



POLITECNICO
MILANO 1863

SCUOLA DI INGEGNERIA INDUSTRIALE
E DELL'INFORMAZIONE

Studio e caratterizzazione di un sensore spettrometrico per applicazioni biomedicali

TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN
ELECTRONICS ENGINEERING - INGEGNERIA ELETTRONICA

Author: **Antonino Marra**

Student ID: 919605

Advisor: Prof. Marco Carminati

Co-advisor: Ing. Lillo Raia

Academic Year: 2021-22

*Alla mia famiglia, che mi ha sempre appoggiato.
A mia mamma, cui dedico
questo mio importante traguardo
e a Lorenzo,
che ci guardano da lassù!*

Abstract

During the past 2 years, due to the *Coronavirus* pandemic we have witnessed, there has been an exponential increase in the activity in the field of molecular biology, mainly due to the high number of tests or swabs, whether antigenic or molecular, which were performed on the entire population worldwide to confirm any possible infection with this virus.

The Lab On Chip, whose acronym is LoC, come into play in this field, which are miniaturized systems that replicate the functions normally performed in a real and proper laboratory, born and developed thanks to the continuous improvement of production technologies, fluidic systems and also electronics, which can be also a support to the biological/fluidic part for the sensing of the targets to be measured.

Returning to the example of the swabs mentioned above, it must be said that: in the event that they are antigenic ones, the LoC in question will be of the fluidic type, using for example the chromatography by capillarity on a test strip; while in the case of molecular swabs it can be carried out a fluorescence analysis, using cameras and then calling into question the electronics.

At this juncture *STMicroelectronics*, a leading company in the world for production of chips and ICs on *Silicon*, has pushed a lot on its *Q3-Plus* platform, thanks to which it can be possible to carry out analysis on biological samples using the technique of *PCR* and fluorescence detection.

In order to improve the performance of this system it was chosen to feature a new one hybrid spectrometric sensor, which could monitor its operation. Therefore the work carried out in this study consists of part linked to the sensor itself, to its use in the Q3-Plus system, to the results obtained and to the comparison with the results obtained with another instrument that is a spectrometer from the *OceanOptics* company.

Keywords: fluorescence, sensor, photodiode, spectrometer, filters

Abstract in lingua italiana

Durante questi ultimi 2 anni, a causa della pandemia di *Coronavirus* alla quale abbiamo assistito, si ha avuto un aumento esponenziale dell'attività nel campo della biologia molecolare, dovuta soprattutto all'elevato numero di test o tamponi, siano essi antigenici o molecolari, che sono stati eseguiti su tutta la popolazione mondiale per confermare un'eventuale infezione da tale virus.

In questo campo entrano in gioco i *Lab On Chip*, la cui sigla è *LoC*, che sono dei sistemi miniaturizzati che vanno a replicare delle funzioni normalmente svolte in un laboratorio vero e proprio che sono nati e si sono sviluppati grazie al continuo perfezionamento delle tecnologie produttive, dei sistemi fluidici e anche dell'elettronica, che può fare da supporto alla parte biologica e/o fluidica per il sensing dei target che si vogliono misurare.

Tornando all'esempio dei tamponi prima menzionati va detto che: nel caso in cui essi siano antigenici, il LoC in questione sarà di tipo fluidico, sfruttando ad esempio la cromatografia per capillarità su un striscia reattiva; mentre nel caso di tampone molecolare può essere svolta una analisi in fluorescenza, impiegando delle camere e chiamando in causa quindi l'elettronica.

In questo frangente ***STMicroelectronics***, azienda leader nel mondo per la produzione di chip e circuiti integrati su *Silicio*, ha spinto molto sulla sua piattaforma ***Q3-Plus***, grazie alla quale si possono effettuare delle analisi su campioni biologici sfruttando la tecnica della *PCR* e della rilevazione in fluorescenza.

Al fine di migliorare le prestazioni di questo sistema si è scelto di caratterizzare un nuovo sensore ibrido di tipo spettrometrico, che potesse monitorarne il funzionamento. Quindi il lavoro svolto si compone della parte di studio legata al sensore stesso, al suo impiego nel sistema Q3-Plus, ai risultati ottenuti ed al confronto con i risultati ottenuti con un altro strumento, spettrometro della *OceanOptics*.

Parole chiave: fluorescenza, sensore, fotodiodo, spettrometro, filtri

Indice

Abstract	i
Abstract in lingua italiana	iii
Indice	v
Introduzione	1
1 La tecnica PCR	5
1.1 La scoperta della PCR e le sue applicazioni	7
1.2 I passaggi e la dinamica della PCR	7
1.3 La Real-Time PCR	9
2 Uno strumento per la qPCR: il Q3-Plus	13
2.1 Le criticità della PCR	13
2.2 Il Q3-Plus	14
2.2.1 La parte termica	15
2.2.2 La parte ottica	19
2.3 Limitazioni del sistema Q3-Plus	21
2.3.1 Una possibile soluzione	22
3 Il Rainbow	23
3.1 Il fotodiodo	23
3.1.1 La lettura della corrente dal fotodiodo	31
3.2 Le caratteristiche del <i>Rainbow</i>	35
3.3 La struttura fisica	36
3.3.1 I 6 canali ottici	37
3.4 La comunicazione seriale	39
3.4.1 Gli OpCodes	40
3.5 I parametri del Rainbow	41

3.5.1	Il tempo di esposizione	42
3.5.2	L'Inter-Measurement Period	44
3.5.3	Il guadagno analogico	45
3.6	I valori di saturazione	46
3.7	Il rumore di buio	47
3.7.1	L'andamento del rumore in funzione della temperatura	54
3.8	I filtri ottici	56
3.9	Possibili usi	58
4	Risultati sperimentali	59
4.1	La caratterizzazione del <i>Rainbow</i>	61
4.1.1	Analog gain	61
4.1.2	I valori di saturazione	63
4.1.3	Il rumore di buio	64
4.1.4	Noise vs Temperature	70
4.1.5	Il trasferimento dei filtri ottici	73
4.2	I LED del Q3-Plus	77
4.2.1	La caratterizzazione dei LED	78
4.3	Effetti della temperatura sui LED	86
4.3.1	Le variazioni nel LED ambra	88
4.3.2	Le variazioni nel LED blu	92
4.4	La caratterizzazione dei filtri del Q3-Plus	96
4.5	Il Rainbow nel Q3-Plus	100
5	Il Rainbow come misuratore di pH	115
5.1	Il pH: definizione e applicazione	115
5.2	Le acquisizioni del pH	117
6	Conclusioni e sviluppi futuri	125
	Bibliografia	127
	A Appendice A	129
	Elenco delle figure	131
	Elenco delle tabelle	135

Lista dei Simboli	138
Ringraziamenti	141

Introduzione

L'elettronica di questi tempi è ormai una scienza davvero molto avanzata, che non solo è riuscita a trovare uno sbocco in molti altri campi applicativi, ma si è riuscita a fondersi ed integrarsi con essi.

Ai suoi albori l'elettronica è nata come la scienza e la tecnica riguardante l'emissione e la propagazione degli elettroni nel vuoto o nella materia. La possiamo definire una scienza poiché è una branca della fisica, in particolare dell'elettrologia: nata come branca dell'elettrotecnica è oggi intesa come disciplina a sé, e può essere definita come "*tecnica delle correnti deboli e di alta frequenza*" differendo dall'elettrotecnica che è invece "*la tecnica delle correnti forti e di bassa frequenza*".

Ma scaviamo un po' più a fondo, concentriamoci sul perché l'elettronica studia il movimento delle cariche nella materia e nel vuoto.

Ovviamente nei metalli sarebbe tutto più semplice, però spostandoci su materiali come i semiconduttori, ad esempio il *Silicio* che ormai è il materiale per eccellenza impiegato a livello produttivo insieme al *Gallio* ed altri materiali appositi, si deve pensare a tutti i processi e le tecniche di produzione, ed alla loro evoluzione, che portano ai risultati visibili e tangibili quotidianamente.

Le tecniche scoperte che hanno reso il silicio il centro dell'elettronica sono state davvero numerose e le principali sono state tutte di tipo produttivo, ossia legate al processo di produzione dei componenti elettronici.

Per tale motivo l'elettronica nel corso dei decenni si è evoluta sempre di più, perché lo sviluppo di queste tecniche produttive ha concesso di lavorare il silicio su una scala sempre più ristretta, in modo da poter realizzare più dispositivi su singola fetta o '*wafers*' in gergo tecnico.

Questo sviluppo si chiama '*miniaturizzazione*' e consente a sua volta di avere componenti sempre più veloci per le applicazioni in frequenza.

Basti pensare che con il nodo tecnologico di produzione odierna si riescono ad avere delle *features* su silicio di circa *5nm*. Ma ciò ha permesso anche di avere dei sistemi sempre più complessi e articolati inserendo più sottosistemi in un singolo chip, come ad esempio parti analogiche e parti digitali, andando a lavorare nel campo '*mixed signal*', fino alla più

recente integrazione con esse delle parti di *potenza*, come ad esempio il famoso processo produttivo **BCD**, che significa *Bipolar-CMOS-DMOS* capace di integrare 3 processi su singolo chip.

Ecco perché l'elettronica si è così fortemente evoluta, passando dall'essere basata su componenti macroscopici ossia grandi come i tubi o le valvole a vuoto, che erano i predecessori dei componenti moderni quali diodi e transistor, dispositivi integrati a stato solido, che sono davvero molto più piccoli. Infatti basti pensare che in un moderno processore per PC si riescono ad integrare miliardi di questi componenti.

Ma lo sviluppo non è stato solo dimensionale, è stato anche funzionale grazie soprattutto al ricorrente miglioramento delle tecniche e tecnologie di produzione, che ha permesso all'elettronica di abbracciare piano piano aree applicative molto vaste.

Ad esempio, il fatto che sia stato inoltre possibile riuscire a creare delle zone mobili sul silicio, quindi svincolate dal substrato, ha permesso lo sviluppo e poi la realizzazione dei sistemi *MEMS* che significa *micro-electro-mechanical systems*.

Tali sistemi sono capaci sia di misurare delle grandezze fisiche sia di rimpiazzare i cristalli che venivano ampiamente usati negli *oscillatori*, come ad esempio il *quarzo*.

Alcuni esempi di sistemi *MEMS* sono:

- gli *accelerometri*, che sono dei sensori in grado di rilevare e misurare le accelerazioni lineari,
- i *giroscopi*, che sono accelerometri appositi per rilevare e misurare le accelerazioni angolari sfruttando la forza di *Coriolis*,
- i *magnetometri*, che sono dei sensori in grado di misurare l'intensità di un campo magnetico sfruttando la forza di *Lorentz* che si genera quando scorre della corrente in un conduttore e che si comportano quindi da *bussole digitali*,
- i sensori a membrana in grado di misurare la pressione, dai quali sono nati i microfoni e gli altoparlanti MEMS, ampiamente usati nei device odierni quali smartphone e tablet ad esempio.

Un campo nel quale l'elettronica ha dato una svolta davvero meritevole è quello medicale, in cui ha introdotto molte innovazioni ed ha dato un importante contributo agli strumenti portatili, quali elettrocardiografo o misuratore di pressione ad esempio, che sono sempre più moderni, compatti ed evoluti. Alcuni passi da gigante sono stati compiuti anche nei dispositivi per il monitoraggio *real-time*, delle condizioni di salute di un paziente.

Un esempio lampante è il *pacemaker*, che viene impiantato nei pazienti che soffrono di aritmia cardiaca, il cui compito è quello di rilevare le irregolarità del battito cardiaco, attraverso una parte di *sensing*, per poi regolarlo nuovamente attraverso l'uso di piccoli

impulsi elettrici che vengono forniti al muscolo cardiaco nella fase definita di *pacinig*.

Altri importanti risultati in campo medico sono stati ottenuti ad esempio con l'ideazione, il progetto, lo sviluppo e la realizzazione degli impianti:

- *cocleare* (audio)
- *visivo* (video)

Questi sistemi sono stati studiati per permettere a persone con deficit acustici o visivi di migliorarne un po' le condizioni di vita.

L'impianto cocleare ha lo scopo di stimolare il nervo acustico attraverso degli impulsi. Tale nervo si trova all'interno della *coclea* e risponde alle diverse frequenze sonore in diverse zone lungo la sua lunghezza.

L'impianto visivo per l'*artificial vision*, come suggerisce il nome stesso, permetterebbe ad un paziente ipovedente o non vedente di riuscire a recuperare parzialmente la vista.

Altri grandi contributi dell'elettronica in campo medico sono stati introdotti nel corso degli anni nel campo del '*medical imaging*', ossia quella branca della medicina che fa uso di strumenti e tecniche per l'acquisizione di immagini dei tessuti del corpo umano per la diagnosi di alcune malattie.

Storicamente si era partiti dalla scoperta e poi l'uso e l'applicazione dei *raggi X*, che andavano ad impressionare una pellicola apposita e permettevano di vedere per lo più il nostro apparato scheletrico e alcune parti molli con appositi mezzi di contrasto come il *Bario*.

L'avvento dell'elettronica ha fatto sì che questa tecnica si evolvesse, che si passasse dall'usare la pellicola e lavorare quindi in analogico all'usare un supporto che possa essere usato più volte, una sorta di pellicola sopra-scrivibile e quindi lavorare in digitale; composta da una matrice di pixel, cioè *fotodiodi*, di cui discuteremo nel capitolo 3, che vengono impressionati dai *raggi X* che incidono e permettono di acquisire quindi il segnale.

Successivi passi in avanti sono stati compiuti con l'introduzione e lo sviluppo di tecniche di '*nuclear imaging*' più avanzate, che lavorano in 2-D (2 dimensions) e fanno uso di raggi β e γ come ad esempio:

- la *SPECT*, acronimo di *Single Photon Emission Computed Tomography*,
- la *TAC*, acronimo di *Tomografia Assiale Computerizzata*,
- la *PET*, acronimo di *Positron Emission Tomography*.

Tutte queste tecniche sono molto efficienti e soprattutto sono molto impiegate al giorno d'oggi nell'ambito della medicina per la diagnosi di alcune malattie mentre la loro peculiarità consiste nel fatto di essere estremamente precise, di avere elevata risoluzione spaziale. Un ulteriore importante contributo nel campo medico è stato introdotto e fornito dall'a-

nalisi in fluorescenza e dall'avanzare della *biologia molecolare*.

Questa tecnica, chiamata *spettroscopia molecolare*, consiste nel leggere la risposta ad uno stimolo luminoso fornito a delle particolari molecole, i *fluorofori*, con una camera.

I fluorofori sono delle molecole che, detto in poche parole, se legati a certi target di nostro interesse sono in grado di assorbire luce ad una certa lunghezza d'onda che definiamo $\lambda_{excitation}$, per poi emettere luce ad una lunghezza d'onda diversa, leggermente shiftata quindi, che è la cosiddetta $\lambda_{emission}$.

Ma nel corso degli anni grazie anche alla particolare evoluzione dei processi produttivi ed alla larga integrazione dell'elettronica si è assistiti anche alla nascita dei *Lab on Chip* (LoC) che sono dei sistemi molto compatti in cui elettronica e fluidica si legano per dare vita a quelli che sono dei laboratori ma su una dimensione molto più ristretta, che ha condotto alla micro diagnostica analitica basata su biosensori.

I principali vantaggi di questi sistemi sono:

- migliore controllo della dinamica della fluidica,
- alta sensibilità e risultati veloci,
- compattezza e portabilità, uniti a semplicità d'uso,
- costi ridotti grazie alla produzione di massa.

L'avvento della spettroscopia molecolare in concomitanza con lo sviluppo dei LoC hanno consentito di realizzare degli strumenti miniaturizzati, che fungono da *PoC* che significa *Point of Care* portatili, per l'analisi di campioni molecolari usando tecniche biologiche di laboratorio particolari come la *PCR*, di cui si parlerà nel capitolo 1.

Un esempio di questa tipologia di strumenti è il ***Q3-Plus***, progettato e sviluppato da ***STMicroelectronics***, di cui si parlerà nel capitolo 2. In conclusione, potremmo dire che lo sviluppo, l'evoluzione e l'integrazione dell'elettronica su una scala sempre più microscopica ha permesso di creare non solo prodotti sempre più avanzati e compatti, ma addirittura dei sistemi che oggi sono definiti *indossabili* come *smartwatch* e *smartband*, che sono disponibili sul mercato e vengono usati da tante persone nella vita quotidiana.

Questi dispositivi permettono, grazie all'interazione di molti tipi di sensori disponibili, di monitorare costantemente alcuni parametri riguardanti la nostra salute e la nostra attività fisica, come la frequenza del battito cardiaco, la pressione sanguigna e la saturazione dell'ossigeno, O_2 .

Tali *device* non sono da intendersi come dei sostituti alla medicina classica, ma possono essere validi alleati nella vita di tutti i giorni, spronandoci ad assumere e mantenere uno stile di vita più sano, fornendo anche una maggiore attenzione verso l'attività fisica e fornendo valido supporto nella prevenzione di disturbi cardiaci.

1 | La tecnica PCR

Nel corso della nostra storia e anche della storia dell'elettronica, un nuovo e vasto campo applicativo, come accennato nell'introduzione, è stato il campo medicale.

In tale ambito ci si è indirizzati sempre più volte verso la ricerca, lo studio e l'analisi di alcuni tratti caratteristici dell'anatomia umana con le tecniche prima citate, ma particolare importanza è stata assunta dal nostro DNA.

Si potrebbe iniziare dando una definizione di **DNA** che letteralmente significa **Acido DeossiriboNucleico** [1] mentre una definizione di carattere puramente biologico potrebbe essere la seguente: acido nucleico che contiene le informazioni genetiche necessarie alla biosintesi di **RNA** (anch'esso un acido nucleico) e proteine, molecole indispensabili per lo sviluppo ed il corretto funzionamento della maggior parte degli organismi viventi.

Acido nucleico a sua volta significa macromolecola aperiodica, cioè senza ripetizioni, a debole reazione acida i cui compiti sono la conservazione ed il trasporto dell'informazione genetica e sono macromolecole polimeriche lineari le cui unità ripetitive sono chiamati *nucleotidi*. Questi ultimi sono formati da uno zucchero, una base azotata e alcuni gruppi fosfati. Le basi azotate esistenti in natura sono 5 e si dividono in 2 grandi categorie:

- le basi *puriniche* derivate dalla *purina* che sono l'*Adenina* (A) e la *Timina* (T),
- le basi *pirimidiniche* derivate dalla *pirimidina* che sono la *Citosina* (C), la *Guanina* (G) e l'*Uracile* (U).

Le prime 4 basi azotate, l'adenina, la timina, la citosina, la guanina sono presenti nel DNA mentre la quinta base, l'uracile (U), sostituisce la citosina e si trova nell'RNA, che è un altro acido nucleico il cui compito è la codifica/decodifica del genoma e la sintesi proteica.

La catena di DNA/RNA si sviluppa su un filamento di gruppi fosfato legati a 2-deossiribosio per il DNA ed al ribosio per l'RNA. Su questa catena andranno poi a legarsi le basi azotate e la sostanziale differenza sta nel fatto che l'RNA è un singolo filamento, mentre il DNA è l'unione di 2 filamenti, che sono complementari e formano la struttura avvolta a *doppia elica* visibile nella figura che segue.

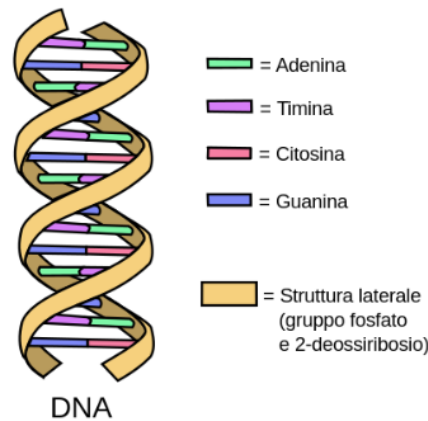


Figura 1.1: Struttura a doppia elica del DNA e accoppiamenti tra le quattro basi azotate.

Un ultimo appunto riguardo al DNA è che le 2 singole eliche oltre ad essere complementari procedono in 2 direzioni opposte che si indicano con $3' \implies 5'$ e con $5' \implies 3'$. Le diciture $3'$ e $5'$ identificano 2 particolari molecole sul filamento di DNA che ne rappresentano gli estremi, cioè il *capo* e la *coda*. Il DNA ha quindi una direzionalità che si ripercuote sulla replicazione del DNA.

Uno dei motivi principali per cui si studia il nostro DNA risiede nel fatto che al suo interno si hanno moltissime informazioni di carattere genetico e somatico ed alcune delle principali aree di studio potrebbero ad esempio essere:

- contenuto del gene: si va alla ricerca di una particolare sequenza del genoma per capire se una cellula sta eseguendo quella sequenza del genoma stesso,
- ricerca comparativa sulla funzione dei geni: ciò è molto utile per mettere in relazione le caratteristiche/diversità somatiche di diverse popolazioni,
- diagnosi di malattie infettive: studiando il genoma si può ricercare in esso la sequenza genomica di un preciso agente patogeno, i.e un virus,
- malattie genetiche e relativa predisposizione: sempre all'interno del genoma può essere ricercata una sequenza affetta da particolare mutazione e stabilire se il paziente possa essere a rischio.

Le prime analisi sul DNA venivano eseguite usando i *DNA microarray*: ciò consisteva nell'applicare un campione di DNA noto sulla superficie di un chip in posizioni note per procedere poi con l'applicazione di campioni di DNA di cui non si avevano informazioni e che si volevano analizzare, ossia i campioni.

In questa tipologia di analisi si attende se il DNA campione andasse a legarsi, cioè ad

ibridizzare, con il DNA noto che è anche suo complementare e nel caso in cui ciò avvenisse si acquisiscono le posizioni nelle quali l'ibridizzazione è avvenuta, scansionando l'intero array. Il limite della fase di rilevazione sta nel fatto che sarà proporzionale alla quantità di DNA che andrà ad ibridizzare, quindi avere bassa concentrazione iniziale significherebbe avere un basso segnale rilevato.

1.1. La scoperta della PCR e le sue applicazioni

Una delle tecniche che permette di analizzare il DNA è la tecnica **PCR**, acronimo di *Polymerase Chain Reaction* [7]. Tale tecnica consente di rilevare una particolare sequenza di DNA target grazie alla sua amplificazione. Infatti questa tecnica replica in vitro il naturale meccanismo di replicazione del DNA, che avviene naturalmente nelle cellule con la DNA-polimerasi [8]. La scoperta della PCR si deve a **Kary Mullis** nell'anno 1984, scoperta che gli consentì di ricevere il premio **Nobel** nel 1993. La tecnica PCR è divenuta una pietra miliare nel campo della biotecnologia moderna.

1.2. I passaggi e la dinamica della PCR

Dopo avere brevemente introdotto la tecnica PCR possiamo porci ora a vedere quanti e quali sono i passaggi con cui si mette in pratica tale tecnica. In modo veloce potremmo dire che i passaggi fondamentali in cui si divide tale tecnica sono 4:

1. *Denaturazione*
2. *Annealing*
3. *Estensione* o *Elongazione*
4. *Elongazione finale*

Il primo step della PCR, la fase di **denaturazione**, consiste nel riscaldamento del campione biologico, ad una temperatura di circa 95°C in modo che la doppia elica del DNA si apra e si separi in 2 singole eliche. In realtà tale temperatura non è proprio fissa dipende da alcuni fattori che possono essere ad esempio:

- la lunghezza della porzione dell'elica di DNA stessa,
- la quantità di coppie di basi azotate *Adenina-Timina* (A-T) o *Citosina-Guanina* (C-G) presenti. Avere più coppie C-G, che sono a triplo legame idrogeno, richiederà maggiore energia e quindi maggiore temperatura per l'apertura della doppia elica del DNA rispetto ai legami doppi delle basi A-T che sono a doppio legame idrogeno.

Nel secondo step, la fase di *annealing*, si va alla ricerca delle sequenze di DNA target da amplificare. Per tale scopo si usano i *primer*, che si legheranno alle sequenze target delle singola catena essendone le sequenze omologhe. Questo step viene svolto a temperature di circa 60°C - 65°C.

Il terzo step, la fase di *estensione*, invece è quello in cui si va a replicare la sequenza di DNA di nostro interesse e quindi sarà la fase di amplificazione del DNA target. La temperatura viene aumentata fino a circa 75°C - 80 °C, tuttavia sarà leggermente variabile in relazione all'enzima usato per la reazione. Questa fase prende il nome di *extension* a causa dell'amplificazione del DNA target.

Infine nella quarta fase, l'*elongazione finale*, si va a lavorare ad una temperatura di 70°C - 74°C per assicurarsi che ogni singola elica di DNA sia del tutto *replicata*.

Un'immagine riassuntiva di quanto descritto per i passaggi svolti nella PCR è questa:

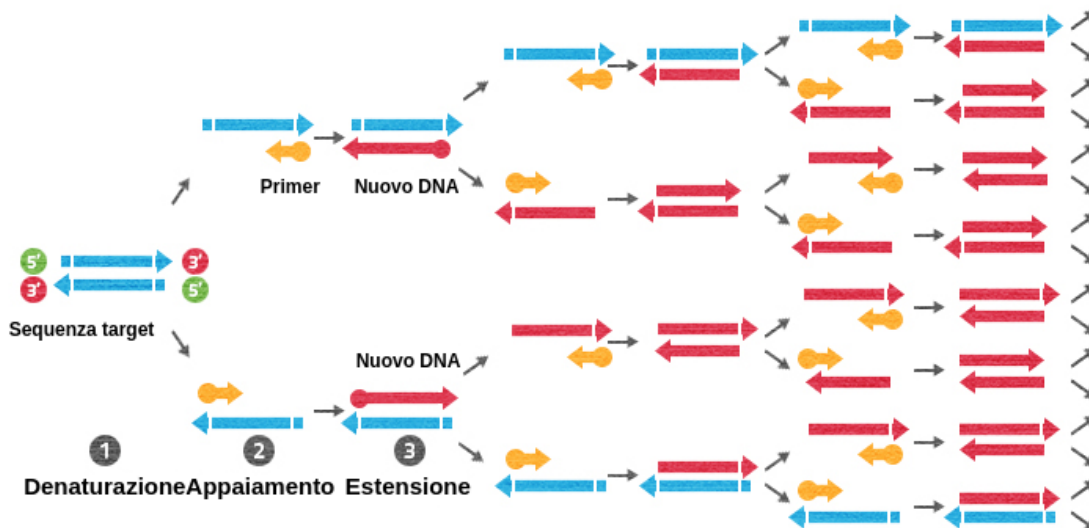


Figura 1.2: Passaggi svolti in un ciclo di PCR.

Come si vede nell'immagine ogni replicazione della sequenza target sarà effettuata sempre lungo la direzione $3' \Rightarrow 5'$, mentre i primer sono gli elementi in giallo. Come si diceva prima il segnale rilevabile in un'analisi su DNA è direttamente proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione che va a reagire ed a combinarsi; quindi andare ad effettuare alcuni cicli di PCR prima del test, oltre all'essere un passaggio molto semplice, condurrebbe ad avere una concentrazione di DNA maggiore e quindi una maggiore possibilità di rilevazione del DNA target.

Attraverso l'uso della PCR è possibile quindi bypassare il problema di una eventuale bassa concentrazione di DNA.

Dopo avere introdotto e descritto i passi per realizzare in modo pratico un ciclo di PCR ci si potrebbe benissimo chiedere quale sarà la dinamica di questo processo, cioè quanto DNA si riuscirebbe a replicare data la quantità che si ha inizialmente a disposizione nel campione biologico.

Ciò di cui si necessita in una soluzione (o mix) per svolgere dei cicli di PCR sono:

- il DNA da amplificare chiamato *template*,
- l'enzima *polimerasi*, chiamato *Taq*, per promuovere la replica del template,
- le basi azotate, che sono gli elementi costitutivi del DNA,
- un buffer salino a concentrazione specifica,
- ioni *magnesio*, Mg^+ , per stabilizzare il *pH*,
- coppia di *primers* per la replica della sequenza *target*.

Tuttavia, è necessario ricordare che lavorando in questo modo, cioè amplificando a priori il DNA a disposizione e rilevando ciò a cui si è interessati a posteriori, non si riuscirà ad acquisire alcuna informazione quantitativa riguardo la concentrazione iniziale di DNA che era contenuta nel campione prima della reazione.

