiddetti **blank** (bianchi). In questo caso lo stesso protocollo sperimentale (stesse identiche condizioni) è stato seguito su dei dispositivi identici a quelli utilizzati per gli esperimenti veri e propri ma senza la presenza delle cellule al fine di valutare eventuali risposte aspecifiche del sensore.



# Transistor a doppio gate

Misura **contemporanea** dell'attività elettrica e metabolica di una coltura cellulare.



# Superamento del limite di Nernst- conclusioni

---

“Superamento” del limite di Nernst:

Un possibile metodo è basato su un particolare dispositivo chiamato **double-gated FET**.

PRO: è un **metodo DC** e permette di ottenere **amplificazioni sostanziali del segnale** indotto dalla presenza di una carica superficiale.

CONTRO: aggira il problema (**non c'è reale superamento del limite di Nernst**) e presenta un reale **vantaggio solo nei casi in cui il sistema sia limitato dal rumore della strumentazione**.