1.3. La Real-Time PCR

Per risolvere il problema della totale mancanza di informazioni a livello quantitativo della concentrazione iniziale del DNA in fase di lettura si è passati alla *Real-Time PCR*, il cui abbreviativo è *qPCR*. Con questa tecnica si riesce ad avere una precisa misura della concentrazione del DNA campione iniziale poiché si vanno ad amplificare in parallelo il campione stesso e dei campioni a concentrazioni note.

Questi ultimi forniranno le curve di calibrazione e la misura si otterrà dal confronto delle curve di qPCR.

Ciò significa che stabilendo ad esempio un valore arbitrario di soglia, per una determinata quantità della concentrazione di DNA iniziale e confrontando tutte le curve si ottiene il numero di cicli di qPCR necessari per raggiungere tale concentrazione di DNA.

Tale ciclo si chiama *ciclo soglia* e si denota con C_T .

Riassumendo si potrebbe dire che conoscendo sia la curva di calibrazione che il valore del ciclo soglia si può facilmente risalire al valore della concentrazione iniziale di DNA che era presente nel campione.

La reazione sarà caratterizzata da 3 fasi a diverso andamento o trend:

1. Inizialmente si avrà una fase con un trend di tipo *esponenziale*, nella quale ad ogni ciclo si assisterà ad un raddoppio del DNA target. In questo modo dopo N cicli di PCR si avranno 2^N segmenti di DNA. Questa fase è dipendente dalla concentrazione iniziale di DNA nel campione.
2. Nella fase successiva si avrà una diminuzione dei prodotti della reazione a causa dell'esaurimento dei reagenti disponibili ed il trend della reazione diventerà di tipo *lineare*.
3. Quando i reagenti saranno del tutto esauriti, nell'ultima fase, la reazione si fermerà e si raggiungerà il *plateau* che è il valore costante di regime che dipende invece dalla quantità iniziale dei reagenti.

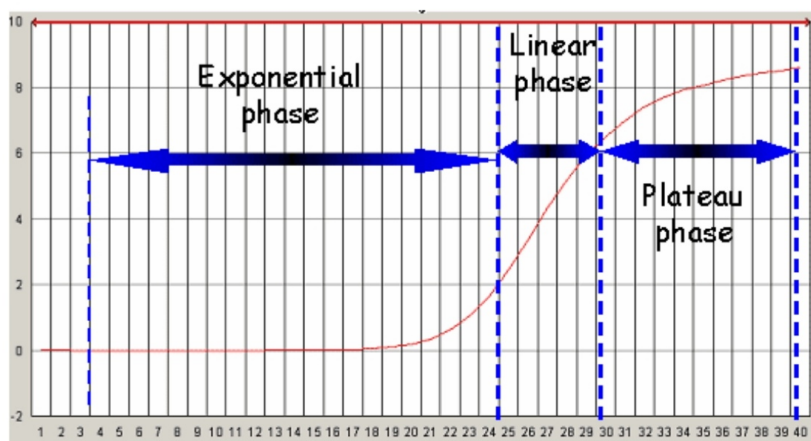


Figura 1.3: Dinamica della tecnica qPCR.

Nell'immagine è riportata la sequenza delle 3 fasi e sugli assi abbiamo il numero di cicli termici in ascissa e il numero di copie del DNA ottenuto in ordinata.

Nella prima fase della reazione, che è quella esponenziale, l'andamento non è subito visibile poiché durante i primi cicli della qPCR la concentrazione di DNA ed il conseguente segnale misurato staranno al di sotto della soglia di rumore dello strumento stesso.

La misura della concentrazione del DNA viene eseguita otticamente attraverso il rilevamento dell'emissione in fluorescenza, effettuata sfruttando:

- molecole intercalanti come ad esempio il *SYBR Green* ed il *bromuro di etidio*, cioè delle molecole che diventano fluorescenti quando si innestano nella doppia elica di DNA. In questo modo la lettura in fluorescenza è direttamente proporzionale alla concentrazione di DNA.

- le molecole sonda come ad esempio *TaqMan* che sono delle catene di DNA con un fluoroforo connesso alla sua estremità 5', chiamato *reporter* e un'altra molecola chiamata *quencher* nella sua estremità 3'. La proprietà del quencher è quella di inibire la fluorescenza del reporter, assorbendone i fotoni emessi, non appena sono tra loro vicini. L'enzima *polimerasi*, responsabile della duplicazione delle sequenze genomiche, durante la reazione va a tagliare qualsiasi frammento di DNA che incontra. Quindi se sul suo percorso si dovesse trovare una sonda sarà a sua volta tagliata, quindi quencher e reporter si allontanano e si avrà l'emissione. Per ogni evento di duplicazione una nuova sonda diventa fluorescente.
- le *molecular beacon* sono invece delle piccole catene singole di DNA (single strand DNA, *ss - dna*) con un fluoroforo e un quencher alle sue estremità. Sono degli *oligonucleotidi* studiati per essere complementari a sé, in modo che le estremità ripiegate formino una doppia elica mentre la parte centrale è complementare alla sequenza *target*. Quando la molecola è *chiusa* su se stessa la fluorescenza è inibita poiché fluoroforo e quencher sono vicini. La differenza tra questo tipo di *label* e le *TaqMan* sta nel fatto che non vengono degradate dalla reazione di duplicazione, potendo tornare allo stato ripiegato e spegnersi.

2 | Uno strumento per la qPCR: il Q3-Plus

L'oggetto principale del precedente capitolo è il nostro DNA, di cui abbiamo visto le caratteristiche più rilevanti e quelle che sono le principali tecniche impiegate nel suo studio e nelle sue analisi. Tra queste tecniche abbiamo visto ampiamente la PCR, dalla sua scoperta al suo principio di funzionamento, elencando e descrivendo i passaggi svolti durante un suo ciclo di reazione.

Nella descrizione della PCR avevamo visto che per ognuna delle fasi della reazione si richiede una temperatura ben definita, ma avevamo però tralasciato per un momento altri importanti dettagli riguardanti quelli che potrebbero essere gli aspetti critici ovviamente, cioè quelle condizioni ambientali e/o fisiche da monitorare in modo accurato affinché la reazione avvenga nel modo giusto come ad esempio la temperatura stessa.

Quindi a breve parleremo dei seguenti punti:

- le criticità della PCR stessa connesse alle condizioni termiche ed i loro effetti,
- eventuali correzioni da effettuare sui parametri critici.

2.1. Le criticità della PCR

Una delle principali criticità della PCR è il mantenimento della temperatura a valori stabili, nonché la precisione della temperatura stessa, in ognuna delle diverse fasi della reazione. Vediamo brevemente quali possono essere gli effetti di una temperatura non molto precisa durante lo svolgimento della reazione in tutte le 3 fasi.

In ognuna di esse potremmo potenzialmente essere dinanzi a 2 scenari diversi, che possono essere ovviamente:

- T più alta di quella richiesta,
- T più bassa di quella richiesta.

Iniziamo a vedere quali possono essere gli effetti di una temperatura non stabile partendo dalla fase di **denaturazione**:

- T più alta: si può danneggiare l'enzima polimerasi e quindi l'effetto che ne consegue è che la reazione potrebbe *non avvenire*,
- T più bassa: la doppia elica del DNA potrebbe non separarsi e quindi denaturare completamente e ciò significa una *minore efficienza* della reazione.

Passando invece alla successiva fase di **annealing** gli effetti potrebbero essere:

- T più alta: i primers potrebbero legarsi in modo anomalo/errato andando ad amplificare del DNA non desiderato comportando un *risultato sbagliato*,
- T più bassa: i primers potrebbero non legarsi, la reazione quindi non avviene e ciò conduce nuovamente ad una *minore efficienza*.

Infine per la fase di **estensione** gli effetti potrebbero a loro volta essere:

- T più alta: i primers potrebbero staccarsi dalla sequenza di basi cui erano legati e ciò conduce ad una *ridotta efficienza*,
- T più bassa: la reazione procede ma ad una minore velocità conducendo sempre ad una *minore efficienza* o alla totale assenza di reazione.

2.2. Il Q3-Plus

Per cercare di mediare tutte le problematiche della PCR esposte finora e per fare in modo che le temperature nelle varie fasi della reazione siano sempre ben stabili e controllate, quello che occorre è un sistema di gestione termica che vada a monitorarle costantemente, correggendole quando necessario e che lavori in parallelo al sistema di acquisizione e misura dell'emissione in fluorescenza.

Ed ecco quindi che a tale scopo è stato progettato e sviluppato in *STMicroelectronics* lo strumento denominato *Q3-Plus*.

Si tratta di un sistema molto compatto per eseguire analisi di q-PCR usando delle cartucce dedicate, sulle quali sono ricavati 6 pozzetti, in ognuno dei quali si possono inserire le mix con i campioni biologici ed i reagenti necessari per la reazione.

Grazie alla capacità del sistema ottico di lavorare in 4 diverse bande ottiche, unitamente alla presenza dei 6 pozzetti della cartuccia, si possono potenzialmente cercare fino a 24 target simultaneamente in una singola reazione.



Figura 2.1: Lo strumento e la cartuccia.

Ecco come si presentano lo strumento e la cartuccia, di seguito invece mostriamo l'esploso dello strumento:

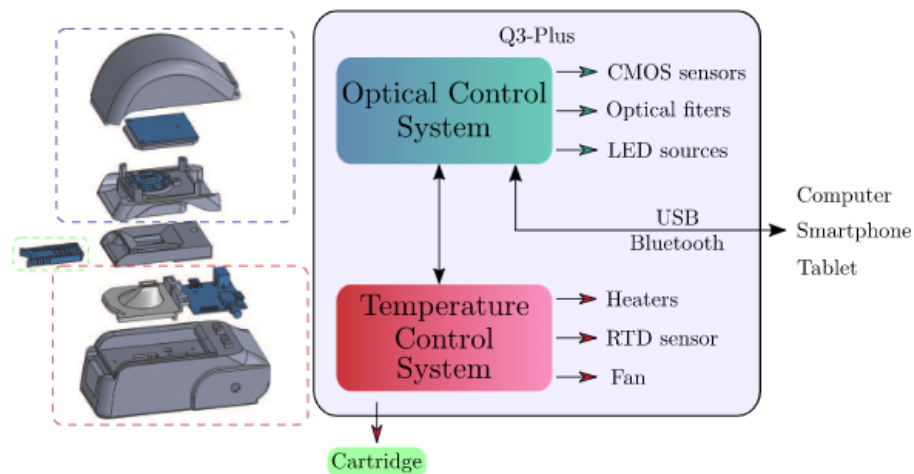


Figura 2.2: Grafico esploso dal CAD dello strumento.

Dopo una breve visione di tale esploso dello strumento passeremo ad una descrizione più accurata delle 2 parti principali che lo costituiscono.

2.2.1. La parte termica

Il primo blocco del Q3-Plus è la parte inferiore, che si occupa quindi della gestione termica, in modo da garantire una temperatura costante durante le diverse fasi della reazione.

Esso è un sistema di controllo ad *anello chiuso*, che si compone di:

- un riscaldatore, *heater*, che viene realizzato su chip in silicio situato nella cartuccia, sopra il quale si avranno i pozzetti,
- un sensore di temperatura,
- una ventola per l'estrazione del calore,
- un μC che opera da regolatore PD che acquisisce la temperatura e attua le correzioni necessarie per mantenerla quanto più precisa possibile.

Il chip si compone innanzitutto di 2 parti funzionali:

- una prima parte di *sensing* denotata con R_s , che serve ad acquisire la temperatura,
- una seconda parte di *actuation* denotata con R_h , che scalda per raggiungere la temperatura di cui si necessita per le fasi della reazione.

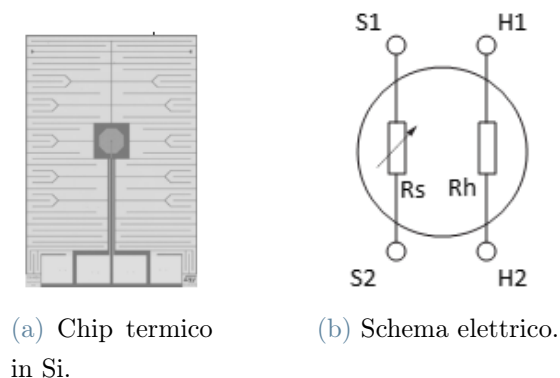


Figura 2.3: Vista del chip termico del Q3-Plus e schema a blocchi semplificato.

Sempre in figura è possibile notare che la parte di sensing, R_s , è quella centrale mentre la parte di actuation, R_h , è tutta quella circostante, realizzata a serpentina sulla totalità della superficie disponibile per garantire l'omogeneità della temperatura su tutto il chip e quindi su tutti e 6 i pozzetti della cartuccia nei quali avverranno le reazioni.

Per la rilevazione della temperatura viene effettuata una misura di tipo impedenziometrico, si misura quindi il valore della resistenza di sensing in *Ohm* [Ω] e da questo valore si ricava la corrispondente temperatura del chip.

Attraverso la seconda legge di Ohm il valore di una resistenza è data dalla relazione:

$$R = \rho \cdot \frac{l}{S} \quad (2.1)$$

nella quale figurano la *resistività* del materiale, la lunghezza e la sezione del resistore, il chip, in questione. Ovviamente i parametri l ed S essendo di tipo geometrici sono fissati in fase di design e non possono variare, mentre la resistività ρ del materiale dipenderà dalla temperatura. In questo modo si riesce ad avere il sensing/setting della temperatura. Riscrivendo la 2.1 tenendo conto della dipendenza di ρ dalla temperatura si ottiene:

$$R = \rho \cdot \frac{l}{S} = \rho(T) \cdot \frac{l}{S} = \rho_0 \cdot (1 + \alpha_R) \frac{l}{S} = R_0 \cdot (1 + \alpha_R) \quad (2.2)$$

con ρ_0 e R_0 che sono rispettivamente la resistività e la resistenza per $T = 0^\circ\text{C}$ ed α_R che è il *Thermal Coefficient of Resistance* e si misura in $[\frac{1}{^\circ\text{C}}]$. La nuova espressione della seconda legge di Ohm viene illustrata nel grafico sottostante:

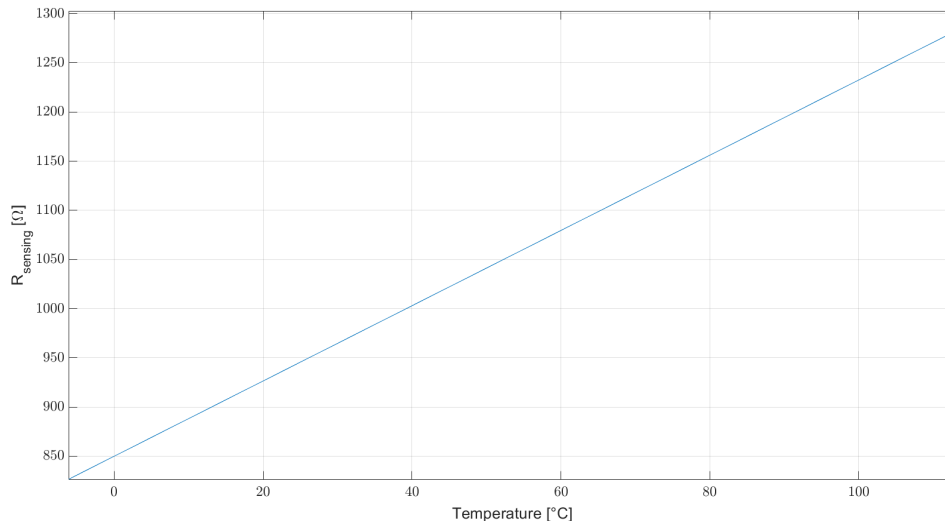


Figura 2.4: Relazione resistenza-temperatura nel chip.

Come si può notare in figura R_0 è l'intercetta della retta, ossia il valore della resistenza per $T = 0^\circ\text{C}$ che vale circa 850Ω nel processo qui usato; mentre la pendenza sarà data dal prodotto $R_0 \cdot \alpha_R$ e per l'alluminio, materiale del chip, vale $0.0014[\frac{\Omega}{^\circ\text{C}}]$. Tale retta si ottiene nel reparto **EWS** (*Electric Wafer Sorting*) andando a fare 3 misure della resistenza alle temperature di 30°C , 60°C e 90°C . Un procedimento analogo sarà svolto nel Q3-Plus in autonomia, prima di qualsiasi analisi, per la sua fase di calibrazione.

Quindi per raggiungere la temperatura desiderata, il controllore PD della parte termica non dovrà fare altro che leggere la temperatura iniziale e fare fluire della corrente nel chip, che per *effetto Joule* dissiperà potenza e quindi aumenterà la sua temperatura.

Tale operazione viene ripetuta continuando a monitorare il valore di resistenza e quindi

di temperatura per regolare la corrente fornita al chip. Si opera quindi in regime di controllore PD [2, 16] poiché:

- la parte *proporzionale* è legata all'errore, che viene espresso come distanza tra valore attuale della variabile controllata e valore target;
- la parte *derivativa* è legata invece alla variazione nel tempo del segnale errore e serve quindi per settare la velocità del processo di controllo.

Un altro aspetto molto importante e strettamente connesso alla temperatura durante la reazione è la *velocità della reazione*.

Dall'immagine sottostante è visibile il fatto che per passare da una fase della reazione alla successiva è necessaria la variazione della temperatura. A livello termico dunque la reazione di PCR è un susseguirsi di rampe termiche e di plateau:

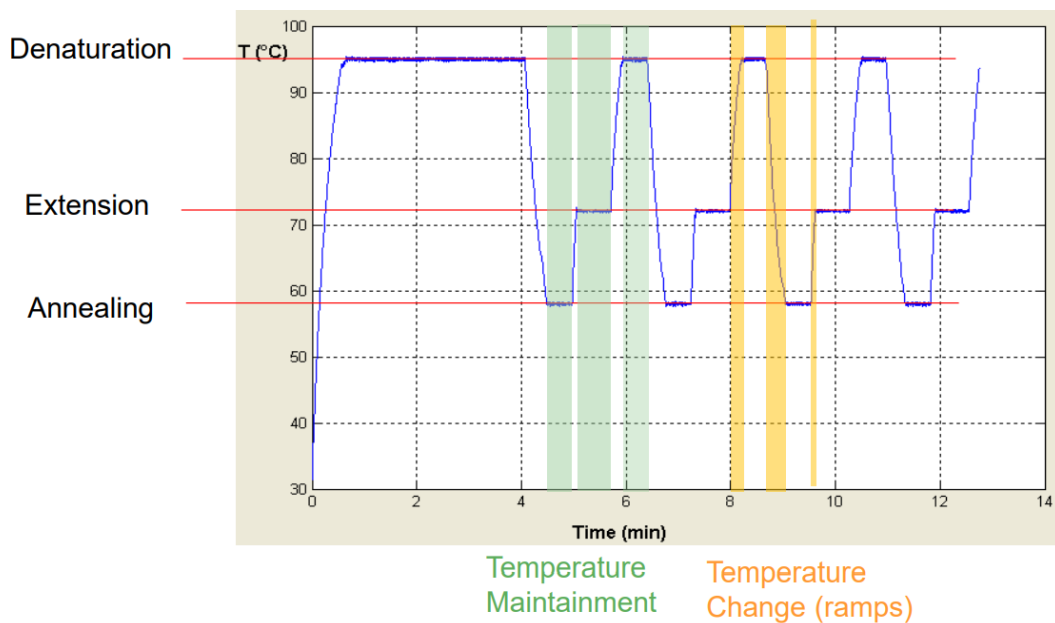


Figura 2.5: Andamento termico di un singolo ciclo di PCR.

Infatti i tempi di *holding* dei plateau, evidenziati in verde, sono definiti nel protocollo termico della qPCR e sono dipendenti dai vari reagenti usati, dagli enzimi e dalla lunghezza della sequenza di DNA target.

Le rampe termiche di salita/discesa, evidenziate in giallo, sono a loro volta legate alla capacità dello strumento, più saranno veloci più sarà veloce la reazione in termini di tempo impiegato. Infatti nel caso in cui si utilizzassero enzimi di nuova generazione che sono anche molto più veloci, i tempi della rampa e di mantenimento iniziano a diventare comparabili. In questo caso quindi velocizzare le rampe ridurrebbe sensibilmente il tempo

impiegato per la reazione.

La forza del sistema Q3-Plus risiede proprio in questo: grazie alle dimensioni ridotte della cartuccia e all'utilizzo del silicio come conduttore termico, si riesce ad essere allo stesso tempo molto precisi e veloci nel controllo della temperatura arrivando a velocità di reazione di 30 minuti contro i 120 di uno strumento da laboratorio con una precisione nel controllo della temperatura dell'ordine di $\Delta T = \pm 0.25^\circ C$.

2.2.2. La parte ottica

Il secondo blocco del Q3-Plus invece è quello ottico ed il suo compito è quello di occuparsi dell'analisi in fluorescenza sui campioni della reazione.

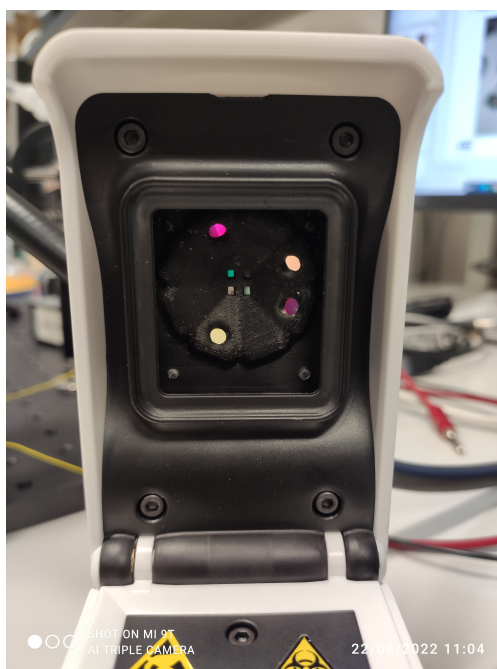


Figura 2.6: Testa ottica del Q3-Plus.

Esso si divide a sua volta in 2 parti principali che sono:

- la parte per l'eccitazione dei fluorofori composta dalla corona esterna, in cui sono inseriti 4 LED ad alta potenza, che illuminano quindi i campioni che sono contenuti nei 6 pozzetti della cartuccia per eccitare i fluorofori,
- la parte per il rilevamento dell'emissione in fluorescenza da parte dei fluorofori che è la parte centrale, composta da 4 sensori fotografici CMOS.

Impiegando quindi i 4 LED e le 4 camere con degli opportuni filtri ottici, si riesce da avere come detto prima nel paragrafo 2.1 le 4 diverse bande ottiche rendendo anche possibile la misura dell'emissione di 4 tra i fluorofori più impiegati che sono:

- il *FAM* per il canale 1,
- il *VIC* per il canale 2,
- il *NED* per il canale 3,
- il *ROX* per il canale 4.

I fluorofori per loro natura sono molecole che assorbono intensità luminosa ad una ben nota lunghezza d'onda $\lambda_{excitation}$, per poi emettere intensità luminosa con una lunghezza d'onda $\lambda_{emission}$ leggermente differente.

Per riuscire ad avere questa selettività in entrambe le fasi vengono usati dei particolari filtri ottici della **SEMROCK** [13] sia sui LED che ovviamente non potranno emettere luce ad una sola λ e quindi così ne tagliamo parte dello spettro, sia sulle camere in modo da eliminare quelle che possono essere delle interferenze nell'intorno della $\lambda_{emission}$.

Quindi potremmo riassumere in modo sintetico la struttura della parte ottica come visibile nella seguente tabella:

Canale Q3-Plus	Fluoroforo	LED	Filtro eccitazione	Filtro emissione
1	FAM	Blu	472/30	524/24
2	VIC	Verde	530/11	565/24
3	NED	Verde	556/20	568R
4	ROX	Ambra	550/88	650/60

Tabella 2.1: Descrizione della parte ottica del Q3-Plus.

I filtri impiegati sono dei filtri passa-banda sia in eccitazione che in emissione nei canali 1, 2 e 4, a differenza del canale 3 dove si ha sempre un passa-banda in eccitazione ma un passa-alto in emissione, che viene indicato con la lettera **R** nella sigla.

Nelle sigle dei filtri viene prima indicata la lunghezza d'onda centrale e poi la larghezza di banda unilatera in [nm] nel formato $\lambda_{centrale}/\Delta_{bandwidth}$ e cioè vale per tutti i passa-banda, mentre per il passa-alto si riporta la λ iniziale.

Tutti i filtri di eccitazione/emissione sono stati caratterizzati illuminandoli con una sorgente ad ampio spettro ed acquisendo i relativi spettri con uno spettrometro e saranno riportati successivamente in questa trattazione nel capitolo 4 nel relativo paragrafo 4.4 .

2.3. Limitazioni del sistema Q3-Plus

Nei precedenti paragrafi abbiamo illustrato come è realizzato il Q3-Plus in entrambe le sue parti, termica ed ottica. Quello di cui ci occuperemo adesso è il loro funzionamento in parallelo.

Il processo si svolge in 2 step:

1. la parte termica si occuperà di portare avanti con i cicli termici la reazione di qPCR per amplificare il DNA target presente nel campione;
2. la parte ottica si occuperà dell'eccitazione dei fluorofori e del rilevamento della quantità di DNA target mediante la misura ottica dell'emissione in fluorescenza da parte dei fluorofori stessi.

Entrambi i passaggi verranno ripetuti N volte, a seconda del protocollo termico di qPCR implementato nel software dello strumento. Tuttavia tramite l'osservazione dei risultati ottenuti dalla suite del dispositivo, che sono delle immagini, durante un esperimento completo di qPCR si nota un particolare effetto, soprattutto nel canale 4 dove viene rilevata la fluorescenza del *ROX*. Tale effetto è una riduzione significativa dell'illuminazione della cartuccia, con annessa riduzione dell'eccitazione e di conseguenza dell'emissione in fluorescenza da parte dei campioni. Tale effetto è visibile nell'angolo inferiore sinistro delle immagini sottostanti, ricavate da una prova in cui era stato appositamente inserito un target che emette in fluorescenza alla lunghezza d'onda del fluoroforo ROX:

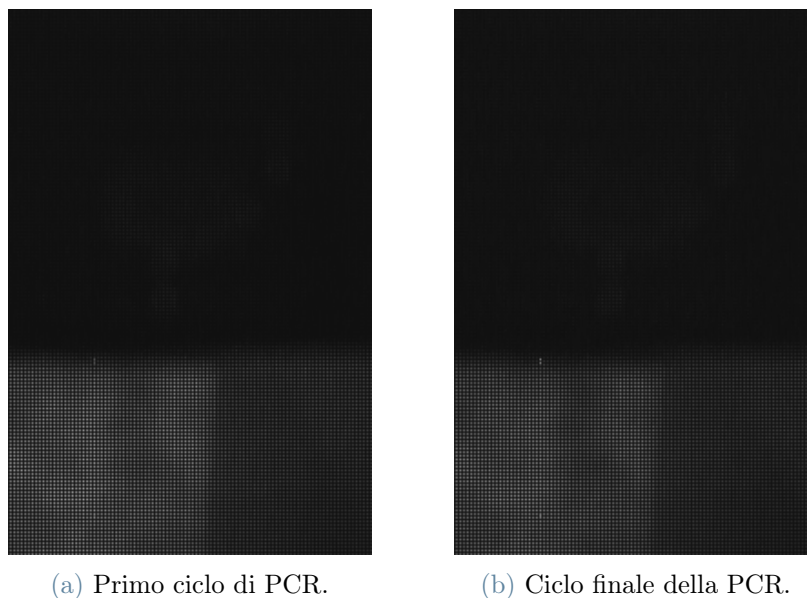


Figura 2.7: Calo dell'emissione in fluorescenza nel canale 4 tra ciclo iniziale e finale.

2.3.1. Una possibile soluzione

Una prima ipotesi sulla causa del fenomeno mostrato è stata la deriva termica del LED, nella sua fase di accensione, impiegato per l'eccitazione.

L'ipotesi è lecita poiché i LED nel dispositivo vengono alimentati a corrente alta con conseguente dissipazione di potenza e aumento della temperatura. Per quantificare l'entità di questo calo in emissione si doveva ricorrere ad un sensore che andasse a monitorare il LED durante lo svolgimento della reazione e realizzare un controllo ad anello chiuso.

Per quanto riguarda le possibili correzioni si aprivano due possibili strade da percorrere:

- la prima consiste nella stabilizzazione del LED attraverso la correzione della sua polarizzazione, il che significa un preciso controllo in corrente e che in genere è abbastanza difficile da realizzare ma anche abbastanza costoso a livello di sviluppo,
- la seconda invece mira ad una correzione dei dati ottenuti sulla base della deriva misurata del LED e cioè una correzione dei dati *post-processing*, che in genere richiede meno effort sia progettuale che economico.

Lo schema a blocchi seguente mira a riassumere quanto appena descritto:

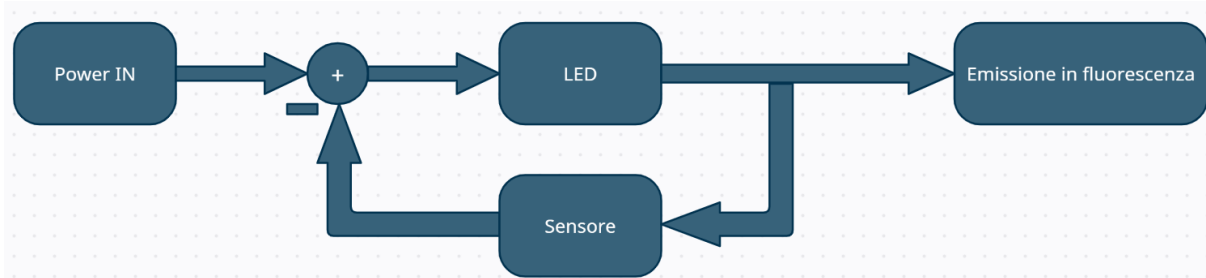


Figura 2.8: Esempio del possibile controllo in feedback nel Q3-Plus.

Il sensore non poteva essere altro che un fotodiodo e dopo una ricerca è stato deciso di adoperarne uno prodotto sempre da *STMicroelectronics*, il **VD6283TX**. In laboratorio si disponeva di alcuni esemplari di tale sensore, capace di lavorare in parallelo su 6 bande ottiche nello spettro, riuscendo a lavorare perfino nella regione degli infrarossi, *IR*. Quindi si è deciso di procedere in un primo luogo alla caratterizzazione del sensore per poi in seguito adoperarlo nel Q3-Plus per lo scopo descritto.

Nel capitolo seguente verranno fornite una descrizione dettagliata sul sensore, sulla sua costruzione e sui suoi principi di funzionamento, unitamente alla descrizione dei vari passaggi svolti durante la sua caratterizzazione.

3 | Il Rainbow

In questo capitolo sarà discusso il sensore menzionato poco prima, ma facciamo prima un leggere passo indietro e partiamo dagli inizi. Come brevemente descritto nell'introduzione, uno dei primi dispositivi a semiconduttore prodotti è stato il **diodo**, che tecnicamente nasce dall'accostamento tra 2 zone di silicio drogate, una di tipo **p** con concentrazione di atomi accettori ($1e^-$ in meno del Si) pari a N_A [$\frac{1}{cm^3}$] ed una di tipo **n** con concentrazione di atomi donori ($1e^-$ in più del Si) pari a N_D [$\frac{1}{cm^3}$] rispettivamente. Per tale motivo viene definito anche *giunzione p-n* ed in base alla polarizzazione fornitagli, ossia la differenza di potenziale ai suoi terminali, si può comportare da:

- **cortocircuito** in caso di polarizzazione diretta, cioè tensione più positiva sul lato p e più negativa sul lato n ,
- **circuito aperto** in caso di polarizzazione inversa, cioè tensione positiva sul lato n e negativa sul lato p .

Quindi il diodo si comporta da elemento *rettificante* grazie alle sue proprietà e tale effetto si vede quando viene impiegato in circuiti che vengono alimentati in corrente sinusoidale alternata ad esempio. In questo caso lascerà passare la corrente sulla semi-onda positiva mentre la bloccherà sulla semi-onda negativa.

Va menzionato che nel corso degli anni si è anche trovato il modo di utilizzare il diodo polarizzato in inversa, *reverse-bias*, per sfruttarne l'utilità.

3.1. Il fotodiodo

Un utilizzo tipico del diodo polarizzato in inversa è il **fotodiodo**, componente elettronico che è in grado di catturare dei fotoni quando esposto alla radiazione luminosa e generare al suo interno una carica elettrica. Inizieremo spiegando come si riesce ad ottenere una carica elettrica dall'assorbimento dei fotoni, mostrando una sezione della struttura di un diodo/fotodiodo, mettendone in risalto gli elementi principali e gli aspetti più importanti, per giungere poi ad una spiegazione sull'assorbimento dei fotoni e infine della generazione della carica elettrica.

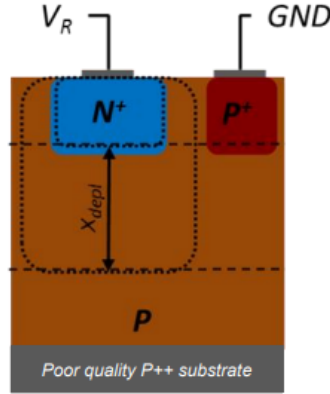


Figura 3.1: Sezione della giunzione pn .

Gli elementi visibili principali sono:

- la zona N^+ con drogaggio tipico pari a $N_D \approx 10^{20} \text{ cm}^{-3}$,
- la zona P accresciuta epitassialmente con drogaggio tipico pari a $N_A \approx 10^{15} \text{ cm}^{-3}$,
- la zona P^+ con drogaggio tipico pari a 10^{18} cm^{-3} , usata per avere un buon contatto ohmico con la zona P ,
- la zona svuotata indicata con $\chi_{depletion}$, di estensione pari a $\chi_{depl} \approx 1.5 \text{ }\mu\text{m}$ per $V_R=3.3V$, che come vedremo a breve dipende dalla tensione inversa V_R applicata,
- la zona P^{++} usata per evitare la diffusione delle cariche nel substrato, vedremo poco più avanti il perché di tale scelta.

Per la giunzione pn si ha sempre una regione svuotata dovuta alla ridistribuzione spaziale della carica provocata dall'accostamento delle 2 parti con diversa concentrazione di portatori, ma nel caso di polarizzazione inversa tale fenomeno viene accentuato dalla tensione inversa V_R applicata e vale:

$$\chi_{depletion} = \sqrt{\frac{2\epsilon_0\epsilon_{Si}(V_R + V_{bi})}{qN_a}} \quad (3.1)$$

e che dipende non solo dalla tensione inversa, ma anche dalla tensione cosiddetta di **built-in**, dovuta al piegamento delle bande alla creazione della giunzione stessa ed alla concentrazione dei droganti nelle 2 zone drogate p ed n , ed ha la seguente espressione:

$$V_{bi} = \frac{k_B T}{q} \ln\left(\frac{N_A N_D}{n_i^2}\right) = V_{th} \ln\left(\frac{N_A N_D}{n_i^2}\right) \quad (3.2)$$

nella quale figura anche n_i che è la concentrazione intrinseca del Silicio non drogato e vale $1.45 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ e la **costante di Boltzmann**, $k_B = 8.61 \times 10^{-5} \frac{\text{eV}}{\text{K}}$, mentre con V_{th} ci si riferisce alla *tensione termica*, cioè al rapporto $\frac{k_B T}{q}$ che per $T = T_{amb}$ vale circa 25.8 mV . Avere la regione svuotata significa quindi avere una regione nel semiconduttore ai quali estremi si avrà una carica fissa esposta che viene lasciata dai portatori maggioritari che vanno a diffondere nella regione opposta in cui sono minoritari per cercare di ristabilire l'equilibrio.

Ma ciò equivale ad avere una capacità a piatti piani e paralleli, chiamata **capacità di svuotamento**, $C_{depletion}$ il cui valore si può calcolare tramite la seguente formula:

$$C_{depletion} = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_{Si} \cdot Area_{photodiode}}{\chi_{depletion}} \quad (3.3)$$

Tale capacità giocherà un ruolo fondamentale nel **readout** della corrente fotogenerata, come vedremo nel seguito nella sezione 3.1.1.

Ma torniamo ora alla generazione della carica elettrica nel dispositivo in seguito all'assorbimento dei fotoni incidenti. Tutto ha inizio nel momento in cui la radiazione luminosa colpisce il fotodiodo nella regione che viene detta **attiva**, la regione che viene esposta e che ha in genere un'apertura di tipo circolare. L'assorbimento della luce e/o di particelle in un mezzo materiale [5] segue una relazione di tipo esponenziale, la legge di **Lambert-Beer**:

$$I(x) = I(0) \cdot e^{-\alpha(\lambda)x} \quad (3.4)$$

Nell'equazione 3.4 si hanno 2 importanti elementi, che sono:

- $I(0)$ che è l'intensità radiante incidente misurata in $[\frac{W}{m^2}]$
- α che è invece il **coefficiente di assorbimento** del materiale, nel nostro caso il silicio e si misura in $[\frac{1}{m}]$

L'andamento dell'equazione 3.4 si può vedere nel grafico della pagina seguente, dove sono riportate alcune curve di assorbimento del silicio per diverse lunghezze d'onda λ . Infatti il coefficiente di assorbimento $\alpha(\lambda)$ dipende dalla lunghezza d'onda e quindi dall'energia stessa dei fotoni e/o particelle in arrivo e si possono notare 2 comportamenti principali:

- i fotoni blu, con $\lambda \approx 400 \text{ nm}$, sono assorbiti quasi immediatamente dal materiale,
- i fotoni rossi con $\lambda \approx 700 \text{ nm}$, sono assorbiti più in profondità dal materiale.

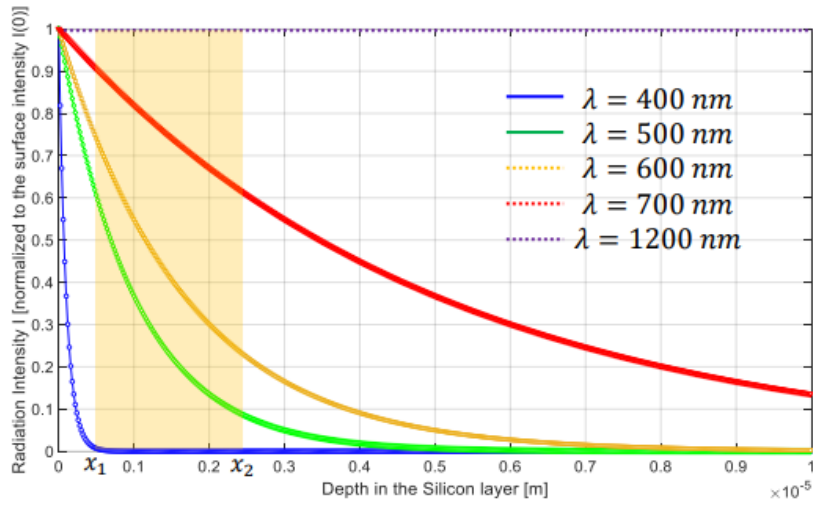


Figura 3.2: Assorbimento nel Silicio in funzione della lunghezza d'onda.

Se invece volessimo calcolare la percentuale dell'intensità radiante incidente che sarà assorbita tra due coordinate di profondità x_1 e x_2 , che potrebbero rappresentare l'estensione della zona svuotata, dovremmo ricorrere ad un'equazione di questo tipo:

$$\Delta I = \frac{I(0)e^{-\alpha(\lambda)x_1} - I(0)e^{-\alpha(\lambda)x_2}}{I(0)} = e^{-\alpha(\lambda)x_1} - e^{-\alpha(\lambda)x_2} \quad (3.5)$$

Guardiamo ora il grafico dove si hanno 2 diverse ordinate, una per $\alpha(\lambda)$ ed una per χ cioè la lunghezza di assorbimento, qui riportato:

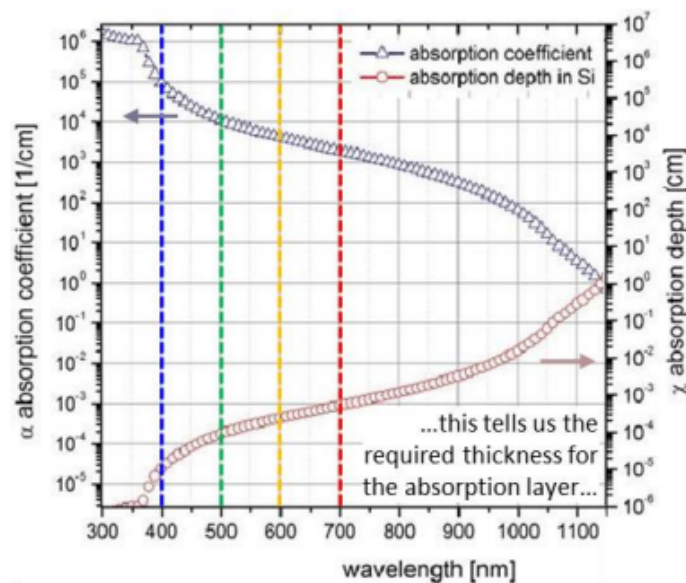


Figura 3.3: Andamento del coefficiente e della lunghezza di assorbimento nel Silicio.

Da questo nuovo grafico si possono dimensionare sia lo spessore del layer attivo, dove verranno assorbiti i fotoni a λ minore e che corrisponde a χ_{active} di qualche centinaio di nm , sia lo spessore del layer di assorbimento, dove verranno assorbiti i fotoni a λ maggiore richiedendo $\chi_{absorption}$ nell'ordine dei μm .

Il fotone incidente, dopo essere entrato nel silicio, verrà assorbito solo se la sua energia sarà superiore all'**energy-gap** del silicio stesso, che è l'energia tra le 2 bande energetiche di valenza e di conduzione, di valore $E_{gap}=E_C-E_V=1.12eV$. Inoltre si ha una relazione che lega tra loro energia del fotone e lunghezza d'onda:

$$E_{photon} = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = \frac{1.24}{\lambda[\mu m]} [eV] \quad (3.6)$$

nella quale spiccano la *costante di Planck*, h , pari a $6.626 \times 10^{-34} Js$, la velocità della luce c pari a circa $3 \times 10^8 \frac{m}{s}$ ed infine ν che è la *frequenza dell'onda*, pari al rapporto $\frac{c}{\lambda}$. Se nell'equazione 3.6 appena mostrata, usassimo come valore dell'energia quella del gap tra le bande del silicio, cioè $E_{gap,Si}$ otterremmo una $\lambda_{cut-off}=1100nm$.

Questo significa ad avere la massima lunghezza d'onda assorbita e di conseguenza rilevabile dal detector in silicio nel vicino *IR*, come visibile nel grafico 3.2.

Quindi se un fotone arriva con energia sufficiente a superare l'energy gap del silicio, verrà assorbito come detto prima e il meccanismo di assorbimento è il seguente:

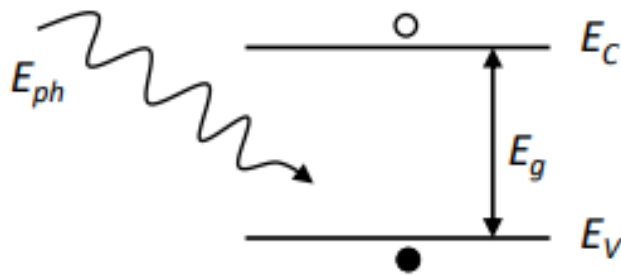


Figura 3.4: Assorbimento del fotone con $E_{photon} > E_{gap}$

cioè il fotone che arriva interagisce con il reticolo cristallino del silicio, creando una coppia elettrone-lacuna, *EHP*, promuovendo quindi un elettrone dalla banda di valenza alla banda di conduzione. L'eccesso di energia viene convertito in calore poiché stimola i fononi. Un altro parametro molto importante nella discussione e quantificazione del segnale generato nel fotodiodo è la *lunghezza di diffusione* che si indica con $\chi_{diffusion}$. In breve è una stima della lunghezza che un portatore minoritario, una lacuna in zona N^+ op-

pure un elettrone in zona P deve percorrere prima che possa ricombinarsi con le cariche maggioritarie. La sua espressione è:

$$\chi_{diff} = \sqrt{D_n \tau_n} \quad (3.7)$$

in cui spiccano il coefficiente di diffusione D_n che deriva dalla relazione di Einstein e descriveremo brevemente e anche il tempo di vita medio dei portatori τ_n .

La relazione di Einstein ci spiega che il coefficiente di diffusione segue la legge:

$$D_n = \mu_n \frac{k_B T}{q} \quad (3.8)$$

in cui si hanno μ che è la **mobilità elettrica** dei portatori e si misura in $[\frac{cm^2}{Vs}]$, la **costante di Boltzmann** k_B e la temperatura T . Riportiamo adesso 2 valori sperimentali per la lunghezza di diffusione:

- $\chi_{diff} > 10\mu m$ con $D_n \approx 10 \frac{cm^2}{s}$ e $\tau_n \approx 1-5\mu s$ nel layer epitassiale in cui si hanno gli elettroni come portatori minoritari,
- $\chi_{diff} < 50nm$ con $D_p \approx 3 \frac{cm^2}{s}$ e $\tau_p \approx 0.1ns$ nel layer attivo superficiale, dove si hanno le lacune come portatori minoritari.

Il tempo di vita medio dei portatori dipende non solo dalla qualità del materiale, ma anche da alcuni fattori come le impurità nel cristallo, il livello del drogaggio, la prossimità della superficie, ecc. . .

Come prossimo step possiamo riassumere quanto visto finora sulla giunzione e sul fotodiode in un'unica immagine per potere ricavare alcune importanti considerazioni:

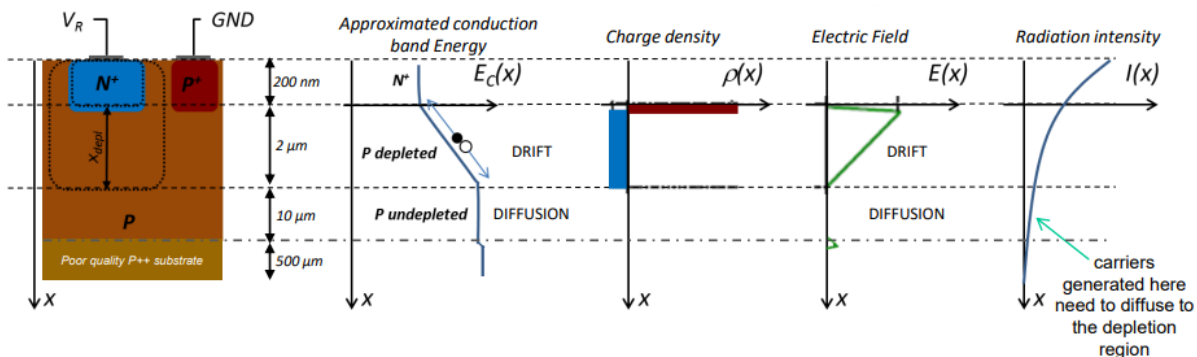


Figura 3.5: Fotodiode: struttura, bande energetiche, densità di carica, campo elettrico e profilo di assorbimento.

I fotoni come si nota nella parte più a destra dove c'è il profilo di assorbimento, riescono a raggiungere quasi la fine della regione meno drogata, ciò significa che riusciranno a generare delle *EHP* in tutto il dispositivo. Tuttavia i portatori che non vengono generati nella regione svuotata non risentono del campo elettrico che li accelererebbe fino a raggiungere i pad esterni, ma dovranno muoversi per diffusione fino a raggiungere la zona svuotata e beneficiare dell'accelerazione imposta dal campo elettrico E_c riportato in figura 3.5.

La percentuale di carica raccolta per diffusione aumenta con l'aumentare della lunghezza d'onda della radiazione incidente. Per tale motivo si cerca di avere regioni poco drogate molto estese, anche se ciò comporterebbe avere anche delle τ più lunghe. Viceversa i fotoni con λ minori e quindi con energia maggiore verranno assorbiti nella regione svuotata, con transitorio veloce grazie all'effetto dell'accelerazione fornita dal campo elettrico presente nella regione svuotata stessa.

Altri 2 parametri molto importanti nei dispositivi di fotorivelazione [9] sono:

- l'*efficienza quantica* che si indica con η ,
- la *responsività* che si indica con R .

L'efficienza quantica è definita come il rapporto tra il numero di elettroni che sono stati generati e il numero di fotoni che incidono sul dispositivo:

$$\eta(\lambda) = \frac{\# e^- \text{ generati}}{\# \text{ fotoni incidenti}} \quad (3.9)$$

Idealmente si vorrebbe avere l'efficienza $\eta(\lambda)$ massima e pari ad 1 su tutto lo spettro cui è sensibile il materiale, avendo qualcosa di simile a quanto si ha in questo grafico:

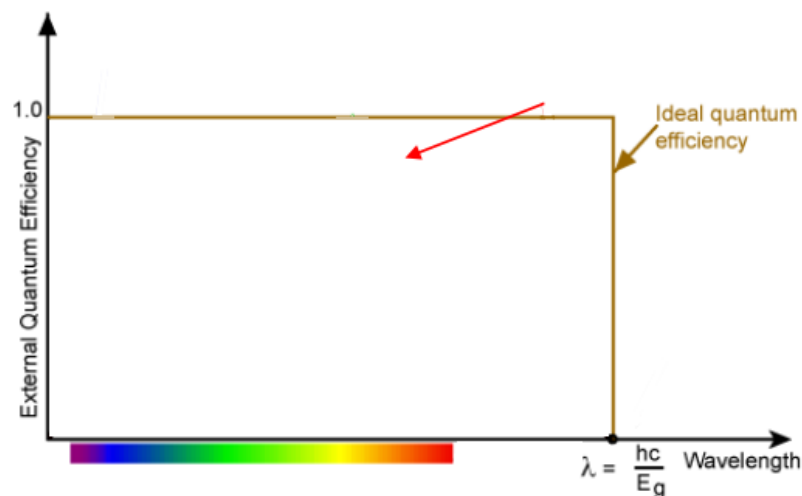


Figura 3.6: Efficienza quantica ideale.

dove l'efficienza è quindi un rettangolo fino a $\lambda_{cut-off} = \frac{hc}{E_{gap}}$. Nella realtà invece l'efficienza non è unitaria, si avrà sempre $\eta < 1$ e per diversi motivi:

- si possono avere delle ricombinazioni in superficie tra i portatori per λ 'corte', quando si sceglie anche una lunghezza del layer attivo $\chi_1 > \frac{1}{\alpha(400nm)}$,
- si possono avere dei portatori che non vengono assorbiti per λ 'lunghe', quando si sceglie anche una lunghezza della regione svuotata $\chi_1 < \frac{1}{\alpha(700nm)}$,
- si ha la trasmissione all'interfaccia aria-silicio non unitaria, ci saranno alcune riflessioni e ciò porta ad avere quindi $T_{Si-Air} < 1$.

A questo punto potremmo riscrivere l'equazione 3.5 in questo modo:

$$\eta(\lambda) = \frac{I(0)e^{-\alpha(\lambda)x_1} - I(0)e^{-\alpha(\lambda)x_2}}{I(0)} \cdot T_{Si-Air}(\lambda) = (e^{-\alpha(\lambda)x_1} - e^{-\alpha(\lambda)x_2}) \cdot T_{Si-Air}(\lambda) \quad (3.10)$$

Come ultimo step sull'efficienza quantica bisogna ricordare che tutti i detector in Silicio sono dei detector *quantici*, cioè qualsiasi fotone che verrà assorbito andrà a generare una EHP, tuttavia si va a perdere in questo modo qualsiasi informazione riguardante la lunghezza d'onda λ o l'energia E_{ph} del fotone incidente. Ciò equivale a dire che il detector è monocromatico. Per recuperare i dettagli persi dei fotoni si possono usare dei filtri colorati in ingresso al fotodiodo, per limitare il range di fotoni in ingresso e creare quindi dei canali ottici, argomento che riprenderemo più avanti nella sezione 3.8. L'equazione dell'efficienza $\eta(\lambda)$ diventerà quindi:

$$\eta(\lambda) = (e^{-\alpha(\lambda)x_1} - e^{-\alpha(\lambda)x_2}) \cdot T_{Si}(\lambda) \cdot T_{filter}(\lambda) \quad (3.11)$$

Passiamo infine alla responsività, che viene indicata con R e si esprime come il rapporto tra la corrente fotogenerata e la potenza ottica incidente. Tradotto in formula si ha:

$$\mathbf{R}(\lambda) = \frac{i_{ph}}{P_{inc}} = \frac{q \cdot \# \text{ elettroni generati al secondo}}{E_{ph} \cdot \# \text{ fotoni incidenti al secondo}} = \frac{q}{E_{ph}} \cdot \eta(\lambda) = \frac{q\lambda}{hc} \cdot \eta(\lambda) \quad (3.12)$$

Va menzionato anche il fatto che se $\eta(\lambda)$ fosse costante avremmo \mathbf{R} che salirebbe a rampa. Avendo a disposizione tutti questi parametri possiamo ora passare a dare una formulazione rigorosa a quella che è la corrente fotogenerata:

$$i_{ph}(\bar{\lambda}) = P \cdot R(\bar{\lambda}) = I \cdot A_{diode} \cdot R(\bar{\lambda}) = \Phi_{ph} \cdot A_{diode} \cdot q \cdot \eta(\bar{\lambda}) \quad (3.13)$$

La corrente, i_{ph} , avrà ovviamente una netta dipendenza dalla potenza ottica incidente P , che si traduce a sua volta in dipendenza dall'intensità luminosa I e quindi anche dall'area del fotodiodo, oltre che dalla *responsività* o dall'*efficienza quantica* che sono invece legate al materiale usato.

3.1.1. La lettura della corrente dal fotodiodo

In questa ulteriore sezione riguardante il fotodiodo, andremo a vedere quali possono essere le tecniche di lettura o readout della corrente che viene fotogenerata oppure della tensione che si sviluppa ai capi del fotodiodo, in modo da potere risalire al flusso di fotoni, all'intensità o potenza incidente. Si possono usare 2 diversi approcci per perseguire tale scopo:

1. utilizzare un amplificatore a *transimpedenza*, un *TIA*, per leggere la corrente i_{ph} ,
2. utilizzare uno stadio ad alta impedenza in ingresso per leggere la tensione ai capi del fotodiodo.

Iniziamo dal TransImpedance Amplifier [12], che è un amplificatore operazionale (*OpAmp*) retroazionato con feedback resistivo negativo, al cui morsetto di ingresso invertente andrà collegato il fotodiodo, in modo da tenere il suo catodo al potenziale di $0V$, massa o *GND*, permettendo quindi di polarizzarlo in inversa. Lo schema circuitale è il seguente:

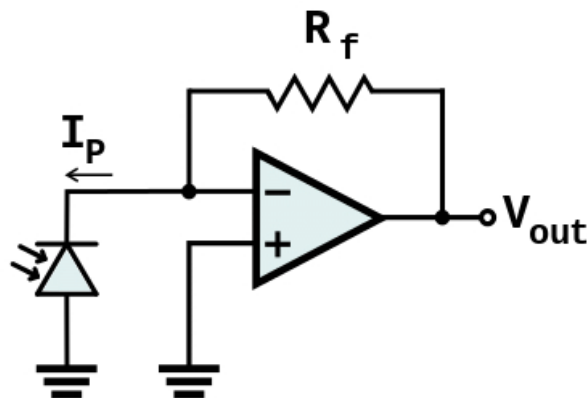


Figura 3.7: Schematico di un *TransImpedance Amplifier*.

Dallo schematico si può notare che la corrente fotogenerata andrà a scorrere nella resistenza di feedback R_f portando l'uscita ad un potenziale pari a:

$$V_{out} = R_f \cdot i_{ph} \propto I_{inc} \propto P_{inc} \quad (3.14)$$

ricordando che la corrente i_{ph} dipende dall'intensità incidente o dalla potenza come appena riportato e come mostrato chiaramente nell'equazione 3.13. Il guadagno di questa configurazione si può calcolare:

$$G = \frac{V_{out}}{i_{ph}} = R_f \quad [\Omega] \quad (3.15)$$

che è proprio un'impedenza in *Ohm* $[\Omega]$ e non un guadagno adimensionale.

Passiamo invece ora all'altra tecnica di lettura del fotodiiodo, che sfrutta dei **MOSFET**. Per quantificare la carica che verrà generata dal fotodiiodo si misurerà in questo caso la tensione sulla capacità di svuotamento, C_{dep} del fotodiiodo impiegando un MOS che, tra le sue possibili modalità di funzionamento, opera come un interruttore per il reset della capacità alla tensione di alimentazione ed altri transistor per la lettura vera e propria. Questa configurazione, viene definita *3T active-pixel* in virtù del fatto che usa 3 transistori MOS, è molto usata in *digital imaging* e sarà di questo tipo [3]:

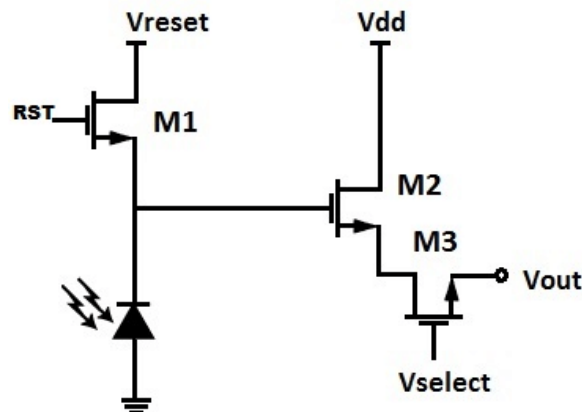


Figura 3.8: Configurazione circuitale di un *3T active-pixel*.

L'acquisizione e la lettura avvengono in 3 fasi distinte:

1. la fase di *reset* in cui la capacità del fotodiiodo, C_{dep} viene resettata alla tensione di alimentazione V_{reset} mediante l'accensione e quindi la chiusura del transistor $M1$,
2. la fase di *integrazione* nella quale la corrente fotogenerata i_{ph} sarà integrata sulla capacità C_{dep} , che di conseguenza si scaricherà leggermente,
3. la fase di *readout*, in cui la tensione $V_{photodiode}$ sarà trasferita in uscita sulla V_{out} attraverso il transistor $M2$ che è in configurazione *source-follower* e l'accensione del transistor $M3$ attraverso V_{select} .

Quanto descritto nel punto 2 si può vedere schematicamente nell'immagine sottostante:

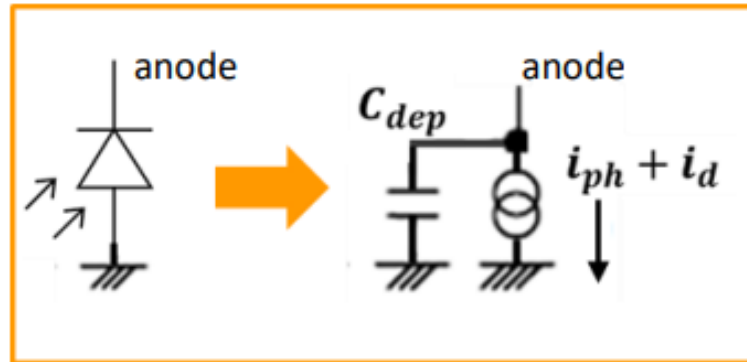


Figura 3.9: Circuito equivalente del fotodiodo in fase di acquisizione.

Come descritto nel punto 2 la corrente fotogenerata, i_{ph} , andrà a confluire nelle capacità del fotodiodo e di gate del transistor, cioè nel parallelo tra la C_{dep} e la C_{gate} , essendo il gate di M2 un'alta impedenza per la corrente.

Dato che l'integrazione della corrente avviene sull'anodo del fotodiodo stesso questo processo prende il nome di *integrazione diretta*.

Potremmo anche ricavare la carica che sarà accumulata nella capacità integrando la corrente nel tempo:

$$Q_{ph} = \int_0^{t_{exp}} i_{ph}(t) dt = i_{ph} \cdot t_{exp} \quad (3.16)$$

Dopo avere integrato la corrente sulla capacità, la tensione ai suoi capi ovviamente diminuirà della quantità:

$$\Delta V_{out} = \frac{Q_{ph}}{C_{dep} + C_{gate}} \quad (3.17)$$

e quindi potremmo anche calcolare il guadagno di conversione tra la tensione in uscita e la carica che è stata generata e poi integrata:

$$G_{conv} = \frac{\Delta V_{out}}{N_{el}} = \frac{Q_{ph}}{N_{el} \cdot (C_{dep} + C_{gate})} = \frac{q \cdot N_{el}}{N_{el} \cdot (C_{dep} + C_{gate})} = \frac{q}{C_{dep} + C_{gate}} \quad (3.18)$$

che si misura in $[\frac{\mu V}{e^-}]$, i cui valori tipici sono dell'ordine dei $100 \sim 200 [\frac{\mu V}{e^-}]$.

Quello che accade durante le 3 fasi dell'acquisizione può essere visto in questo modo:

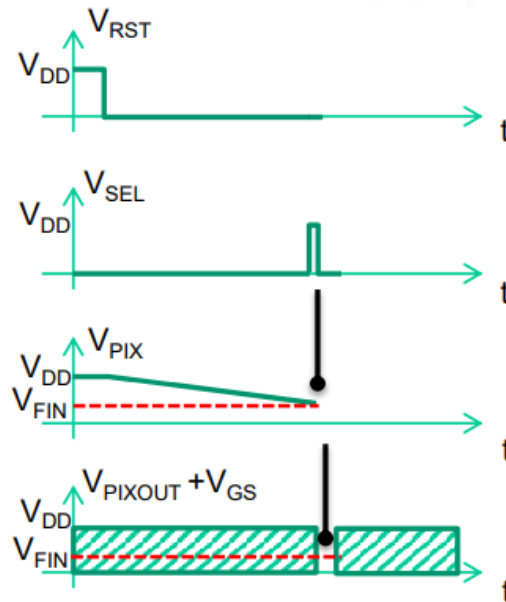


Figura 3.10: Andamento dei potenziali sulla capacità e sull'uscita del pixel.

Per entrambe le tipologie di lettura si avranno delle **non idealità**, che portano ad avere dei valori in uscita leggermente differenti da quelli attesi. Tali effetti possono essere di tipo *deterministico*, cioè degli **offset** e sono rimovibili con delle *calibrazioni*. Un esempio di offset può essere ad esempio la $V_{gs,M2}$ nell'architettura 3T.

Un altro tipo di non idealità di tipo *statistico* sono le fonti di **rumore** che possono essere mitigate con un buon design del fotodiodo oppure con delle tecniche di filtraggio dei segnali avanzate. Tratteremo il *rumore* con maggiore dettaglio nella relativa sezione a lui dedicata, la 3.7.

Un fotodiodo è quindi un sensore in grado di misurare quanta luce sta incidendo su di esso e nel corso degli anni ne sono stati sviluppati e prodotti svariati tipi, sempre più avanzati. Un prodotto di questo genere progettato, sviluppato e realizzato da *STMicroelectronics* è il sensore **VD6283TX**, da noi chiamato con l'appellativo *Rainbow*. Nel corso di questo lavoro abbiamo caratterizzato tale sensore in modo da capire quali fossero le sue caratteristiche, le sue effettive potenzialità e le sue possibili applicazioni pratiche.

3.2. Le caratteristiche del *Rainbow*

Il **VD6283TX**, nome commerciale *Rainbow*, è un sensore di *STMicroelectronics* di tipo spettrometrico che consente di misurare la radiazione ottica e le sue componenti cromatiche o spettrali principali, nella modalità *Ambient Light Sensing*, operando su più canali come potremo vedere a breve ed è anche in grado inoltre di estrarre le informazioni sul *flickering*, che può essere visto come un disturbo in frequenza o uno *sfarfallio*, della sorgente luminosa che stiamo esaminando.

Le caratteristiche principali di questo sensore sono [15]:

- *Miniaturizzazione*: dimensioni pari a 1.83 x 1.0 x 0.55 mm
- Package di tipo *BGA* risaldabile con 6 pads
- Copertura superiore in vetro
- Funzionamento *ALS* con 6 canali indipendenti disponibili
- Sensing *ALS* parallelo su tutti e 6 i canali
- Filtri ottici ibridi avanzati con alta risposta in conteggio dei fotoni
- Estrazione della componente di flicker della sorgente in frequenza da $100Hz$ a $2kHz$
- Interfaccia *I²C* con velocità di trasferimento fino a $1Mbit/s$ in Fast Mode Plus
- 1.8V power supply (**VDD**) e basso consumo di potenza
- Corrente assorbita I_{max} nel range 760-850 μA operando con *ALS* su 6 canali
- Temperatura di esercizio da $-30^{\circ}C$ a $85^{\circ}C$
- I dati riguardo l'*ALS* vengono forniti su formato binario a 16bit oppure a 24bit per aumentare la risoluzione in caso di scarsa luce ambientale

Con tali caratteristiche alcune delle possibili applicazioni del *Rainbow* potrebbero essere:

- *True-Tone color sensing* per la correzione della luminosità nei display e/o assistenza nel bilanciamento del colore bianco
- Misure riguardo l'intensità luminosa (*Lux*) e la *CCT* (Correlated-Color Temperature)
- Correzione dell'*effetto banding* nei video oppure eventuale controllo sulla sicurezza dell'esposizione all'occhio umano.

Per quanto riguarda le 2 modalità di sensing, cioè ALS e flicker, bisogna dire che lavorando in ALS è possibile effettuare il sensing in parallelo sui 6 canali mentre il sensing del flicker si può effettuare solamente su singolo canale. Anche ALS e flicker possono essere a loro volta misurati contemporaneamente ma il canale acquisito per il flicker non può essere usato ai fini dell'ALS. Di tale sensore oltre alla versione BGA appena menzionata esiste una versione su flex che era disponibile in laboratorio e che possiamo vedere di seguito:

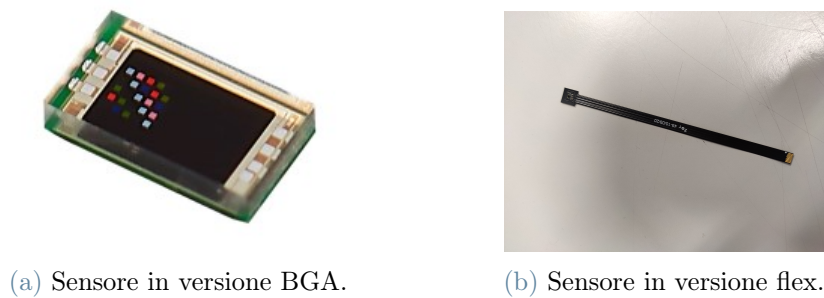


Figura 3.11: Versioni del sensore disponibili.

3.3. La struttura fisica

Proseguiamo la trattazione con la descrizione dettagliata sulla realizzazione effettiva del sensore *Rainbow* su silicio fornendo uno scorcio sulla vista d'insieme sul sensore on chip a livello di sistema:

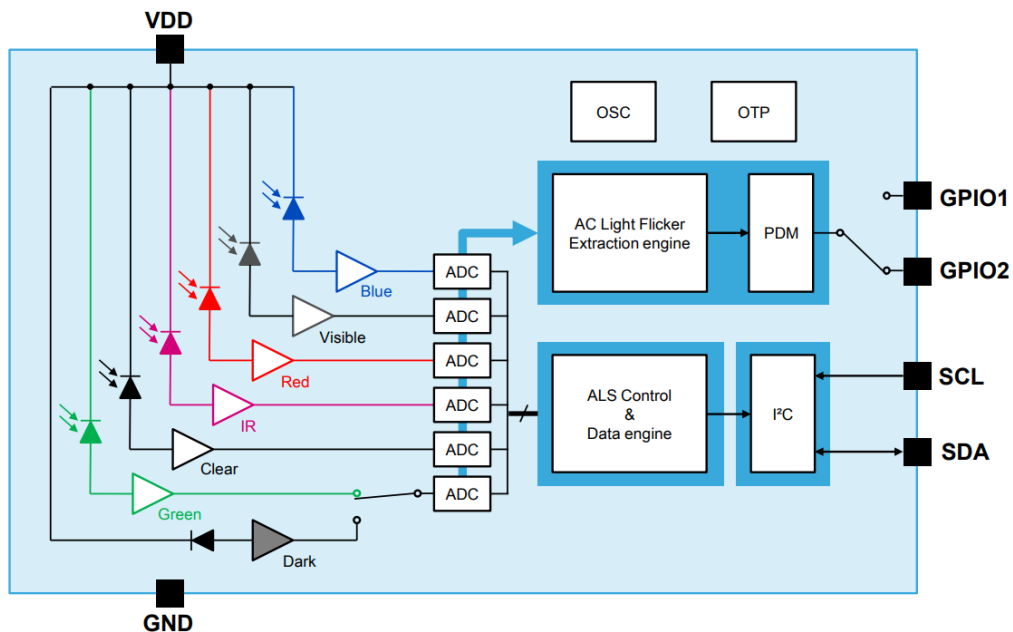


Figura 3.12: Schematico del Rainbow

Passiamo ora ad elencare e descrivere brevemente tutti i suoi componenti:

- i canali ottici di acquisizione che sono 6 e saranno descritti nel paragrafo 3.3.1 con i relativi amplificatori a guadagno variabile, *VGA*, che saranno a loro volta descritti nella sezione 3.5
- *OSC* è l'oscillatore interno del *Rainbow* e viene usato per avere un riferimento sul tempo di esposizione, vedremo come nel paragrafo 3.5.1
- *OTP* è la memoria di tipo *one time programmable* nella quale vengono memorizzati i parametri di calibrazione per ogni canale del sensore, che sono ricavati in fabbrica da *ST*
- *ADC* è l'*analog-to-digital converter*, componente che riceve in ingresso un dato analogico e lo converte in digitale su un set di N bit, che nel caso del *Rainbow* possono essere 16 oppure 24 come visto precedentemente nella sezione 3.2
- *ALS Control & Data engine* è il core che si occupa di tutta la parte di lettura dei dati dall'*ADC* per poi trasmetterli attraverso il protocollo *I²C* usando le linee *SCL* per tutta la parte di controllo e la linea *SDA* per il flusso dei dati
- *AC Light Flicker Extraction Engine* invece è il core che si occuperà di analizzare i dati che proverranno da uno dei canali tra i 6 disponibili per estrarre i dati sul flickering
- *PDM* è il pulse density modulator (come un'onda quadra modulata in densità) che metterà poi in uscita su uno dei 2 pin disponibili del *GPIO* i dati ricavati del flickering che dovranno poi essere filtrati con una rete passiva di tipo *RC*, che è un *LPF* cioè un '*low-pass filter*', in modo da avere un segnale analogico riportato in banda-base.

Infine questo sensore è in grado di fornire due diversi tipi di misura:

1. *Single-Shot Acquisition*, ossia singola acquisizione della luce ambientale
2. *Continuos-Mode Acquisition*, ossia acquisizioni ripetute che vengono intervallate dal parametro *Inter-Measuremenet Period* che sarà descritto nella sezione 3.5.

3.3.1. I 6 canali ottici

Come si può vedere dal suo schematico, il sensore non è realizzato in modo da avere un singolo canale di acquisizione, ma ne ha ben 6. Quindi al suo interno non avrà un singolo fotodiodo ma una matrice di fotodiodi, di cui quasi tutti sono ricoperti con degli speciali

filtri ottici che servono a filtrare la luce incidente, in modo da rendere i diversi fotodiodi sensibili solo ad alcune regioni, cioè intervalli di lunghezze d'onda, dello spettro cui sono sensibili, che va dal vicino blu, $\lambda \sim 400nm$, al vicino *IR*, $\lambda \sim 1000nm$. Per la precisione nel Rainbow sono stati *realizzati* 6 canali ottici di acquisizione in ognuno dei quali si avranno più fotodiodi come vedremo nell'immagine 3.13.

I canali che quindi vengono realizzati sono:

1. *Red*,
2. *Blu*,
3. *Green*,
4. *Visible*, che è la somma dei primi 3 canali,
5. *IR*, che è il canali dedicato ai raggi *infrarossi*,
6. *Clear* che è un canale i cui fotodiodi non sono ricoperti da alcun filtro e quindi possono assorbire tutte le componenti della radiazione luminosa incidente.

Vi è in realtà anche un *settimo canale*, come si era visto nello schematico del *Rainbow* nella sezione 3.3. Tale canale è quello di buio, ossia il *dark*, che si può usare per avere un riferimento sulla corrente di buio e che come visto nell'immagine 3.12 è connesso tramite uno *switch* sul canale 4 che è il *green* come appena visto.

Nell'immagine sottostante si può vedere in che modo sono suddivisi i fotodiodi nel sensore:

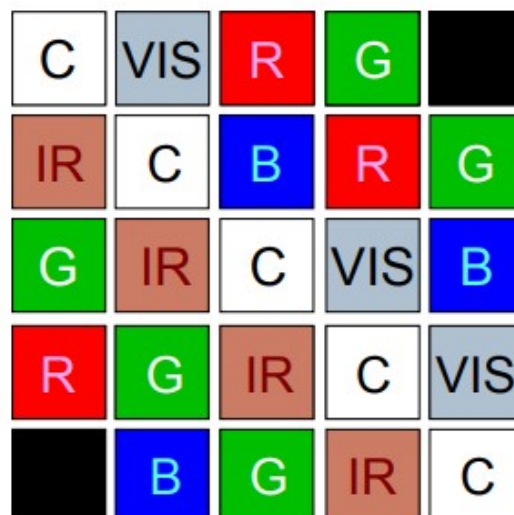


Figura 3.13: Matrice dei fotodiodi del *Rainbow*

Guardando la figura 3.13 si possono contare in totale 25 fotodiodi, così ripartiti:

- 3 fotodiodi per il canale *Red* (**R**)
- 3 fotodiodi per il canale *Visible* (**VIS**)
- 3 fotodiodi per il canale *Blu* (**B**)
- 5 fotodiodi per il canale *Green* (**G**)
- 4 fotodiodi per il canale *IR* (**IR**)
- 5 fotodiodi per il canale *Clear* (**C**)
- 2 fotodiodi coperti per avere il riferimento di *buio*

Per quanto concerne i filtri ottici ed i loro trasferimenti sia a livello teorico che pratico si rimanda alla sezione 3.8 di questo capitolo.

3.4. La comunicazione seriale

Uno degli scopi principali di questo lavoro di tesi era quello di caratterizzare il sensore appunto, che in termini pratici significa studiare e testare il sensore con un duplice scopo:

- confermare i dati tecnici/prestazionali presenti nel datasheet
- tentare di ricavare i dati rilevanti che sono mancanti nel datasheet.

Quindi per effettuare questa caratterizzazione era necessario testare a fondo il sensore ed in diverse e varie condizioni, ricavarne i dati e poi analizzarli. Per ricavare i dati dal sensore a sua volta, era necessario stabilire un protocollo di comunicazione tra il PC ed il sensore che viene pilotato da un microcontrollore (μC) sempre di *STMicroelectronics* e modello *STM32F302CCT6*, sfruttando la connessione di tipo *USB*. Assieme ai colleghi che si occupano dei firmware dei vari dispositivi abbiamo creato un protocollo di comunicazione, che viene inviato sotto forma di pacchetto dati, riassunto nella seguente immagine:

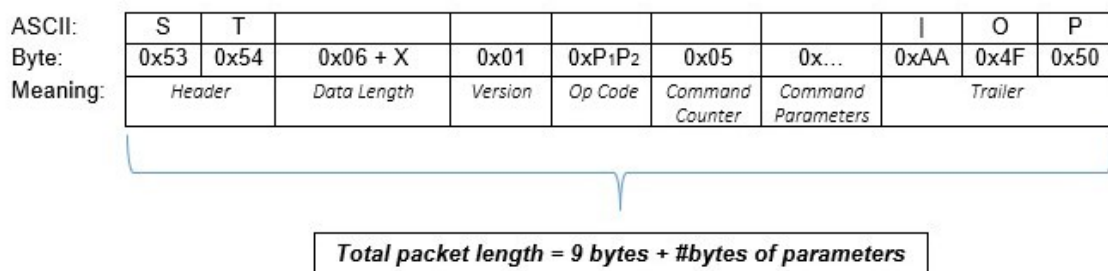


Figura 3.14: Struttura del pacchetto dati.

La lunghezza del pacchetto, come visibile nell'immagine 3.14, sarà dovuta ad una parte con lunghezza sempre fissa pari a 9 byte, mentre la parte variabile sarà dipendente dalla quantità e dal tipo di *parametri* che invieremo al sensore e che vedremo nella sezione 3.5. E' importante potere inviare dei parametri al sensore perché ci permetterà di stabilirne e cambiarne il modo di funzionamento.

Guardando nel dettaglio la struttura del pacchetto dati inviato al sensore possiamo vederne i vari blocchi:

- *Header*: è la parte iniziale del pacchetto trasmesso al μC , formata da 2 byte e per coerenza sono stati scelti i 2 byte che sono le lettere S e T in formato *hex*.
- *Data Length*: è la parte che specifica al μC quanto sarà lungo il pacchetto che si sta trasmettendo, escludendo i 2 byte dell'header.
- *Version*: questo è invece un parametro costante che varrà sempre 1.
- *OpCode*: questo invece è a sua volta la targa identificativa di quelle che sono le modalità di operazione del sensore oppure delle funzioni che possiamo effettuare sul sensore, come il settaggio dei suoi parametri di funzionamento. Saranno descritti a breve nella relativa sezione 3.4.1.
- *Command Counter*: anche questo è un parametro costante che varrà sempre 5.
- *Command Parameters*: questa è la sezione del pacchetto con la quale si passano davvero i parametri al sensore di cui vedremo la loro descrizione e spiegazione sempre nella sezione 3.4.1.
- *Trailer*: questo è l'indicazione della parte finale del pacchetto dati trasmesso e sarà lungo 3 byte.

3.4.1. Gli OpCodes

Come accennato poc'anzi gli *OpCodes* sono gli identificativi delle diverse modalità di funzionamento del sensore e delle possibili operazioni che sono possibili dall'esterno sul sensore.

Daremo una visione d'insieme di tutti gli OpCodes che sono disponibili e che abbiamo sviluppato per il sensore, parlando più nel dettaglio di quelli che sono stati maggiormente usati nel corso di questo lavoro.

Si è anche a disposizione di un piccolo *manuale* con la descrizione dettagliata di tutti gli OpCodes disponibili, dei loro parametri e della modalità di codifica e lunghezza in byte, che è stato redatto all'inizio di questo lavoro.

Mnemonic	Op-Code	Parameters	Description
Who are you?	0x86	None	Returns the board <i>ID</i>
Set exposure time	0x02	Exp.time, float, 4 bytes	Sets the exposure time
Get exposure time	0x88	None	Returns the exposure time
Get saturation level	0x05	None	Returns the saturation level
Set IMT time	0x04	IMT time, float, 4 bytes	Sets the IMT time
Get IMT time	0x03	None	Returns the IMT time
Set Ch.Gain	0x01	Gain, 6*2Bytes	Sets Channel Gain
Get Ch.Gain	0x09	None	Returns Channel Gain
Channel selection	0x...	Channels, 1 byte	Sets acquiring channels
Single-shot	0x07	None	Gives single shot
Continuous-shot	0x06	None	Gives multiple shots
Stop CM shot	0x08	None	Stops CM acquisition
Set Control Dark	0x11	Enabling bit 1 or 0	Enable/Disable Dark mode
Start Flicker mode	0x77	Channel ¹ , Output Mode ²	Start Flicker detection
Stop Flicker mode	0x98	None	Stop Flicker detection
Show Capabilities	0x99	None	Returns sensor details ³

Tabella 3.1: Lista degli OpCodes disponibili.

Note sugli OpCodes:

- ¹ significa che attraverso il parametro *Channel* si può specificare quale dei 6 canali di acquisizione usare per fare la detection del flicker.
- ² significa che attraverso il parametro *Output Mode* possiamo specificare se avere il valore in uscita di tipo analogico o di tipo digitale.
- ³ il comando fornisce informazioni riguardo al sensore come: *# Number Of Channels*, *Flicker detection mode* ma anche *Autogain*, nel caso in cui fosse presente ed è inoltre valido nella maggior parte dei sensori usati.

3.5. I parametri del Rainbow

Dopo avere velocemente esposto nella precedente tabella la lista degli *OpCodes* disponibili, ci potremmo adesso dedicare a quelli che sono i parametri che possono essere forniti al

senso, ma anche alle conseguenze che dipendono da essi e che sono tangibili sulle misure effettuate. I parametri maggiormente utilizzati e variati nel sensore sono ovviamente:

- il tempo di esposizione che viene indicato con T_{exp} ,
- il guadagno analogico degli amplificatori di canale a guadagno variabile (*VGA*) che portano il valore letto dei fotodiodi all'ADC.

Dal tempo di integrazione ovviamente dipenderà linearmente il valore che si ha in uscita dal fotodiodo, perché maggiore sarà il tempo di integrazione impiegato maggiore sarà a sua volta la carica elettrica generata dalla conversione dei fotoni incidenti sul fotodiodo e quindi assorbiti.

D'altro canto invece andare ad aumentare il guadagno corrisponde a moltiplicare a livello analogico il segnale che si ha in uscita dal fotodiodo.

A questo punto è lecito chiedersi quanto valgono sia i valori del guadagno sia i valori del tempo di esposizione che si hanno a disposizione su questo sensore.

3.5.1. Il tempo di esposizione

Come accennato poco prima il tempo di integrazione, che abbiamo indicato con T_{exp} per i nostri scopi e che invece viene indicato come *EXTIME* sul datasheet; permette di informare il sensore su quanto tempo deve permettere alla luce incidente di essere acquisita.

In questo lasso di tempo si avrà il fenomeno della foto-generazione degli elettroni, cioè della carica e quindi del successivo segnale in corrente che potrebbe essere misurato con un *TIA*, transimpedance amplifier visto in precedenza, in cascata al fotodiodo. Per quanto riguarda questo parametro potremmo definire le seguenti proprietà:

- il tempo di esposizione minimo che può essere impostato vale $T_{exp,min} = 1.6ms$,
- il tempo di esposizione massimo che può essere impostato vale $T_{exp,max} = 1.6s$,
- il tempo di esposizione predefinito vale $T_{exp,default} = 80ms$.

Come si può intuire dai 2 valori limite riportati, si può spaziare col tempo di esposizione in un range che è pari a 1000 volte circa il tempo di esposizione minimo.

Infatti nel Rainbow questo parametro è codificato con 10bit, che riportando da codifica binaria a codifica decimale significa avere al 2^{10} , cioè 1024 intervalli, che chiameremo steps.

Quindi ciò che noi dovremmo fornire al sensore è il valore degli steps che dovrà impiegare

per raggiungere il T_{exp} desiderato a partire dal $T_{exp,min}$, secondo la relazione espressa tramite la seguente equazione:

$$EXPTIME = (EXTIME [9 : 0] + 1) \cdot \frac{16384}{F_{osc}} \quad (3.19)$$

Nell'equazione possiamo definire:

- $EXTIME [9:0]$ che è la conversione del numero di steps (≈ 1024) in binario su 10 bit,
- $F_{osc}=10.24MHz$ è la frequenza dell'oscillatore che si ha sul chip, a bordo del *Rainbow*.

Sul sensore si hanno anche per questo parametro 2 appositi registri con relativi indirizzi:

Descrizione	Indirizzo	Tipo Accesso
ALS_EXPOSURE_HIGH	0x1D	Read/Write
ALS_EXPOSURE_LOW	0x1E	Read/Write

Tabella 3.2: Registri del T_{exp} e loro indirizzi.

Infine possiamo vedere come si trasmette il pacchetto dati per il setting del tempo di esposizione desiderato:

S T	0x06	0x01	0x02	0x05	$P_1 ... P_4$	0xAA 0x4F 0x50
Header	Data Length	Version	OpCode	Com. Counter	Parameters	Trailer

Tabella 3.3: Pacchetto per impostazione del $T_{exposure}$.

Nella parte dei parametri si nota che il valore del tempo di esposizione desiderato deve essere convertito in *floating point* su 4 byte per poter essere trasmesso al sensore con il relativo comando:

0x.. 0x... 0x... 0x...
Exposure time

Tabella 3.4: Parametri di esposizione su 2 byte.

Ultima nota da ricordare è che per ogni acquisizione che giunge dal sensore è necessario attendere circa $T_{elaboration}=6ms$ che è il tempo impiegato per elaborare i dati acquisiti e

trasferirli in uscita.

Tale tempo ovviamente andrà ad influire sul *frame-rate* del sensore, che ci restituisce la massima frequenza di acquisizione del sensore quando opera in *Continuous Mode* poiché per una singola misura si dovrà attendere:

$$T_{measure} = T_{exposure} + T_{elaboration} \quad (3.20)$$

Quindi il *frame rate* ottenibile sarà pari a:

$$frame\ rate = \frac{1}{T_{measure}} \quad (3.21)$$

e si misura in **fps** che significa appunto *frames per seconds*.

3.5.2. L'Inter-Measurement Period

Un altro parametro del *Rainbow* di tipo temporale è l'*Inter-Measurement Period*, indicato con *IMP*, già accennato nella descrizione generale del sensore ad inizio capitolo. In quella occasione era stato riportato che grazie a tale parametro è possibile intervallare 2 acquisizioni successive nel momento in cui il sensore va ad operare in continuous mode. Anche l'IMP, come d'altronde il T_{exp} avrà i suoi valori limite che sono:

- $IMP_{min} = 0ms$,
- $IMP_{max} = 5.22s$.

Anche per questo parametro si avrà a bordo del sensore un apposito registro sempre da 8bit in cui scrivere il valore dell'IMP di cui si necessita. Ciò significa avere 255 steps per l'IMP e ogni singolo step equivale a:

$$\Delta IMP = \frac{5.22s}{255steps} = 20.5ms \quad (3.22)$$

Il valore di IMP andrà scritto in *floating point* su 2 byte come già spiegato per il T_{exp} , visibile in tabella 3.4.:

Descrizione	Indirizzo	Tipo Accesso
ALS_PERIOD	0x04	Read/Write

Tabella 3.5: Registro dell'IMP e relativo indirizzo.

Il valore dell'IMP impostato si ottiene con la seguente equazione:

$$IMP = (ALS_Period [7 : 0] + 1) \cdot \Delta IMP \quad (3.23)$$

3.5.3. Il guadagno analogico

Dopo avere descritto, discusso e visto come si configurano sul sensore i parametri di tipo temporale possiamo passare ora al parametro *guadagno analogico*. I possibili valori del guadagno che si possono impostare sono un set discreto, riassunto nella seguente tabella:

Value	LSB	Hex	Value	LSB	Hex
Reserved	0000	0x0000	5x	1000	0x0500
66.6x	0001	0x42AB	3.33x	1001	0x0354
50x	0010	0x3200	2.5x	1010	0x0280
33.3x	0100	0x1900	1.25x	1100	0x0140
25x	0011	0x2154	1.67x	1011	0x01AB
16.67x	0101	0x10AB	1x	1101	0x0100
10x	0110	0x0A00	0.87x	1110	0x00D4
7.14x	0111	0x723	0.71x	1111	0x00B5

Tabella 3.6: Lista dei guadagni analogici e dei loro valori.

Il valore del guadagno può inoltre essere settato singolarmente per ognuno dei canali ottici di acquisizione che si hanno a bordo. Nel sensore vi sono dei registri appositi per i canali, in cui memorizzare o da cui leggere i valori di guadagno, con relativi indirizzi che sono riassunti nella tabella:

Descrizione	Indirizzo	Tipo Accesso
ALS_CH_GAIN_CH1	0x25	Read/Write
ALS_CH_GAIN_CH2	0x26	Read/Write
ALS_CH_GAIN_CH3	0x27	Read/Write
ALS_CH_GAIN_CH4	0x28	Read/Write
ALS_CH_GAIN_CH5	0x29	Read/Write
ALS_CH_GAIN_CH6	0x2A	Read/Write

Tabella 3.7: Indirizzi dei registri di guadagno.

Quindi basta semplicemente accedere ad ognuno di questi registri per modificare il valore del gain per quello specifico canale. Si dovrà scrivere nel registro il valore del gain desiderato in formato **hex**, cioè esadecimale, che si può leggere nella tabella 3.6 su 2 byte. Per completezza riportiamo a seguire il pacchetto dati da inviare appositamente per impostare o cambiare il guadagno nei canali, con il relativo OpCode che è lo '0x03':

S T	0x06	0x01	0x03	0x05	$P_1 ... P_{12}$	0xAA 0x4F 0x50
Header	Data Length	Version	OpCode	Comm. Counter	Parameters	Trailer

Tabella 3.8: Pacchetto per impostazione del guadagno.

Mentre la stringa dei parametri, che sappiamo dovrebbe essere su 12 byte sarà così formata:

0xAB 0x42	0xAB 0x42	0xAB 0x42	0xAB 0x42
Ch1_Gain	Ch2_Gain	Ch5_Gain	Ch6_Gain

Tabella 3.9: Parametri del pacchetto dati di guadagno.

3.6. I valori di saturazione

Dopo avere effettuato una misura il sensore fornisce in uscita dei dati di tipo digitale, su una dinamica dell'ADC che può essere di *16 bit* oppure anche di *24 bit*. Durante questo lavoro abbiamo sempre sfruttato la dinamica a 24bit da avere un valore di *saturazione* abbastanza elevato che non desse alcune limitazione.

E' importante anche ricordare che lavorando con qualsiasi tipo di sistema, che sia analogico o digitale, si raggiunge la condizione di saturazione non appena si tocca in uscita quello che è il valore massimo rappresentabile dal sistema stesso. Nel caso del *Rainbow* però siamo di fronte ad una condizione che può assumere un doppio aspetto e ciò sarà anche dovuto al valore di T_{exp} che sarà impiegato: si ha cioè un preciso valore di tempo di esposizione che vale $T_{exp,threshold}=113.6ms$.

Al di sotto di tale tempo il valore di saturazione dipenderà linearmente dal T_{exp} mentre nel caso in cui il tempo di esposizione sia superiore il valore di saturazione sarà invece costante. Riassumiamo quanto descritto, partendo dal primo caso:

- $ADC_{out,max} = 910 \cdot \frac{counts}{step} \cdot \frac{T_{exp}}{T_{exp,min}}$ se si imposta $T_{exp} < 113.6ms$
- $ADC_{out,max} = 2^{16}-1 = 65536$ counts se si imposta $T_{exp} \geq 113.6ms$

Questi valori si avranno a loro volta quando lavoreremo con 16bit di dinamica dell'ADC; mentre se la dinamica venisse spinta sui 24bit si avrebbe:

- $ADC_{out,max} = 255 \cdot 910 \cdot \frac{counts}{step} \cdot \frac{T_{exp}}{T_{exp,min}}$ se si imposta $T_{exp} < 113.6ms$
- $ADC_{out,max} = (2^{16+8})-1 = 16777215$ counts se si imposta $T_{exp} \geq 113.6ms$

Come si può notare la differenza tra i valori massimi di uscita è pari a 255 che corrisponde a 2^8-1 , cioè avere nella codifica altri 8 *bit* aggiuntivi nella dinamica.

3.7. Il rumore di buio

Come accennato precedentemente alla fine del paragrafo 3.1, nei fotodiodi ed in qualsiasi altro tipo di dispositivo elettronico si possono avere delle non idealità che avevamo classificato in deterministiche, rimovibili tramite una calibrazione ad esempio, ed in statistiche, il cui tipico esempio può essere il rumore elettronico che richiede in genere delle tecniche avanzate di fabbricazione o elaborazione dei dati per la sua riduzione; poiché non è possibile eliminarlo del tutto.

Ma cerchiamo di fornire una spiegazione riguardo che cosa sia e perché si ha il rumore. Ad esempio potremmo supporre, nel nostro caso, di volere effettuare una misura per quantificare l'intensità luminosa incidente sul fotodiodo. Siamo a conoscenza del fatto che in uscita dal nostro sistema formato da sensore ed elettronica connessa avremmo in uscita il segnale di nostro interesse che potrebbe essere in tensione o in corrente e potremmo indicarlo indicarlo con:

$$y(t) = s(t) \tag{3.24}$$

Ma quella appena illustrata è una situazione del tutto ideale, poiché nella realtà si avrà un segnale che non è così pulito, ma che sarà la somma di più contributi e si può così esprimere:

$$y(t) = s(t) + n(t) + d(t) \tag{3.25}$$

Sul segnale $s(t)$ di nostro interesse saranno quindi sovrapposte altre 2 componenti, $n(t)$ che è il rumore e $d(t)$ che sono gli offset e rappresentano proprio le 2 classi di non idealità che erano state introdotte in precedenza. Il rumore può essere visto come un disturbo variabile nel tempo che si sovrappone al segnale utile e viene generato in prima definizione dalle fluttuazioni statistiche generate dai processi fisici che sono alla base stessa del

funzionamento dei dispositivi. Per tale motivo il rumore non è del tutto eliminabile, sarà sempre presente e quello che si può fare sarà solamente ridurre il suo effetto sul segnale stesso. Il rumore si può definire come stazionario e gaussiano e ciò significa supporre che le fluttuazioni avranno quindi una distribuzione di ampiezza gaussiana a valore medio nullo del tipo:

$$p(\bar{v}) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \cdot \exp\left(-\frac{\bar{v}^2}{2\sigma^2}\right) \quad (3.26)$$

in cui $p(\bar{v})$ indica quella che è la probabilità di avere una fluttuazione del segnale dovuta al rumore mentre σ è lo scarto quadratico medio (valore RMS) di tale fluttuazione, che descriveremo nel seguito. L'andamento del rumore che si sovrappone al segnale è:

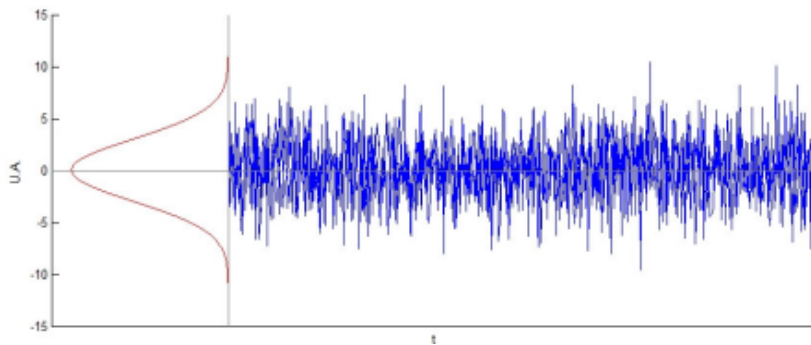


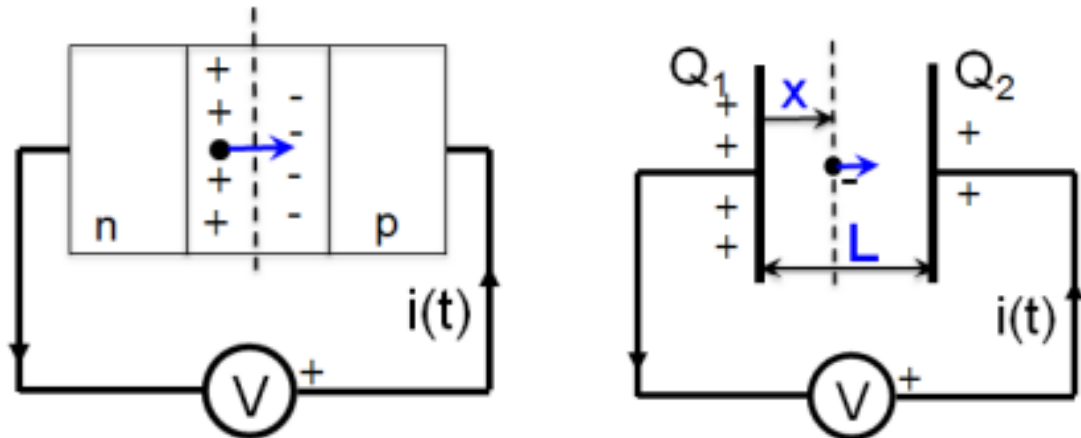
Figura 3.15: Rappresentazione schematica del rumore stazionario gaussiano.

Adesso invece proveremo a dare una spiegazione più formale ed una espressione più rigorosa al rumore proprio di una giunzione p-n.

Dalla teoria sappiamo che la corrente che attraversa la giunzione in condizioni stazionarie è determinata dal passaggio di cariche elettriche aventi natura discreta. Il numero medio di cariche che attraversa la giunzione per unità di tempo è fissato dalla corrente di polarizzazione essendo $I = \frac{dq}{dt}$, il numero effettivo di cariche che istante per istante supera la barriera di potenziale alla giunzione è soggetto a fluttuazione statistica.

Per schematizzare il fenomeno consideriamo il contributo alla corrente determinata da una singola carica elementare che attraversa la giunzione.

Le figure a seguire rappresentano schematicamente un elettrone mentre si muove nella zona di carica spaziale e la situazione dal punto di vista elettrostatico, che è del tutto simile a quella di una carica che si muove tra i due piatti di un condensatore a facce piane e parallele, la cui differenza di potenziale di polarizzazione è fissata da un generatore esterno di valore V .



(a) Elettrone in transito nella zona svuotata di una giunzione p-n.

(b) Elettrone in transito tra le armature di un condensatore.

Figura 3.16: Modelli di elettrone in movimento ai fini del rumore.

Come si può vedere nel modello a condensatore l'elettrone in movimento induce carica sui due terminali. Detta L la lunghezza della zona svuotata, che sarà pari al gap tra le armature nel modello equivalente, le cariche indotte saranno pari a:

$$Q_1 = q \frac{L-x}{L} \quad Q_2 = q \frac{x}{L} \quad (3.27)$$

la cui somma Q_1+Q_2 sarà sempre pari a q . La corrente indotta nel circuito esterno dallo spostamento del suddetto elettrone sarà invece:

$$i(t) = \frac{dQ_2}{dt} = \left| \frac{dQ_1}{dt} \right| = \frac{q}{L} \cdot \frac{dx}{dt} = \frac{q}{L} \cdot v(t) \quad (3.28)$$

che ovviamente è dipendente dalla velocità istantanea dell'elettrone.

L'elettrone ha 2 possibili scenari per il suo moto:

- se si muovesse nel vuoto, ogni carica contribuirebbe alla corrente con un impulso di tipo triangolare di durata pari al tempo di transito T e area pari a q ,
- se si assumesse invece che la velocità di deriva della carica sia pari alla velocità di saturazione, l'impulso avrebbe una forma rettangolare.

Nell'immagine a seguire si mostreranno entrambe le possibili forme per gli impulsi di corrente.

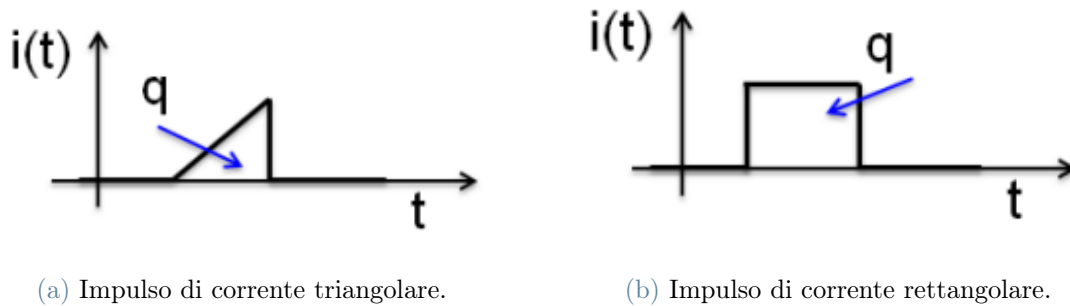


Figura 3.17: Forme d'onda degli impulsi di corrente per un elettrone in accelerazione tra due armature nel vuoto e in transito a velocità saturata nella zona di carica spaziale di una giunzione p-n.

In una giunzione reale invece la forma dell'impulso è l'unione delle 2 forme il cui risultato sarà un impulso di forma trapezoidale, ma il nodo principale della trattazione è che la corrente è il risultato della somma di forma definita, di area pari a q :

$$i(t) = q \cdot h(t) \quad (3.29)$$

che insorgono ad istanti casuali da cariche tra loro indipendenti. Questo effetto conduce al fatto che la corrente non è costante ma avrà delle fluttuazioni attorno al suo valore medio. Questo rumore, che è generato dalla natura discreta dei portatori, è detto "*rumore shot*". Il prossimo step ora sarà quello di ricavare il valore quadratico medio di queste fluttuazioni, legandole alla condizione di polarizzazione della giunzione p-n stessa ed alle altre grandezze in gioco.

Per schematizzare quantitativamente il processo si consideri la corrente scomposta nella sovrapposizione di impulsi elementari di area q e forma $h(t)$. Nella realtà gli impulsi hanno durata finita ma questa condizione sarà recuperata nel seguito senza alcuna perdita di generalità. Per condizione di normalizzazione sull'area dell'impulso elementare, si ha:

$$\int_0^{+\infty} h(t) dt = 1 \quad (3.30)$$

Grazie alla definizione di corrente elettrica possiamo calcolare il tasso medio dei portatori di carica che attraversano la giunzione nell'intervallo di tempo pari ad 1s:

$$\beta = \frac{I}{q} \quad (3.31)$$

e questo corrisponde al tasso medio con cui insorgono gli impulsi elementari che costituiscono la forma d'onda di corrente. Essendo questi eventi tra loro indipendenti, la probabilità, $p(t)dt$, che insorga un impulso tra l'istante t e l'istante $t+dt$ è data da $p(t)dt = \beta \cdot dt$. Per esempio una corrente media di $1pA$ corrisponde al transito di $\beta=6.25 \cdot 10^5$ portatori/s, ad un tempo medio di $160ns$ tra un impulso e il successivo e quindi ad una probabilità di $6.25 \cdot 10^{-3}$ impulsi nell'intervallo di tempo $\Delta t = 1ns$.

Si consideri ora la corrente misurata all'istante t . Essa sarà data dalla sovrapposizione dei contributi dovuti agli impulsi insorti prima dell'istante di osservazione, t .

Per indirizzare questi contributi è utile introdurre una ascissa supplementare, x , che ha origine in t e procede in direzione opposta a quella dell'asse dei tempi:

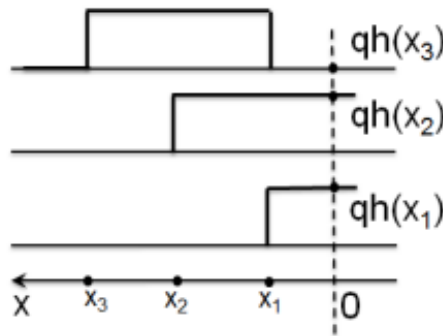


Figura 3.18: Valutazione del valore medio di corrente costituito dalla sovrapposizione di impulsi di forma costante.

Utilizzando questa notazione è facile rendersi conto che la corrente all'istante t può essere scritta simbolicamente come:

$$i(t) = qh(x_1) + qh(x_2) + \dots + qh(x_n) \quad (3.32)$$

Per valutare la corrente media all'istante t , si tratta di pesare il primo contributo con la probabilità βdx_1 che esso sia insorto tra x_1 e x_1+dx_1 , il secondo con la probabilità βdx_2 che esso sia insorto tra x_2 e x_2+dx_2 etc... Passando dal discreto al continuo si può scrivere:

$$\begin{aligned} \langle i \rangle &= \langle qh(x_1) + qh(x_2) + \dots + qh(x_n) \rangle = q \langle h(x_1) + h(x_2) + \dots + h(x_n) \rangle = \\ &= q\beta \int_0^{+\infty} h(x) dx = q\beta \end{aligned} \quad (3.33)$$

Il risultato ci dice che la corrente media è pari al tasso medio di impulsi per la relativa area (unitaria), corrisponde alla carica elementare. Con la medesima procedura si può ricavare il valore quadratico medio di questo processo. Adottando la notazione discreta, il valore quadratico della corrente all'istante t potrebbe essere così scritto:

$$i^2(t) = [qh(x_1) + qh(x_2) + \dots + qh(x_n)]^2 = q^2h(x_1)^2 + q^2h(x_2)^2 + \dots + q^2h(x_n)^2 + qh(x_1)qh(x_2) + qh(x_2)qh(x_1) + \dots \quad (3.34)$$

in cui si nota chiaramente che la prima parte dell'espressione contiene i termini quadratici dei singoli impulsi mentre la seconda contiene i termini che nascono dal prodotto delle forme generate da due impulsi. Per valutare ora la media, si moltiplica ogni contributo per la probabilità βdx che esso insorga all'istante indicato, ottenendo:

$$\langle i^2 \rangle = \int_0^{+\infty} q^2 h^2(x) \beta dx + \int_0^{+\infty} \int_0^{+\infty} [qh(x)] \beta dx \cdot [qh(y)] \beta dy \quad (3.35)$$

Nei termini misti, per distinguere i contributi dovuti a 2 impulsi indipendenti, sono impiegate 2 ascisse indipendenti e l'integrazione è stata estesa ad entrambe le coordinate:

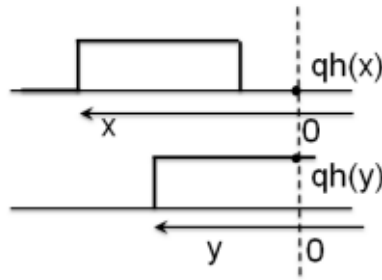


Figura 3.19: Valutazione del valore quadratico medio.

Riordinando i termini e sfruttando sempre la normalizzazione di $h(t)$ si ottiene:

$$\langle i^2 \rangle = q^2 \beta \int_0^{+\infty} h^2(x) dx + \int_0^{+\infty} qh(x) \beta dx \cdot \int_0^{+\infty} qh(y) \beta dy = q^2 \beta \int_0^{+\infty} h^2(x) dx + (q\beta)^2 \quad (3.36)$$

Essendo quindi in presenza di una variabile statistica X e volendo ricavare la varianza del processo si deve ricorrere all'equazione a seguire e che sarà richiamata in causa nel paragrafo 4.1.3 del capitolo 4:

$$\sigma_x^2 = \langle X^2 \rangle - \langle X \rangle^2 \quad (3.37)$$

Tornando alla nostra corrente di giunzione il calcolo della sua varianza di processo sarà:

$$\sigma_I^2 = \langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2 = q^2 \beta \int_0^{+\infty} h^2(x) dx + (q\beta)^2 - (q\beta)^2 = q^2 \beta \int_0^{+\infty} h^2(x) dx \quad (3.38)$$

e ricordando che il prodotto tra la carica ed il tasso medio dei portatori è equivalente all'inverso della definizione di corrente, $q \cdot \beta = I$, si giunge infine ad avere la nota espressione del rumore shot di corrente di giunzione:

$$\sigma_I^2 = qI \int_0^{+\infty} h^2(x) dx \quad (3.39)$$

Il teorema di *Parseval* permette ora di legare la varianza del processo allo spettro di potenza delle componenti armoniche di rumore. Detta $H(f)$ la trasformata di *Fourier* della forma $h(t)$ si ha:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} |H^2(f)| df = \int_0^{+\infty} |h^2(x)| dx \implies \int_0^{+\infty} |h^2(x)| dx = 2 \int_0^{+\infty} |H^2(f)| df \quad (3.40)$$

poiché sappiamo che $h(x)$ è reale e che quindi $H(f)$ sarà una funzione pari. A questo punto possiamo riscrivere l'equazione 3.39 in questo modo:

$$\sigma_I^2 = qI \int_0^{+\infty} h^2(x) dx = 2qI \int_0^{+\infty} |H^2(f)| df = 2qI \int_0^{+\infty} S_I(f) df \quad (3.41)$$

da cui si ricava infine l'espressione della densità spettrale di potenza del rumore shot:

$$S_I = 2qI |H(f)|^2 \quad (3.42)$$

Infine si ricava che la varianza del rumore shot è dunque proporzionale alla corrente di polarizzazione della giunzione. La forma dell'impulso interviene a determinare la forma dello spettro. In particolare, se l'impulso fosse rettangolare di durata T , la funzione $H(f)$ avrebbe la ben nota forma del *seno cardinale*, (*sinc*):

$$|H(f)| = \left| \frac{\sin(2\pi fT)}{2\pi fT} \right| \quad (3.43)$$

che avrà uno zero per $f = \frac{1}{T}$ ed il cui andamento sarà:

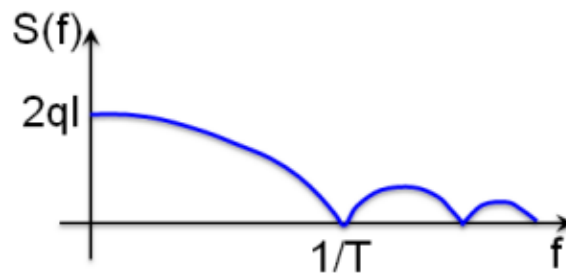


Figura 3.20: Spettro del rumore con andamento a seno cardinale e primo zero.

Considerando infine una zona di carica spaziale larga $w_{dep} = 1\mu\text{m}$ e assumendo una velocità dei portatori dell'ordine della velocità di saturazione, la frequenza $\frac{1}{T}$ corrisponde a $f_{zero} = 100\text{GHz}$. Ecco perché, in gran parte delle applicazioni, lo spettro del rumore shot può essere considerato bianco e di densità spettrale di potenza pari a $S_I = 2qI$.

3.7.1. L'andamento del rumore in funzione della temperatura

Finora abbiamo scritto la corrente del diodo semplicemente come I , senza chiederci a cosa essa sia dovuta.

In realtà in una giunzione p-n la corrente che fluisce è dovuta alla sovrapposizione di due flussi indipendenti. Il primo è determinato dalla diffusione dei portatori maggioritari (corrente di *drift*) ed è prevalente in polarizzazione diretta. Il secondo flusso è invece dovuto alle correnti inverse dovute ai portatori minoritari. Detta I la corrente di polarizzazione risulta nel dettaglio:

$$I_{forward,bias} = I + I_s \quad I_{reverse,bias} = -I_s$$

Inoltre sappiamo che tali flussi sono tra loro indipendenti e che contribuiscono alle fluttuazioni statistiche della corrente in modo anch'esso indipendente, portando ad avere una

densità spettrale di potenza del rumore in corrente pari a:

$$S_I = 2qI_{forward,bias} + 2qI_{reverse,bias} = 2q(I + 2I_s) \quad (3.44)$$

Fondamentalmente potremmo individuare 3 diverse condizioni di polarizzazione e di conseguenza 3 diverse situazioni per la densità spettrale del rumore S_I , che sono:

- polarizzazione diretta con relativa $S_I = 2qI$,
- polarizzazione nulla con relativa $S_I = 4qI_s$,
- polarizzazione inversa con relativa $S_I = 2qI_s$.

Lavorando con i fotodiodi le giunzioni saranno quasi sempre polarizzate in inversa e quindi ci concentreremo maggiormente sulla terz'ultima espressione della S_I ogni qualvolta dovranno essere fatte delle considerazioni di rumore.

Quando il fotodiodo riceve dei fotoni che saranno convertiti in corrente avremo anche la corrente fotogenerata I_{ph} oltre alla corrente inversa I_s e quindi la densità spettrale di rumore sarà ovviamente pari a $S_I = 2q(I_{ph} + I_s)$ con buona approssimazione $S_I \approx 2qI_{ph}$. Quando invece il fotodiodo non viene illuminato, condizione di **buio**, avremo ovviamente che $S_I = 2qI_s$ che prende il nome di densità spettrale di rumore della corrente di buio.

L'ultimo nodo che rimane ora da sciogliere è il seguente: *"ovvero se tale valore sarà sempre costante oppure avrà delle dipendenze da alcuni caratteri fisici"*.

La corrente di buio appena definita coincide esattamente con la corrente di saturazione inversa I_s del diodo, che sarà principalmente dovuta alla diffusione dei portatori minoritari dalla zona neutra verso la zona svuotata e non dipende dalla tensione inversa V_{rev} applicata. Questa corrente è espressa come:

$$I_s = qA_{diode} \cdot \left(\sqrt{\frac{D_p}{\tau_p} \frac{n_i^2}{N_D}} + \sqrt{\frac{D_n}{\tau_n} \frac{n_i^2}{N_A}} \right) \quad (3.45)$$

i cui parametri sono già noti e sono la sezione trasversale dell'area A_{diode} , i coefficienti di diffusione D_n e D_p , i coefficienti di vita media dei portatori τ_n/τ_p , e le concentrazioni di atomi intrinseca, di donori e accettori indicate rispettivamente con n_i , N_A ed N_D .

Tuttavia guardando l'espressione della corrente di saturazione si potrebbe affermare se vi è un legame esplicito con delle grandezze fisiche questa sarà la temperatura che andrà ad influenzare la vita media dei portatori e la concentrazione intrinseca di atomi.

In virtù del fatto che vi saranno delle cariche minoritarie che diffondono dalla regione neutra verso la regione svuotata si potrebbe affermare che la corrente di buio sarà dovuta

alla generazione di elettroni e lacune in tale regione e che sarà legata a effetti termici. Infatti nella regione svuotata avremo un tasso di generazione termica di portatori [10] pari a :

$$n_G = \frac{n_i}{2\tau} \quad (3.46)$$

Inoltre dalla teoria dei dispositivi elettronici sappiamo che la concentrazione intrinseca di atomi, n_i , dipenderà in modo fortemente esponenziale dalla temperatura secondo la relazione [9]:

$$n_i^2 = B \cdot T^3 \cdot e^{-\frac{E_{Gap}}{k_B T}} \quad (3.47)$$

e tale andamento si rifletterà di conseguenza sulla stessa corrente di saturazione, I_s . Anche questa dipendenza sarà verificata in seguito durante la caratterizzazione del sensore ed i relativi risultati saranno esposti nel paragrafo 4.1.4.

3.8. I filtri ottici

Il range dello spettro della radiazione luminosa in cui i canali del Rainbow sono sensibili è molto ampio e spazia dal vicino *UV* fino al vicino *IR* cioè lunghezze d'onda che vanno da $\lambda = 350nm$ fino a $\lambda = 1050nm$.

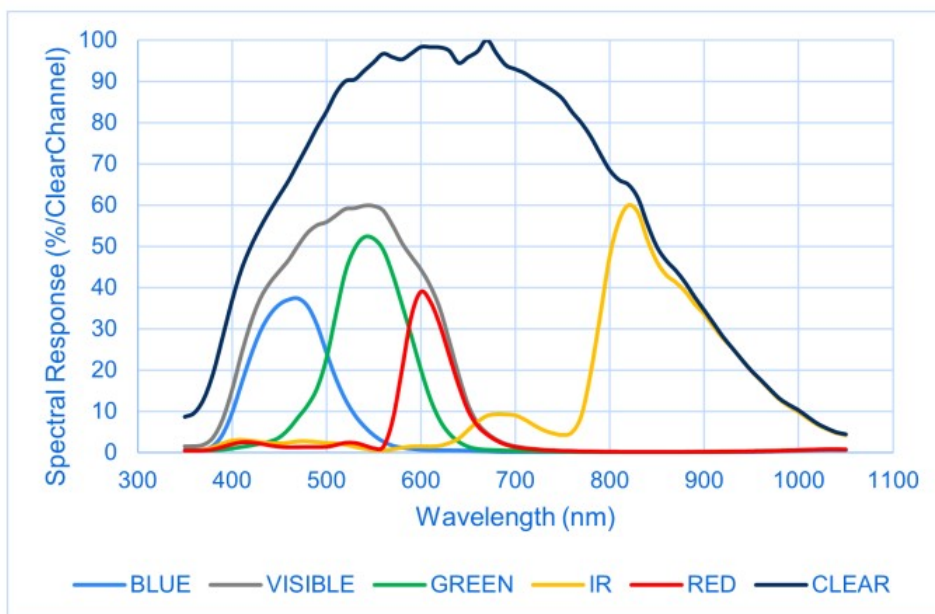


Figura 3.21: Le curve di trasmissione dei filtri ottici.

Nell'immagine appena mostrata, che è stata tratta dal datasheet del sensore, si possono vedere quelli che sono i trasferimenti teorici dei filtri ottici impiegati sui diversi fotodiodi e la relativa normalizzazione rispetto al canale *Clear*.

La trasmissione dei filtri è un parametro numerico che si indica con T e fornisce un'informazione riguardo alla percentuale di luce incidente che riesce ad oltrepassare il filtro e raggiungere il fotodiodo per essere assorbita e convertita ed alla percentuale di luce che viene invece riflessa.

Viceversa potremmo anche definire il parametro R che riguarda la luce riflessa come:

$$R = 1 - T \quad (3.48)$$

Ovviamente la somma di luce trasmessa e riflessa deve essere uguale alla luce incidente sul target. Possiamo anche riportare, traendolo sempre dal datasheet del sensore, uno zoom delle curve di trasmissione nella parte dello spettro visibile dal nostro occhio:

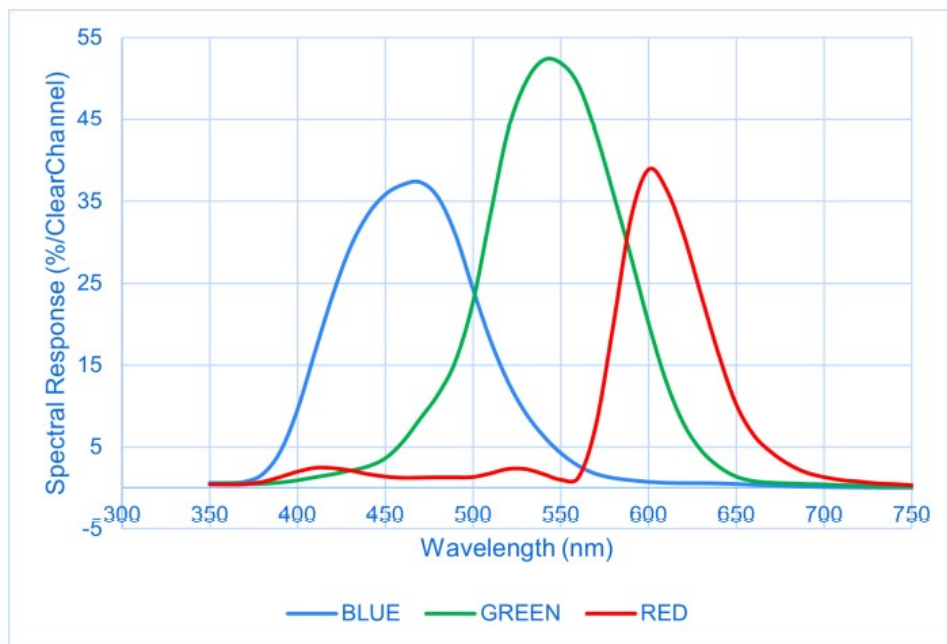


Figura 3.22: Trasmissione in banda ottica del visibile, *RGB*.

In realtà il parametro T e di conseguenza anche il parametro R erano già stati introdotti nella sezione 3.1 durante la discussione riguardante l'efficienza quantica η . Sempre dal datasheet è possibile ricavare anche un'altra importante informazione riguardo al sensore, che è la sua *risposta angolare*. Attraverso questa informazione è possibile capire di quanto si riduce in percentuale la risposta del sensore all'aumentare dell'angolo di incidenza

della luce proveniente dalla sorgente impiegata, sotto misura, rispetto alla normale della superficie del sensore (0° nel grafico).

Quanto descritto è riassunto nell'immagine seguente:

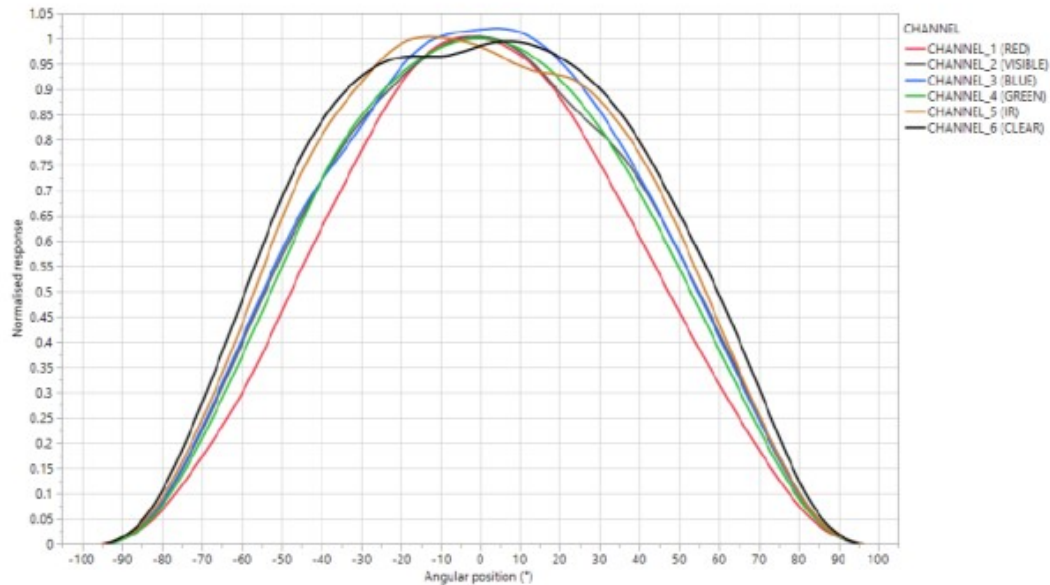


Figura 3.23: Risposta angolare del Rainbow

E' necessario ricordare che tutte le curve di trasmissione dei canali sono state poi successivamente verificate in laboratorio con l'esposizione del sensore ad un fascio luminoso proveniente da un *monocromatore*, per potere esplorare interamente lo spettro cui esso è sensibile e che i relativi risultati saranno mostrati nel capitolo 4 nel paragrafo 4.1.5 loro dedicato.

3.9. Possibili usi

Per le particolari caratteristiche possedute dal sensore, che sono state elencate ed illustrate in questo capitolo, si possono denotare alcune delle sue possibili applicazioni:

- sistema di controllo (*feedback*) di un dispositivo per analisi su campioni biologici di DNA che opera in fluorescenza sfruttando la tecnica qPCR,
- sistema per la misura ottica del valore del pH.

Nel corso dei successivi capitoli prenderemo in esame entrambe le situazioni e ne studieremo la fattibilità e gli eventuali sviluppi.

4 | Risultati sperimentali

Dopo avere descritto nel dettaglio nei precedenti e relativi capitoli il sensore e quali potrebbero essere le sue potenziali applicazioni, la tecnica qPCR ed il Q3-Plus con tutto ciò che ne consegue, passeremo alla descrizione dei risultati ottenuti dalle molteplici prove che sono state mano a mano messe a punto e poi eseguite in laboratorio.

Di seguito le 3 macro categorie sotto cui possiamo suddividere le prove fatte:

1. risultati ottenuti dalle prove per la caratterizzazione del *Rainbow*,
2. risultati ottenuti dalla caratterizzazione dei LED della testa ottica nel Q3-Plus,
3. risultati ottenuti dalle prove eseguite con il *Rainbow* nel Q3-Plus.

Prima di addentrarci nel vivo dei risultati è anche importante introdurre brevemente un altro strumento che è stato impiegato abbondantemente sia nelle prove effettuate riguardanti le caratterizzazioni dei LED che nello strumento Q3-Plus come ulteriore supporto di misura e per un confronto dei risultati ottenuti dal *Rainbow* e da esso. Tale strumento è lo *spettrometro* ed in particolare il modello *USB4000* di *OceanOptics*, riportato in basso:



Figura 4.1: Spettrometro impiegato, USB4000.

Uno spettrometro è uno strumento elettronico in grado di acquisire al suo ingresso della luce, attraverso una *fibra ottica* per esempio, per analizzarla e misurarne tutte le sue componenti spettrali in funzione della lunghezza d'onda. La struttura interna dello strumento, al cui interno è anche evidenziato il percorso ottico della radiazione luminosa che si intende misurare, è nell'immagine sottostante illustrata [11]:

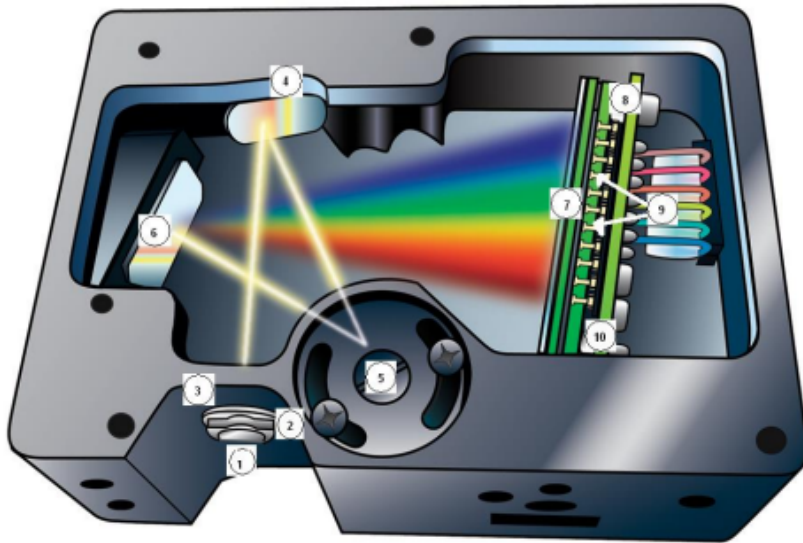


Figura 4.2: Struttura dello spettrometro e percorso ottico della luce.

Tra gli elementi principali della struttura dello spettrometro, che formano il percorso ottico della luce dall'ingresso all'interno dello strumento, si hanno:

- l'attacco per la fibra ottica indicata con (1)
- l'apertura ottica per la radiazione luminosa all'interno dello strumento, in gergo tecnico *slit* ed indicata con (2),
- il filtro ottico di ingresso indicato con (3),
- lo specchio collimatore indicato con (4), che indirizza la luce sul **grating** che è il reticolo di diffrazione per separare le componenti spettrali della luce ed è indicato con (5),
- il **focusing mirror** indicato con (6) che dirige il fascio ottico ottenuto sul detector, indicato con (8) e può lavorare nello spettro del visibile (RGB) o persino nell'infrarosso (IR),
- eventuali filtri per disturbi di ordine superiore, indicati con (9) e (10).

L'analisi della luce avviene quindi all'interno dello strumento su un sensore, sempre di tipo ottico, che può essere costituito da un array CCD che è un array di pixel in cui ognuno di essi andrà a misurare una frazione di lunghezza d'onda λ della luce in ingresso, decomposta sfruttando il principio dell'interferenza ottica mediante l'uso del grating. Le caratteristiche principali del modello in questione sono le seguenti:

- TCD1304AP CCD detector con 3648 pixel,
- risposta tra $\lambda_{min} = 200nm$ e $\lambda_{max} = 1100nm$ in base allo slit e al grating usati,
- risoluzione ottica tra 0.1 e 10 nm [FWHM],
- tempo di integrazione $3.8ms < T_{exposure} < 10s$,
- 16 bit @ 3MHz ADC converter,
- low power consumption, $I = 250mA$ con $5V_{DC}$.

Passeremo nei prossimi paragrafi alla descrizione dei risultati ottenuti, iniziando per l'appunto con il mostrare quanto si è ottenuto dalla caratterizzazione del *Rainbow*.

4.1. La caratterizzazione del *Rainbow*

Nel capitolo 3, erano state riportate tutte le informazioni riguardanti il sensore, sia a livello strutturale che a livello funzionale, dando particolare attenzione ai parametri di acquisizione del sensore come tempi di esposizione e guadagno, ai suoi valori di uscita ed in particolare modo ai suoi valori di saturazione, al suo rumore ed ai filtri ottici impiegati. Il cuore di questa sezione sarà infatti composto principalmente dai risultati ricavati dalla caratterizzazione del sensore, studio che mira a confermare o confutare tutti i dati dichiarati nel suo datasheet ed all'ottenimento dei dati di cui non si è a disposizione.

L'ordine con il quale sono state eseguite le prove è stato:

1. misura dei valori dell'*analog gain*,
2. misura dei valori di saturazione,
3. misura dei valori di **rumore** in funzione del $T_{exposure}$ e del *gain*,
4. misura del trasferimento dei filtri ottici.

4.1.1. Analog gain

Nella tabella 3.6 introdotta precedentemente, si hanno tutti i possibili valori del guadagno analogico che può essere impostato nei *VGA*, cioè gli *amplificatori a guadagno variabile*

presenti nei canali di acquisizione del sensore.

Per verificare se effettivamente si aveva una corrispondenza tra i valori dichiarati e quelli disponibili abbiamo proceduto nel seguente modo: abbiamo illuminato e quindi esposto il *Rainbow* ad una sorgente ad ampio spettro, stando ovviamente lontani dalla condizione di saturazione e abbiamo acquisito in modo ciclico variando il valore del guadagno nel sensore tra quelli disponibili e ripetendo tale procedimento su più tempi di esposizione tra i disponibili, per avere maggiore ripetibilità.

Successivamente è stato eseguito il rapporto tra tutte le misure ottenute con i vari guadagni impostati e quella ottenuta con $gain = 1x$ secondo la seguente equazione:

$$Gain_{eff} = \frac{Measure @ Gain_n}{Measure @ Gain = 1x} \quad (4.1)$$

In un primo step abbiamo acquisito in parallelo da tutti e sei i canali e calcolando il $gain$ facendo il rapporto illustrato nella 4.1 si ottiene:

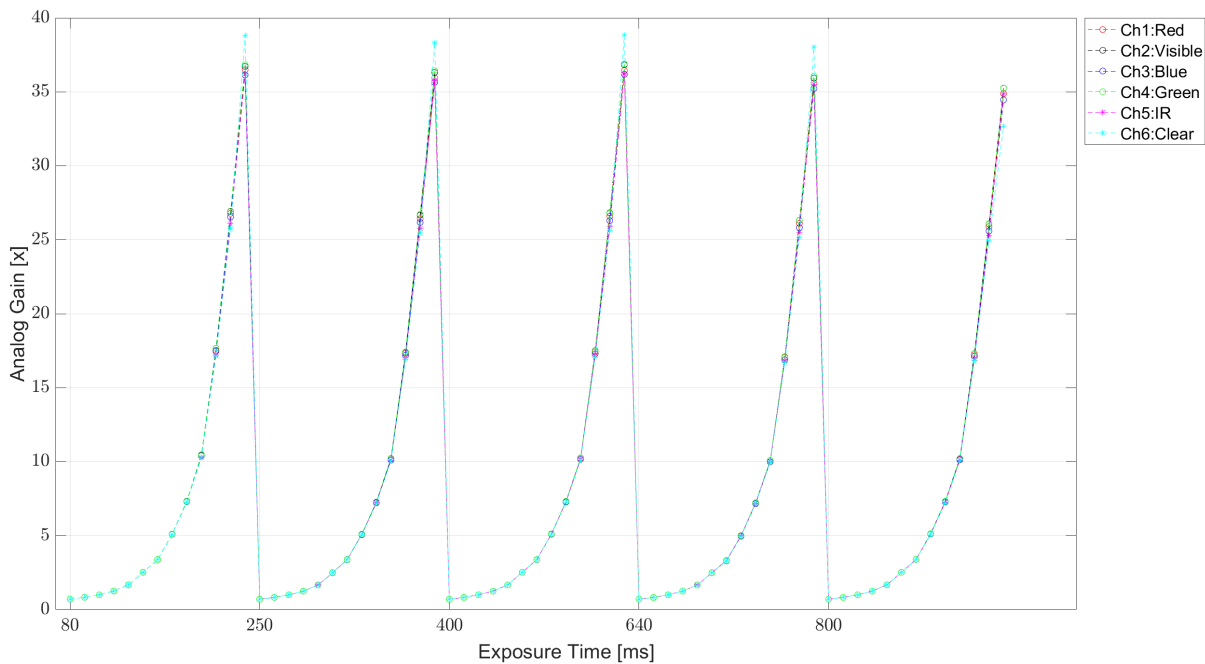


Figura 4.3: Guadagni misurati nei 6 canali.

Successivamente è stata fatta una media tra tutti i valori ottenuti in tutti e 6 i canali per T_{exp} fissato e per tutti i tempi d'esposizione. Infine facendo un confronto tra i dati ottenuti dall'esperimento e i dati teoretici riportati nel datasheet, si riportano in un grafico i valori dei guadagni misurati in funzione di quelli attesi.

Sul grafico avremo due rette, una è quella dei guadagni ideali, che ovviamente sarà la

bisettrice del primo quadrante, mentre la seconda è la retta dei guadagni reali del sensore, che sono stati misurati.

La differenza delle pendenze sarà quindi l'errore del guadagno.

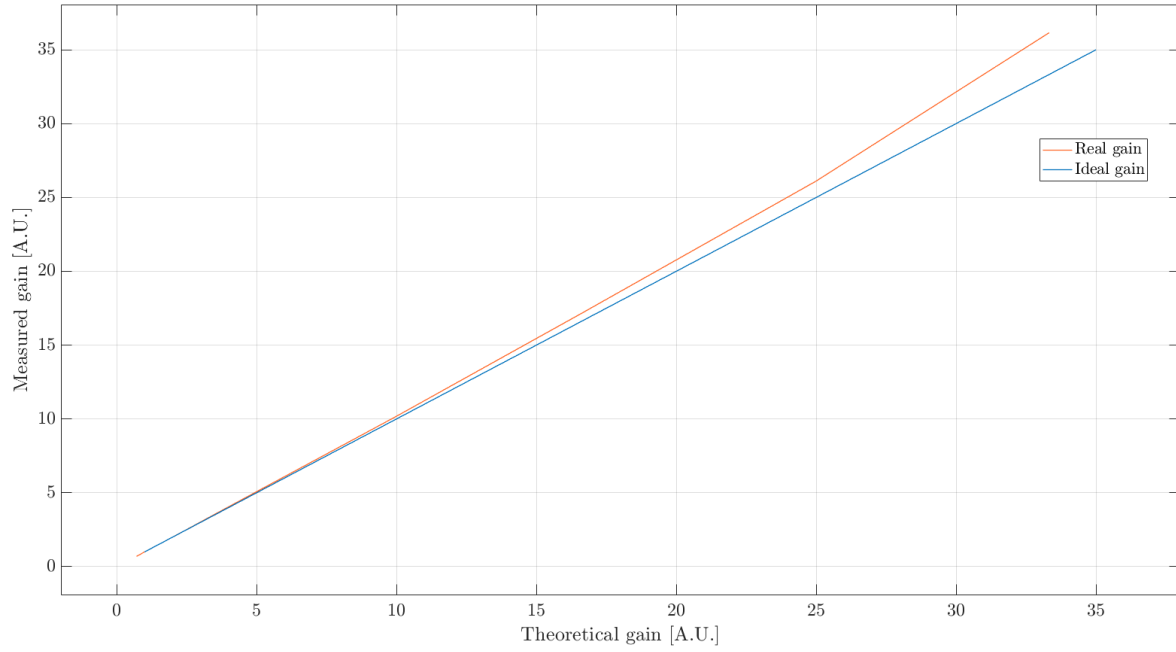


Figura 4.4: Guadagni teorici Vs ottenuti.

Come si può notare c'è una buona corrispondenza tra i valori, cioè le rette dei guadagni ideali e reali sono per un buon intervallo sovrapposte anche se poi si inizia ad avere un certo margine, ossia un piccolo scostamento tra i valori teorici e misurati non appena ci si sposta verso guadagni elevati.

4.1.2. I valori di saturazione

In questo paragrafo invece ci dedicheremo alla verifica dei valori di *saturazione* che era stato ampiamente descritto in precedenza nel paragrafo 3.6 del capitolo 3 in cui descrivevamo il sensore.

Come descritto nel paragrafo 3.5.1 ci si aspetta un duplice andamento legato al valore di tempo di integrazione di soglia denotato con $T_{exp,threshold}$, pari a $113.6ms$.

Tale verifica è stata effettuata esponendo il *Rainbow* ad una sorgente luminosa ad ampio spettro molto potente, variando di acquisizione in acquisizione il tempo di integrazione.

Per la scelta dei valori del tempo di integrazione si è deciso di partire dal valore $T_{exp,min}$ ed incrementare tale tempo di uno step pari a $\Delta T_{exp} = 1.6ms$ alla volta, in modo da poter esplorare tutta la zona sotto-soglia fino a raggiungere la zona sopra-soglia e acquisire

degli altri valori in quella regione, a conferma del fatto che il valore di saturazione sarebbe rimasto costante.

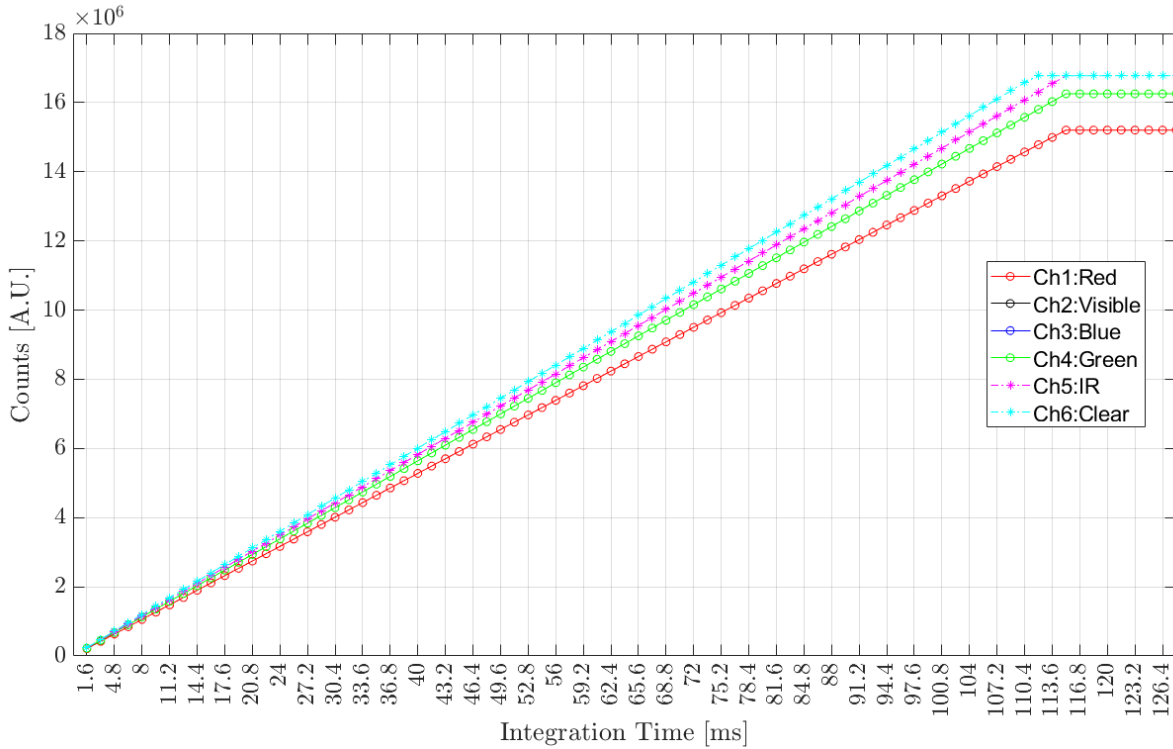


Figura 4.5: Andamento del valore di saturazione.

Il target era proprio notare i 2 diversi andamenti del valore massimo in uscita, infatti ci aspettavamo la rampa, lavorando sotto soglia, seguita da un *plateau*, cioè la regione ad andamento costante. La figura del risultato ottenuto mostra chiaramente che quanto atteso era corretto, mettendo in evidenza il ginocchio per $T_{exp} = 113.6ms$. Inoltre la verifica è stata svolta su tutti e 6 i canali del *Rainbow*.

4.1.3. Il rumore di buio

Un'altra caratteristica che abbiamo testato e verificato per il *Rainbow* è il suo rumore di buio, descritto nella sezione 3.7, definito come il segnale che si ha in uscita dal sensore quando non è esposto alla luce.

Per acquisire tale rumore il sensore è stato posto in una camera oscura, in modo da non permettere alla luce di incidere sul sensore stesso, acquisendo 100 misure per ogni coppia di valori di T_{exp} e $gain$.

Abbiamo sfruttato tutti i guadagni disponibili ad eccezione di quelli più alti, perché

instabili come accennato nel paragrafo 3.5.3 e un set discreto di tempi di integrazione rispetto ai 1024 che si possono esplorare e che sono qui sotto riassunti in tabella.

$T_{exposure}$ scelti									
1.6ms	48ms	113.6ms	256ms	400ms	640ms	800ms	1s	1.28s	1.6s

Tabella 4.1: Lista dei T_{exp} usati per acquisire il rumore di buio.

La procedura di acquisizione è stata svolta seguendo i passaggi dell'elenco sottostante:

1. viene fissato un valore del T_{exp} tra quelli selezionati,
2. viene fissato un valore del $gain$ tra quelli disponibili in tabella 3.6,
3. vengono acquisite 100 misure del rumore di buio per ognuno dei 6 canali,
4. si sceglie il successivo valore del $gain$ tra quelli disponibili fino al loro esaurimento,
5. si riparte dal punto 1

e tale operazione viene ripetuta fino all' esaurimento dei tempi di integrazione scelti in precedenza, ottenendo un risultato di questo genere:

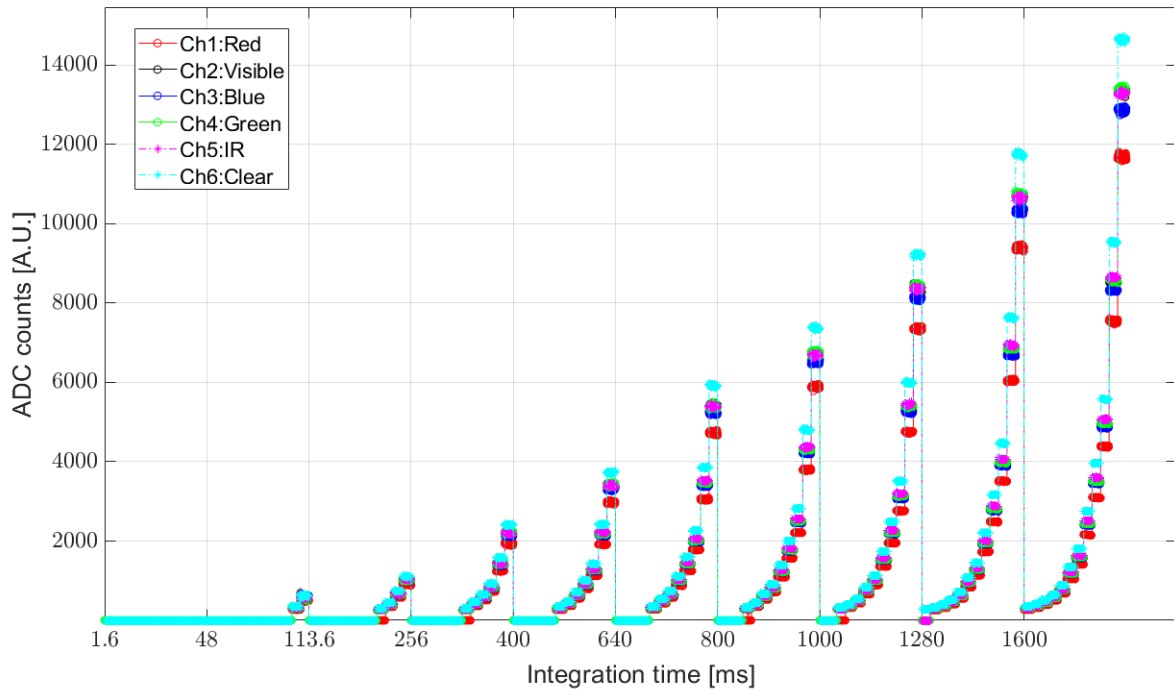


Figura 4.6: Andamento del rumore di buio sui 6 canali.

Il grafico appena riportato tuttavia potrebbe essere a tutti gli effetti interpretato come un grafico in 2 dimensioni, **2-D**, poiché all'interno di ognuno degli slot che sono delimitati dal T_{exp} sta variando ciclicamente anche il *gain*; per poi leggere in uscita il rumore.

Per renderlo di più facile interpretazione invece potremmo renderlo monodimensionale, tenendo sempre il T_{exp} in ascissa ed il valore letto in uscita dal *Rainbow* in ordinata, ma rappresentando per ogni tempo di esposizione impiegato tante rette quanti sono i guadagni usati, che saranno 12.

Quindi dai 12 guadagni usati saranno ricavate 12 diverse rette di rumore. Ovviamente tale passaggio verrà svolto canale per canale.

Saranno ricavati in ordine:

1. i valori di rumore reale per ogni coppia di T_{exp} e *gain* usati misurati su ognuno dei 6 canali,
2. la versione linearizzata di tale rumore,
3. il grafico in cui sono raccolte le pendenze e le intercette delle rette di rumore che sono state linearizzate.

Iniziamo a mostrare quanto descritto nei primi 2 punti elencati, prendendo in considerazione il canale 1 cioè il *Red*:

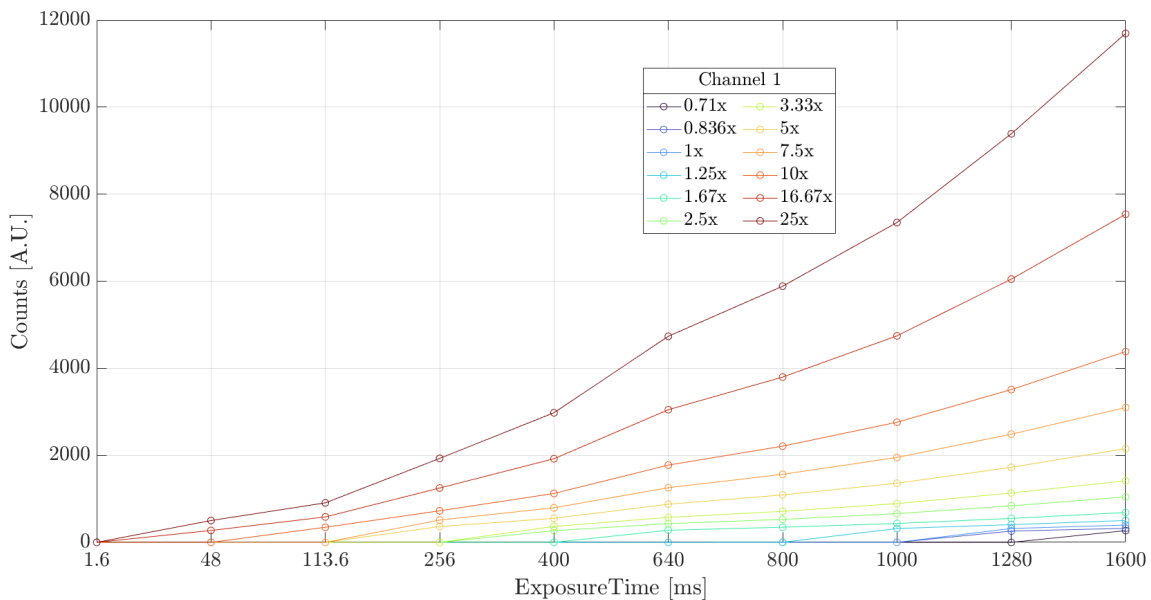


Figura 4.7: Grafico 1-D del rumore di buio.

Dal grafico si nota benissimo che per valori bassi del guadagno si inizia a misurare il valore del rumore in uscita solo per valori alti del T_{exp} . Inoltre, facendo un *fitting* di

tipo polinomiale al primo ordine sui dati riportati nella figura 4.7 si ottiene a sua volta il seguente grafico, dove sono riportate le versioni linearizzate delle curve che prima erano invece delle spezzate:

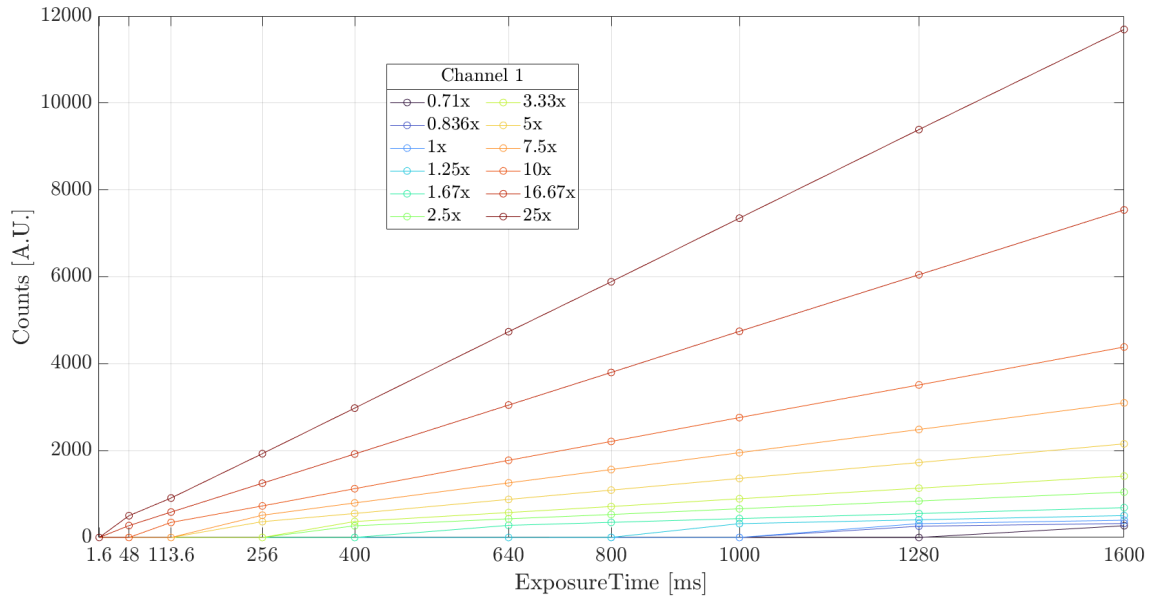


Figura 4.8: Grafico 1-D del rumore di buio linearizzato.

Sempre dal *fitting* al primo ordine sui dati riportati nella figura 4.7 si possono ottenere i valori del coefficiente angolare e dell'intercetta di ogni retta linearizzata:

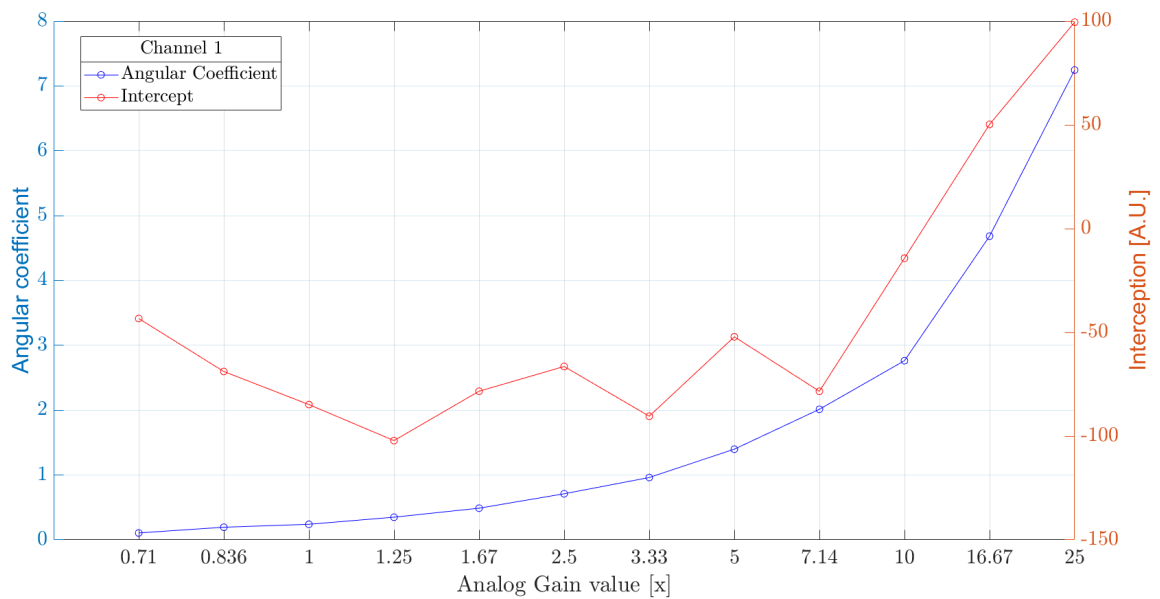


Figura 4.9: Curve di interpolazione del rumore.

Sul grafico sono riportate le pendenze delle rette (in blu) e le intercette (in rosso) di tutte le curve di guadagno ottenute nel precedente grafico.

Torniamo a trattare il rumore ora come una grandezza di natura statistica e non più pratica. Si possono anche ricavare altre grandezze di natura statistica dai dati di rumore ottenuti riportati nell'immagine 4.6; sfruttando sempre delle funzioni note di **MATLAB**. Tali grandezze di cui parleremo e ne riporteremo i risultati sono:

- la **varianza** del rumore, il cui simbolo è σ_{noise}^2 ,
- il valore medio quadratico, **RMS**, del rumore, cioè la radice quadrata della varianza, indicato con il simbolo σ_{noise} ,
- l'**error-bar**, incentrato non sul singolo sensore ma su tutti quelli testati. Per ogni coppia di valori di T_{exp} e $gain$ si calcola in ogni canale il valore medio della risposta di tutti i sensori e si rappresenta la dispersione dei valori in quell'intorno, nei limiti di $\Delta_\epsilon = \pm\sigma$.

Si riporta inizialmente nel seguente grafico l'andamento della varianza dei dati di rumore ottenuti dal sensore e ripartiti sempre per valore di $gain$ e di T_{exp} su tutti e 6 i canali disponibili:

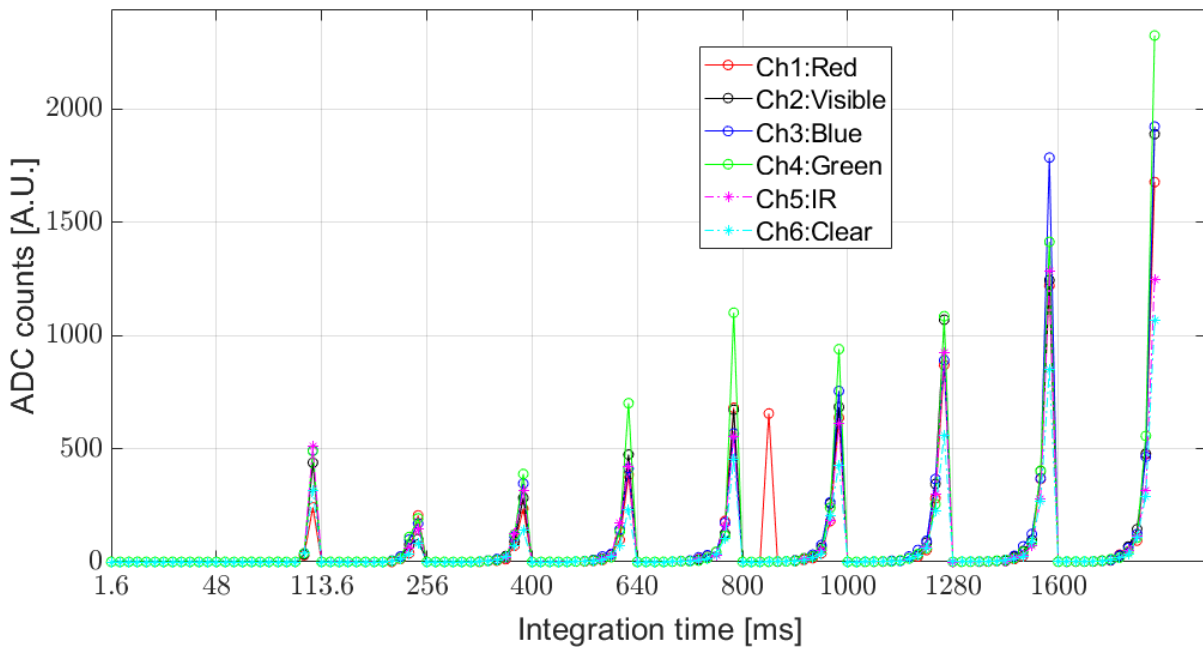


Figura 4.10: Andamento della *varianza* del rumore.

Successivamente si passa al grafico in cui sono rappresentati i valori RMS del rumore di buio, ripartiti sempre per valore di T_{exp} e $gain$, il cui andamento è molto simile a quello ottenuto per la varianza.

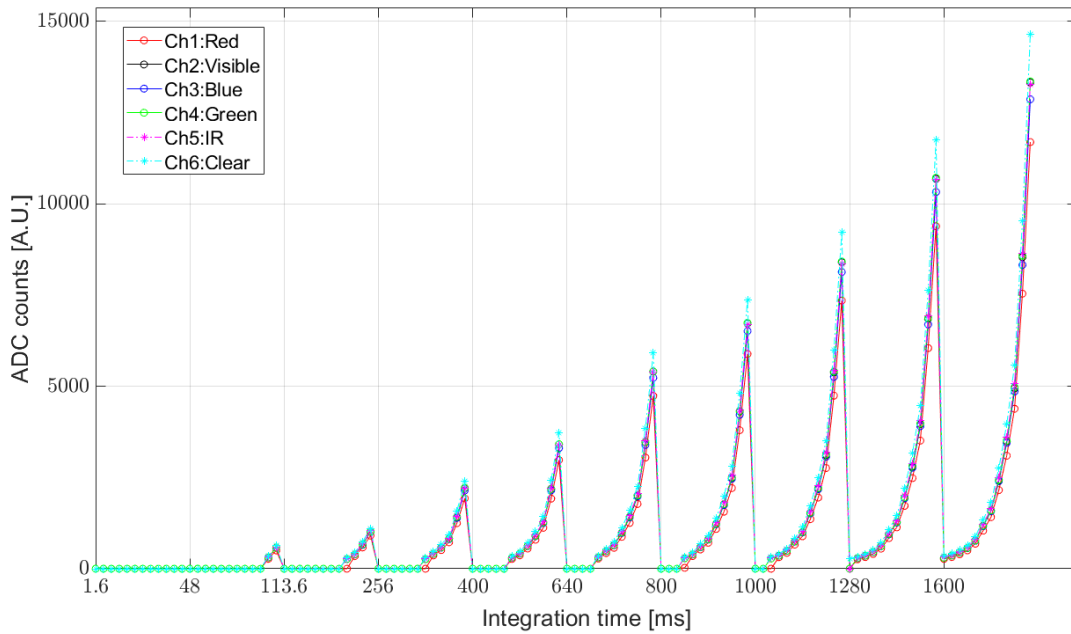


Figura 4.11: Andamento del valore *RMS* del rumore.

Infine si passa al grafico ottenuto per l'error-bar, che riguarda il canale 1 di tutti i sensori testati. Come visibile nel grafico l'andamento medio del rumore non varia, mentre per ogni valore medio ottenuto si hanno le bande di confidenza a $\pm\sigma$ entro le quali stanno tutte le 100 misure effettuate.

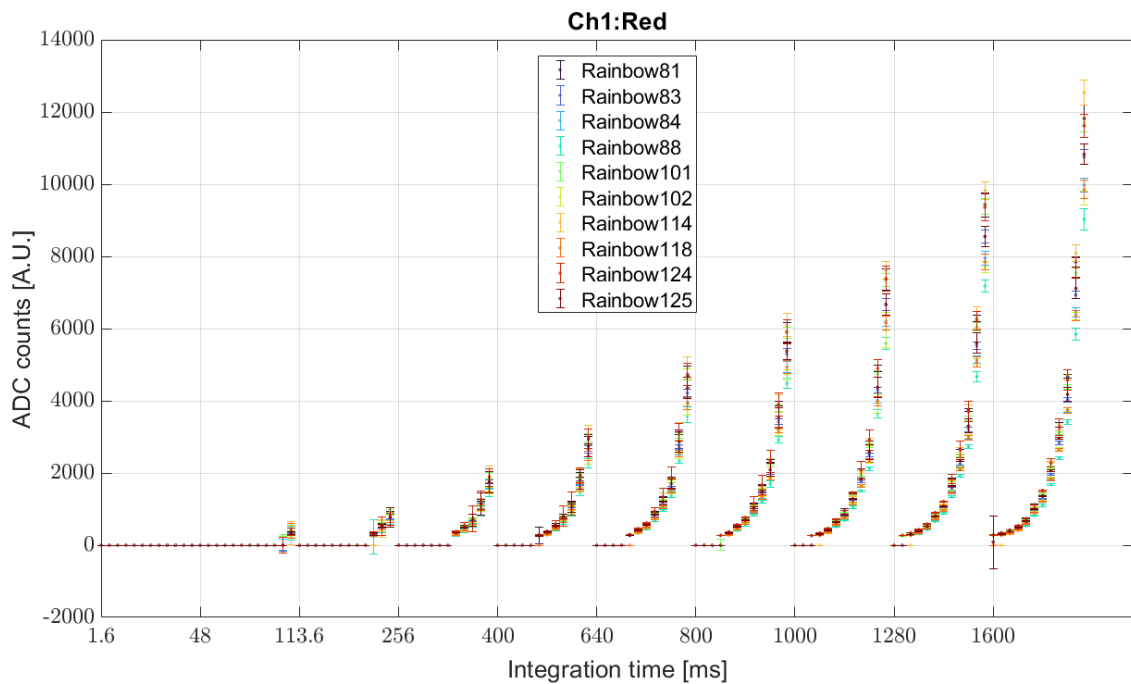


Figura 4.12: Grafico *error-bar* del canale 1.

4.1.4. Noise vs Temperature

Un ultimo dettaglio riguardo al rumore è il suo andamento in funzione della temperatura, da cui come visto nella sezione 3.7 ha una chiara dipendenza. Per ricavare tale andamento abbiamo condotto una prova nella quale il sensore veniva posto all'interno di un forno controllato, il *Controller P330*, della *Nabertherm*, in grado di attuare delle rampe di temperatura controllate nel tempo, che funge quindi sia da camera oscura che climatica.



Figura 4.13: Il forno controllato.

In alto si può vedere il forno mentre in basso si ha la rampa termica da esso generata:

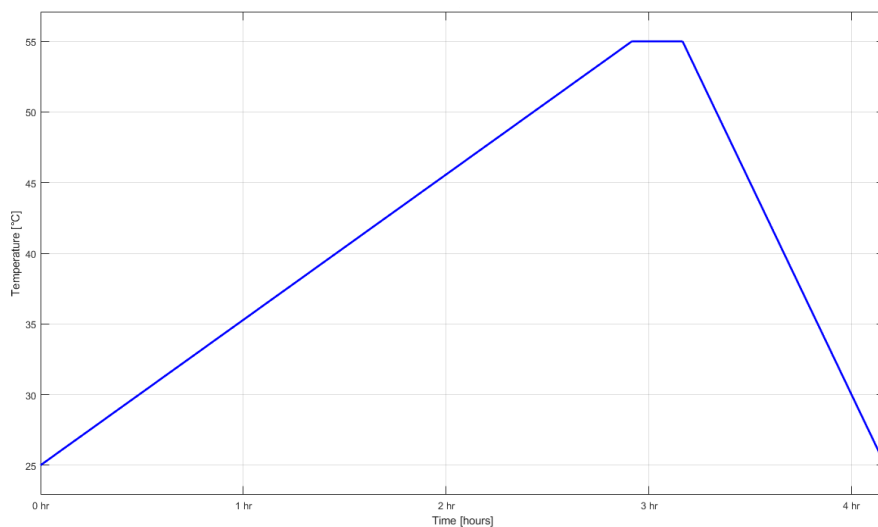


Figura 4.14: La rampa termica generata.

Nella rampa si possono evidenziare 3 tratti distinti:

1. la fase di salita, dove la temperatura passa da $T_{ambient} = 25^{\circ}\text{C}$ fino a $T_{plateau} = 55^{\circ}\text{C}$ in un lasso di tempo pari a 2.5 ore,
2. il tratto costante, il *plateau* di durata pari a 15 minuti nei quali la temperatura rimane costante sui 55°C ,
3. la fase di discesa dove la temperatura viene riportata da $T_{plateau}$ a $T_{ambient}$ impiegando circa 1 ora.

Nel rumore misurato ci si aspetta un andamento che seguisse quello della rampa termica, con una fase in aumento, una fase costante ed una fase finale in discesa, che ovviamente seguono la temperatura.

Il rumore è stato acquisito usando un valore di *gain* pari a $2.5x$ e 3 diversi valori del T_{exp} che sono:

1. $64ms$,
2. $400ms$,
3. $1.28s$.

Il risultato che riporteremo è quello ottenuto usando un tempo di esposizione $T_{exp}=400ms$:

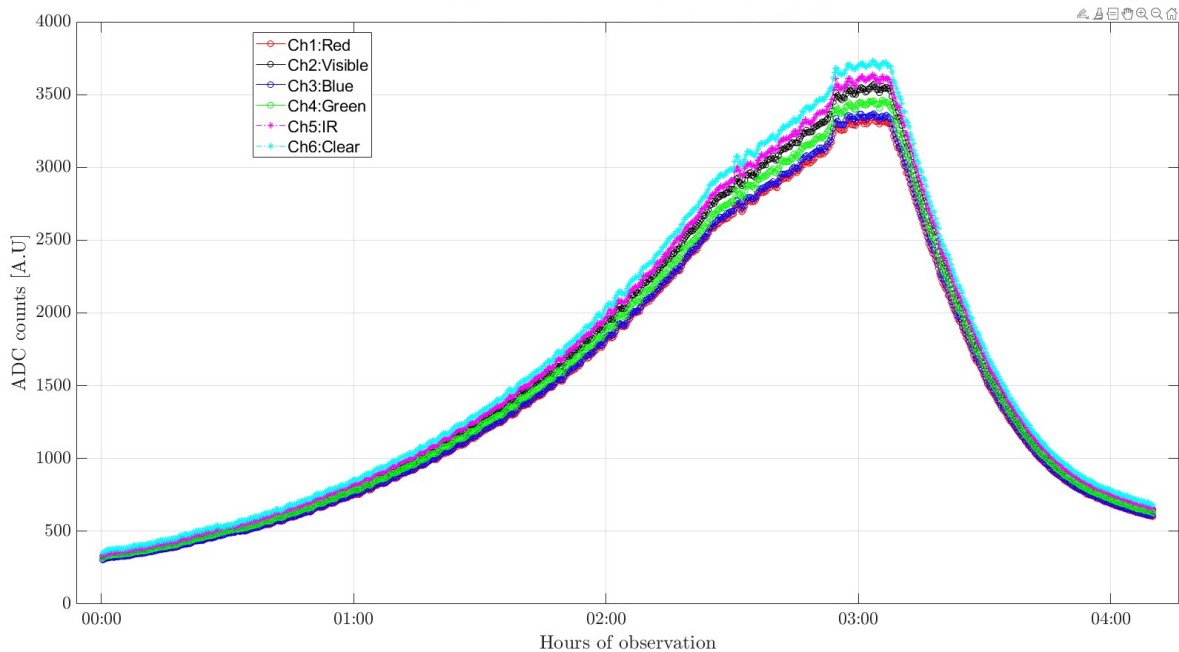


Figura 4.15: Rumore di buio in funzione della temperatura visto nel tempo.

Dagli altri tempi di esposizione impiegati si riesce a ricavare quelle che sono la soglia di rumore minima e massima. Per quanto riguarda la minima si ottiene un'immagine molto esaustiva (in appendice A) in cui si hanno 2 zone agli estremi, che corrispondono al raggiungimento della T_{max} per cui il sensore in uscita propone $ADC_{out} = 0 \text{ counts}$.

Per il tempo più alto invece si ottiene un'immagine che è come una replica, la forma è uguale mentre i valori saranno riscalati di un fattore moltiplicativo $M > 1$ poiché ovviamente integrando più a lungo si ottiene un segnale maggiore.

Durante l'esperimento siamo stati anche in grado di monitorare l'andamento della temperatura all'interno del forno stesso, impiegando come strumento di misura un **multiplexer**, un *Agilent 34972A*, cui sono state connesse 2 termocoppie di tipo **K** disposte in modo che fossero una al centro ed una al bordo laterale della camera climatica per capire se vi fossero delle differenze significative al suo interno. L'andamento della temperatura misurato è riportato nel grafico seguente:

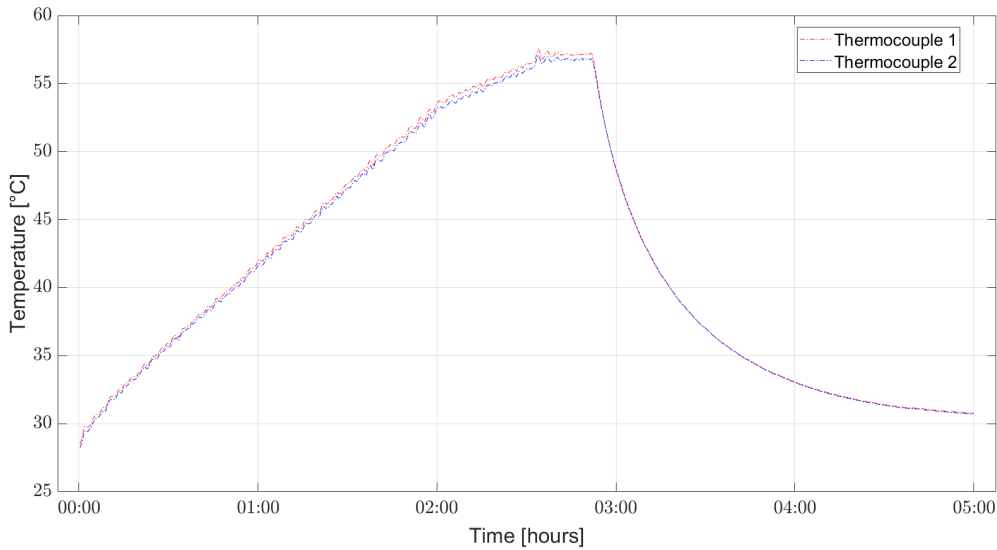


Figura 4.16: Temperatura acquisita con il multiplexer.

Con uno zoom nel primo tratto della figura 4.15, parte con la rampa di temperatura in salita, si ottiene la 4.17, che riporta un ramo del rumore ad andamento esponenziale che va a confermare quanto precedentemente detto nella sezione 3.7 riguardo al rumore di buio; quando si mostrava che la dipendenza della generazione delle EHP (*electron-hole pair*) nella regione svuotata è legata alla concentrazione intrinseca n_i ed alla temperatura stessa. Tale dipendenza è rappresentata dalla seguente espressione:

$$Noise_{ADC,out} = Noise_{ADC,out,T_0} \cdot e^{(T_2-T_1)} \quad (4.2)$$

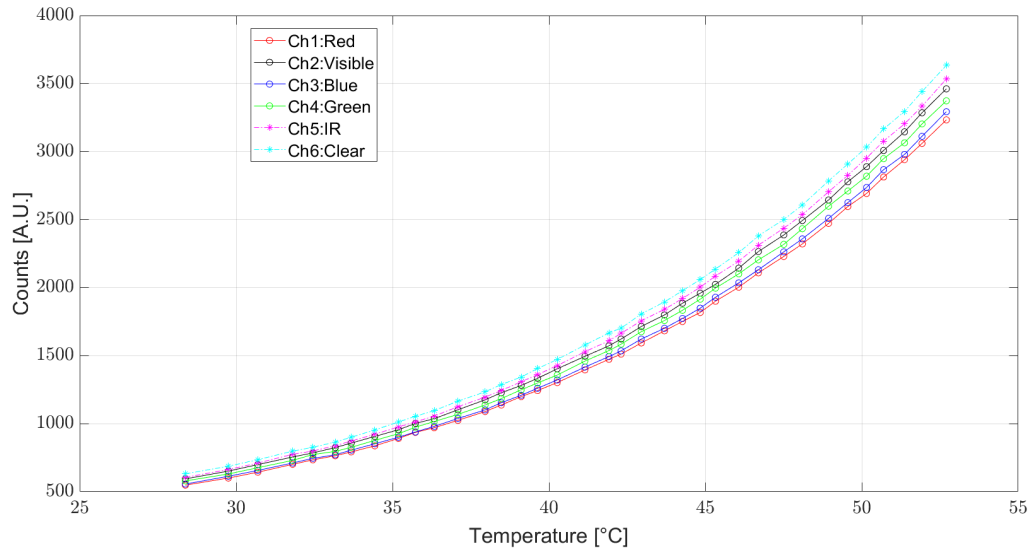


Figura 4.17: Zoom sull'andamento esponenziale del rumore in funzione della temperatura.

4.1.5. Il trasferimento dei filtri ottici

L'ultima caratteristica che rimane da confermare lato *Rainbow* è il trasferimento dei filtri ottici; già visti in precedenza nella sezione 3.8, nella figura 3.21, che sono depositi on-top ai fotodiodi per dividere la radiazione luminosa in più bande ottiche e quindi avere i 6 canali ottici di acquisizione.

Per ricavare tali trasferimenti abbiamo inserito il *Rainbow* in una camera oscura per esporlo alla luce emessa attraverso l'uso di un *monocromatore*.

Tale dispositivo è in grado di emettere luce ad una ben definita lunghezza d'onda λ_{mono} , che può essere scelta a piacimento dall'utente. Descriviamo brevemente come è strutturato un monocromatore, cioè di quali parti si compone lo strumento:

- ha come sorgente luminosa una lampada ad arco con spettro luminoso ampio,
- un sistema di fessure che collimano la luce verso un sistema di specchi per la riflessione,
- il *grating*, che è il reticolo di diffrazione che scompone la luce incidente nelle sue componenti spettrali e permette di scegliere quella di nostro interesse,
- un altro sistema di specchi che permette alla componente selezionata di raggiungere l'output,
- un cavo in *fibra ottica* per raggiungere il target.

Tutti i componenti appena descritti sono schematicamente illustrati nell'immagine che segue [4]:

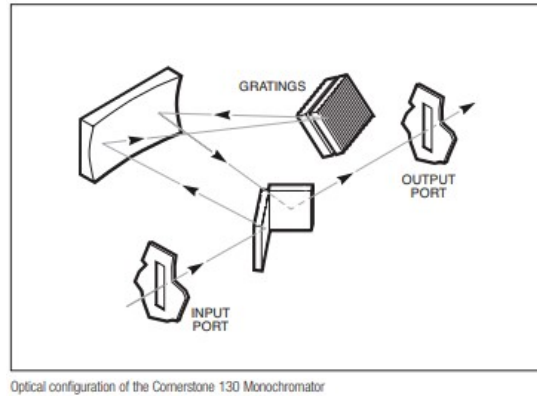


Figura 4.18: Struttura interna del monocromatore e percorso ottico della luce.

Lo strumento a disposizione in laboratorio è l'*Oriel Cornerstone 130 1/8m* della *Newport*, che ha come sorgente una lampada a scarica allo *Xenon* e di cui mostreremo poco più avanti anche il suo spettro di emissione. La vista dello strumento è la seguente, ricavata dal flyer dello stesso [4]:



Figura 4.19: Monocromatore impiegato.

Per potere ricavare la forma delle curve di trasmissione dei filtri ottici, abbiamo illuminato il *Rainbow* esplorando tutte le lunghezze d'onda alle quali esso è sensibile, con un passo o risoluzione fissati, per poi leggere la sua risposta. Riassumendo avremo i seguenti estremi inferiore e superiore e lo step in lunghezza d'onda λ :

- $\lambda_{min} = 350nm$
- $\lambda_{max} = 1050nm$
- $\Delta\lambda_{resolution} = 1nm$

Le curve di trasmissione acquisite dal *Rainbow* sono:

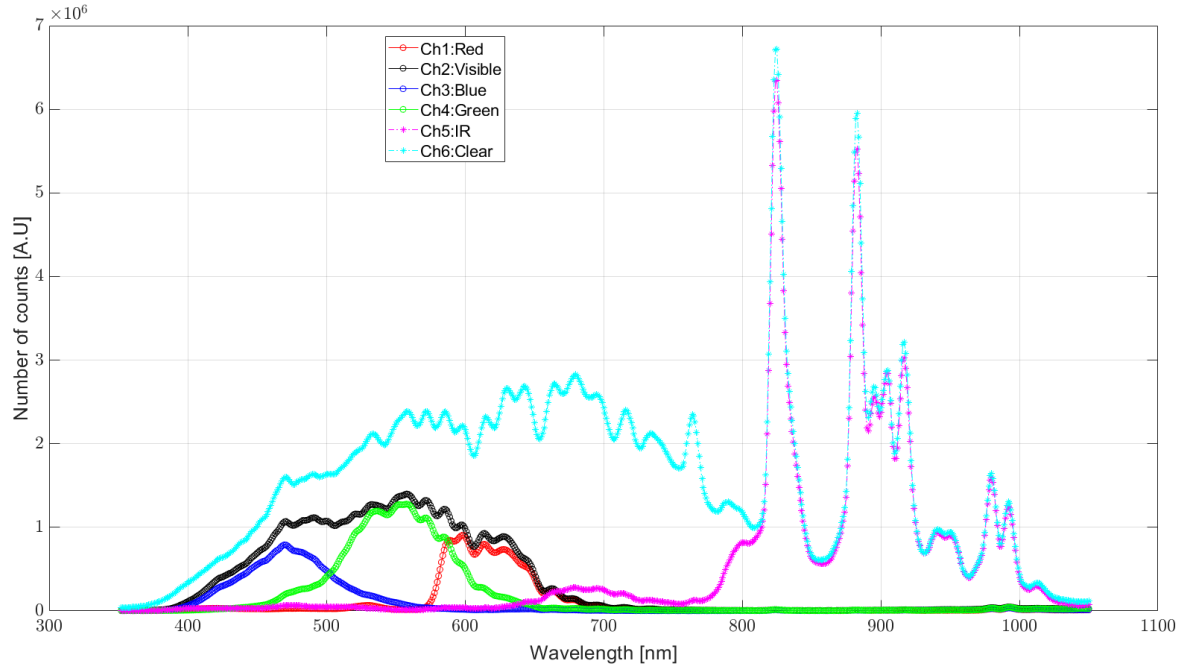


Figura 4.20: Acquisizione dello spettro del monocromatore con il *Rainbow*.

Guardando il risultato ottenuto si possono notare alcuni particolari dettagli:

- per $\lambda \approx 500nm$ circa si ha l'intersezione della curva del canale **Blu** con la curva del canale **Green**,
- per $\lambda \approx 570nm$ circa si ha l'intersezione della curva del canale **Green** con la curva del canale **Red**,
- la curva del canale **Visible** risulta essere la somma di **Red** + **Green** + **Blu**,
- per $800nm < \lambda < 1050nm$ si ha la regione in cui la risposta del sensore è dominata dalla componente **IR** della radiazione luminosa.

Dopo avere acquisito gli spettri dei canali dal *Rainbow* appena mostrati, ci siamo concentrati sull'acquisizione dello spettro della lampada ad arco che fa da sorgente al monocromatore, impiegando come strumento di misura lo *spettrometro*.

Questo ulteriore step serve a confermare il fatto che la curva ottenuta per il trasferimento del canale *Clear* nel *Rainbow*, non essendo filtrato, deve avere una corrispondenza univoca e cioè 1:1 con lo spettro emesso dalla lampada sorgente del monocromatore.

Quindi il trasferimento del *Rainbow* sarà modulato nella forma dallo spettro emesso dalla

lampada sorgente infatti tutte le lunghezze d'onda acquisite dipendono dalla lampada sorgente stessa e sono solamente selezionate per singola lunghezza d'onda dal monocromatore.

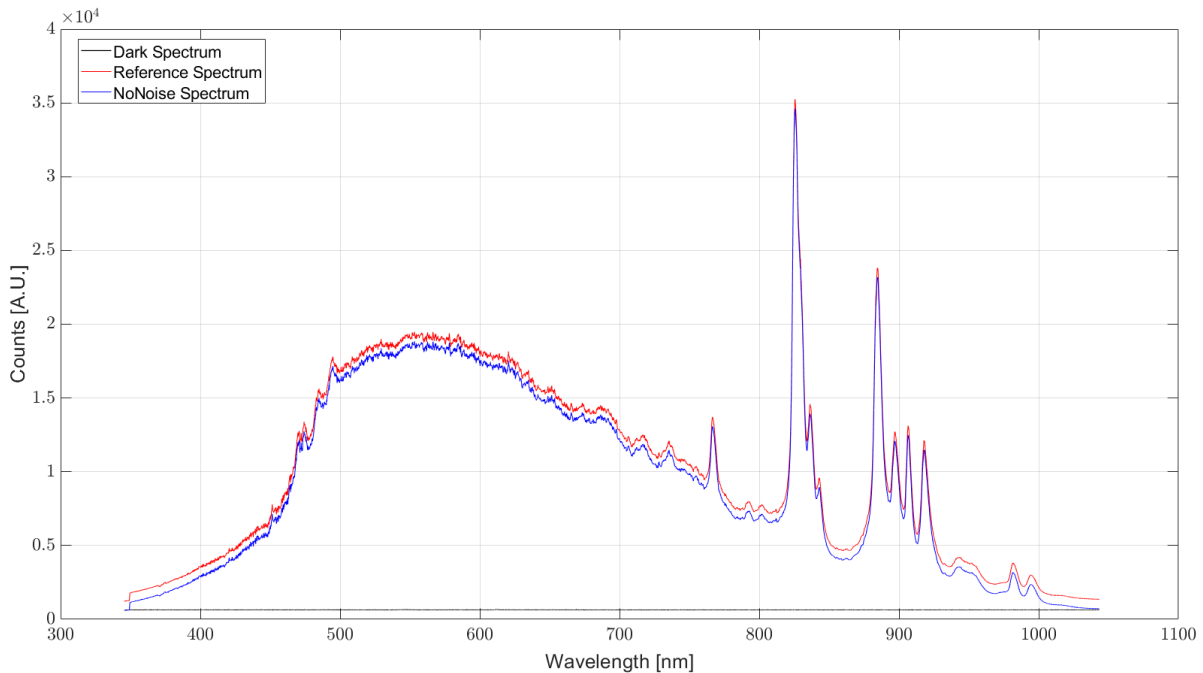


Figura 4.21: Spettro della lampada del monocromatore.

Dall'ultima figura si evince che nella regione dello spettro dell'*IR* si ha la regione dominata dai picchi come visto poco prima nella figura 4.20.

Ciò fornisce una conferma di quanto si voleva dimostrare, la curva di risposta del *Rainbow* è modulata nella sua forma dallo spettro della lampada del monocromatore, infatti confrontando la curva ottenuta con quest'ultimo risultato con la curva ottenuta dal canale *Clear* si può notare come siano perfettamente sovrapponibili.

Un'ulteriore analisi dei dati ottenuti dal *Rainbow* svolta dividendo la risposta di ogni canale per la risposta del canale *Clear* su tutte le lunghezze d'onda acquisite ci fornisce la risposta normalizzata dei canali stessi che sono riportati nella successiva immagine.

Dal datasheet si disponeva già di un grafico simile, qui riportato in figura 3.21, dalla quale si potevano ricavare le seguenti informazioni:

- nello spettro del visibile, i canali *Red*, *Blu*, *Green* e *Visible* sono rispettivamente circa il 40%, il 55% ed il 60% ed il 70% del canale *Clear* alla loro lunghezza d'onda di picco,
- il canale *IR* invece segue esattamente il canale *Clear* per $\lambda > 800nm$.

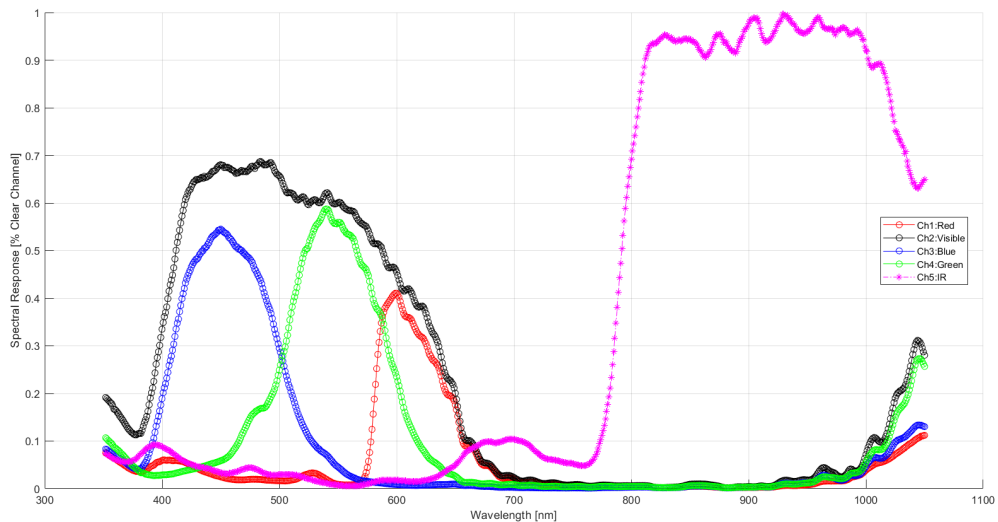


Figura 4.22: Spettri normalizzati dei canali del *Rainbow* rispetto al canale *Clear*.

Nel grafico riportato si nota come tali caratteristiche sono confermate:

- lato *RGB*, in cui i trasferimenti sono in linea con quelli forniti,
- lato *Visible* il trasferimento è circa il 66% rispetto al *Clear*,
- lato *IR* la quota è molto vicina ad 1, ciò conferma che i canali *Clear* ed *IR* hanno lo stesso trasferimento nella regione $\lambda > 800nm$.

4.2. I LED del Q3-Plus

In questa sezione vengono presentati i risultati delle prove effettuate sui LED che costituiscono la parte di attuazione ottica del Q3-Plus.

Tali prove avranno un triplice scopo:

- il primo è quello di caratterizzare il LED blu del canale 1 nel quale si rileva il fluoroforo *FAM* e il LED ambra del canale 4 nel quale si rileva invece il fluoroforo *ROX*,
- il secondo invece verte a definire i limiti, i problemi e le derive dei LED, che saranno testati in modo libero e cioè con corrente di polarizzazione costante oppure sotto determinate condizioni ambientali e/o di polarizzazione stessa,
- il terzo invece cercherà di stabilire se fosse possibile trovare una soluzione per ridurre questi problemi.

4.2.1. La caratterizzazione dei LED

Inizieremo mostrando i risultati ottenuti dalla caratterizzazione dei LED, passaggio che è stato svolto a causa delle problematiche sorte nel Q3-Plus a livello ottico durante il suo funzionamento, che sono visibili anche nei risultati dell'esperimento, come visto nell'immagine 2.7 in cui si notava una calo drastico della luminosità in fase di *eccitazione* con conseguente riduzione della *fluorescenza* in fase di *emissione*.

Tale deriva si supponeva in prima battuta essere di tipo termico e quindi come primo esperimento abbiamo deciso di capire se il problema fosse dovuto ad un eccessivo riscaldamento dei LED in fase di accensione.

Il LED blu

La caratterizzazione dei LED inizia da quello di colore blu e per i primi test è stato messo a punto un setup di misura che include:

- il LED blu del Q3-Plus,
- un alimentatore da banco *Agilent E3631A*, controllato in remoto da **MATLAB** attraverso una porta COM seriale,
- il *Rainbow*,
- lo spettrometro, pilotato ed acquisito sempre mediante MATLAB.

In questo modo si riusciva a polarizzare il LED in maniera controllata per capire quanto il LED stesso perdesse i efficienza man mano che scaldava mentre è acceso. Inoltre si riusciva a capire quale fosse la *sensibilità* del sensore, cioè il minimo step in corrente fornito al LED e di conseguenza la minima luminosità da esso emessa che poteva notare.

Dal datasheet dell'alimentatore si ricava che lo step minimo in corrente che esso sarebbe in grado di fornire è $\Delta I_{LED} = 200\mu A$ sull'uscita a +6V.

Abbiamo condotto un semplice test usando questi parametri:

- $I_{LED,min} = 2mA$,
- $\Delta I_{LED,up} = 250\mu A$,
- $\Delta I_{LED} = 200\mu A$,
- $I_{LED,max} = 10mA$,
- $T_{exp} = 32ms$,
- Analog Gain = 1x.

Il setup di misura descritto è visibile nell'immagine seguente:

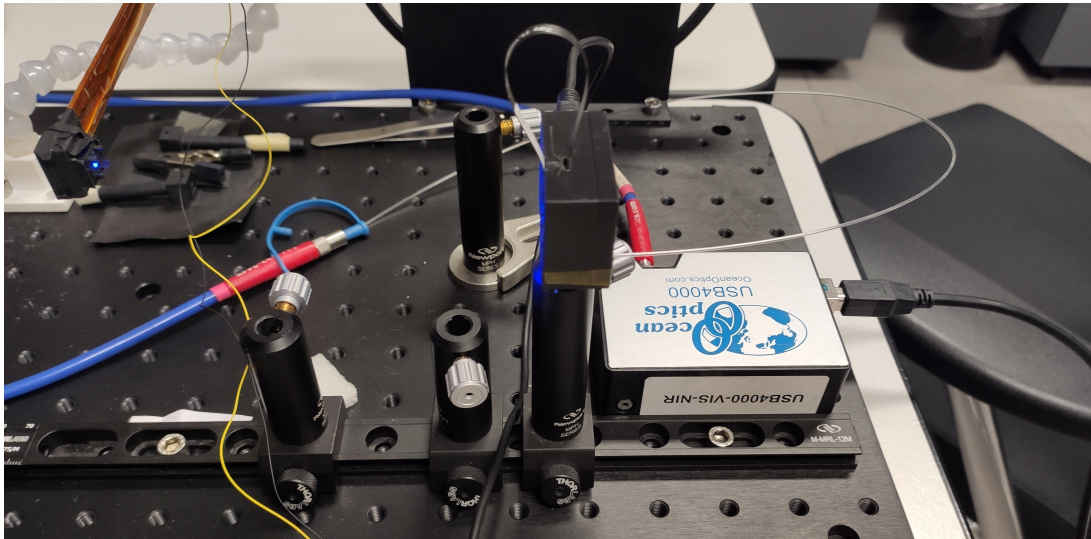


Figura 4.23: Setup impiegato per la stima della sensibilità del *Rainbow*.

in cui si possono notare il *Rainbow* con un supporto realizzato in CAD e stampato in 3D, lo spettrometro per acquisire in parallelo e la fibra ottica che va a posizionarsi sotto al sensore.

Per il *Rainbow* si è ottenuto:

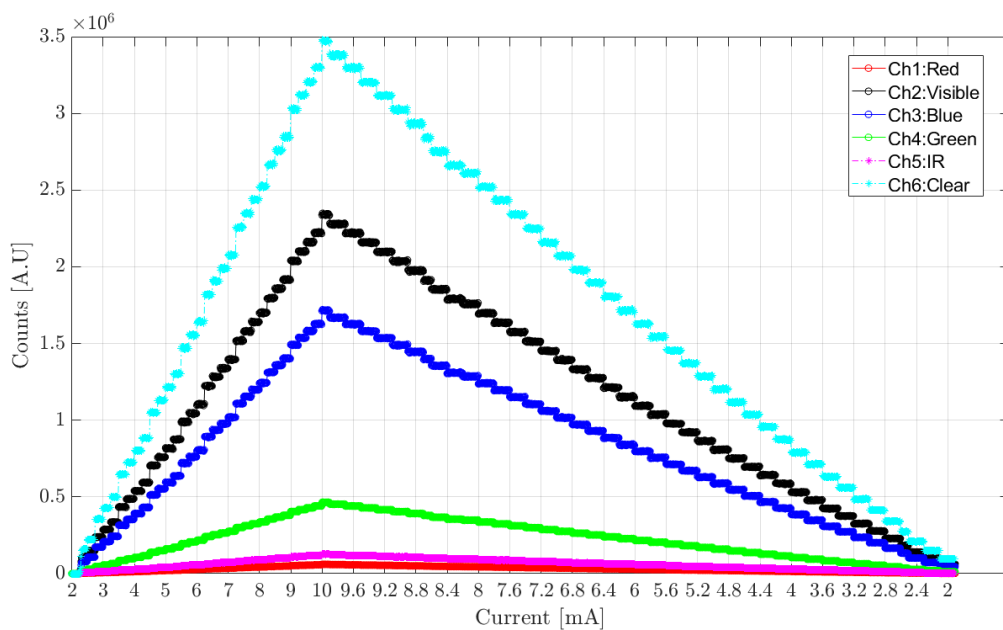


Figura 4.24: LED blu polarizzato con doppia rampa acquisito dal *Rainbow*.

Nell'immagine appena mostrata si possono notare dei piccoli salti nelle rampe di salite e di discesa della luce acquisita dal *Rainbow* e non sono dovuti ad esso, ma bensì alla quantizzazione dell'alimentatore stesso, che era $\Delta I_{source} = \pm 250 \mu A$ per l'uscita usata. Per quanto riguarda l'acquisizione del LED visti dallo spettrometro invece si hanno i seguenti spettri acquisiti ed i sottostanti picchi misurati:

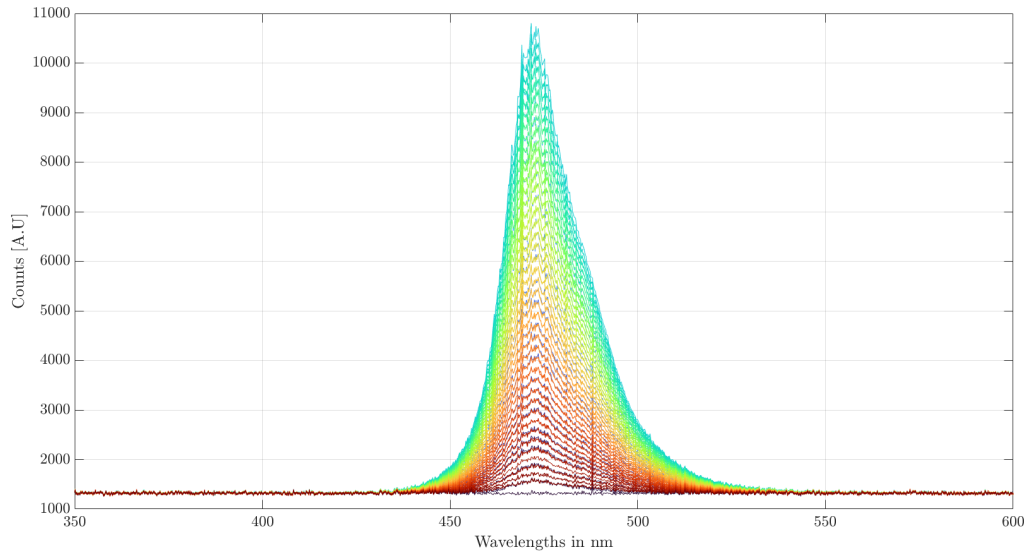


Figura 4.25: Spettri del LED blu.

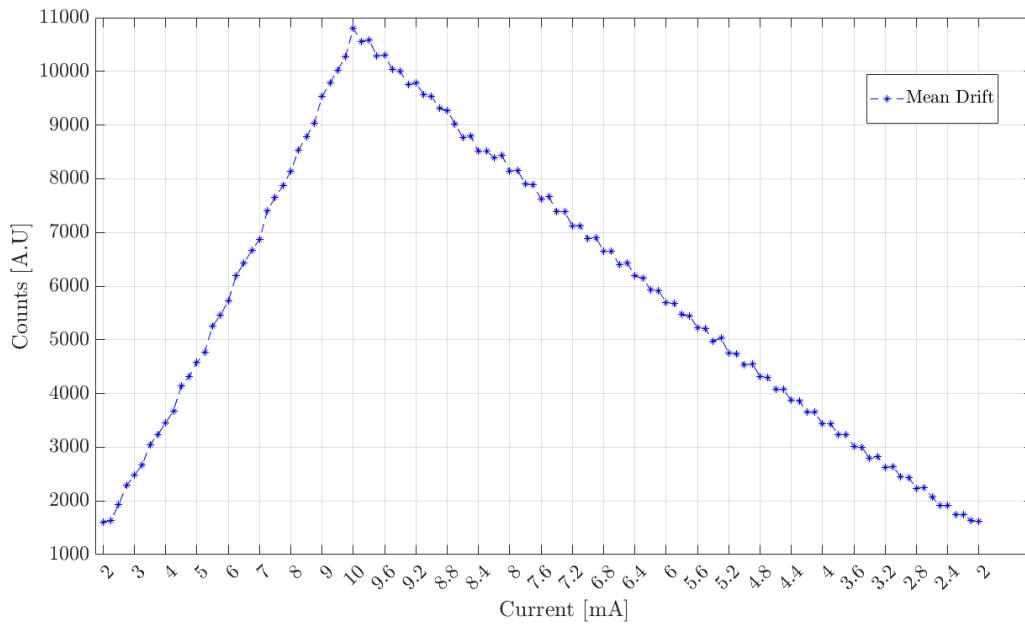


Figura 4.26: Andamento del picco emesso in funzione della corrente I_{LED} .

Tuttavia le prove appena riportate sono state svolte con correnti di polarizzazione del LED in un range abbastanza basso, che si aggirano nell'ordine dei mA , non sufficienti a fare scaldare il LED come desiderato e provocare di conseguenza una deriva di tipo termico. Spaziando nel range delle correnti basse si è comunque riusciti a stimare la sensibilità del *Rainbow*, che notava variazioni nell'emissione del LED causate da variazioni in corrente nell'ordine dei $100\mu A$.

Per provocare un buon riscaldamento del LED stesso bisognava aumentare la corrente, arrivando ad avere una corrente $I_{LED,max} = 1A$. In questo modo però sorgeva un ulteriore problema, che era il raggiungimento della saturazione nel *Rainbow*, anche usando sia tempo di esposizione che guadagno bassi.

Per aggirare l'ostacolo abbiamo interposto tra LED e la coppia *Rainbow*-spettrometro un attenuatore ottico, cioè un vetrino che attenua l'intensità della luce trasmessa man mano che ci si sposta lungo la sua lunghezza. In questo modo abbiamo potuto spingere il LED a corrente massima nominale ($I_{LED} = 1A$) e acquisire quanto accadeva.

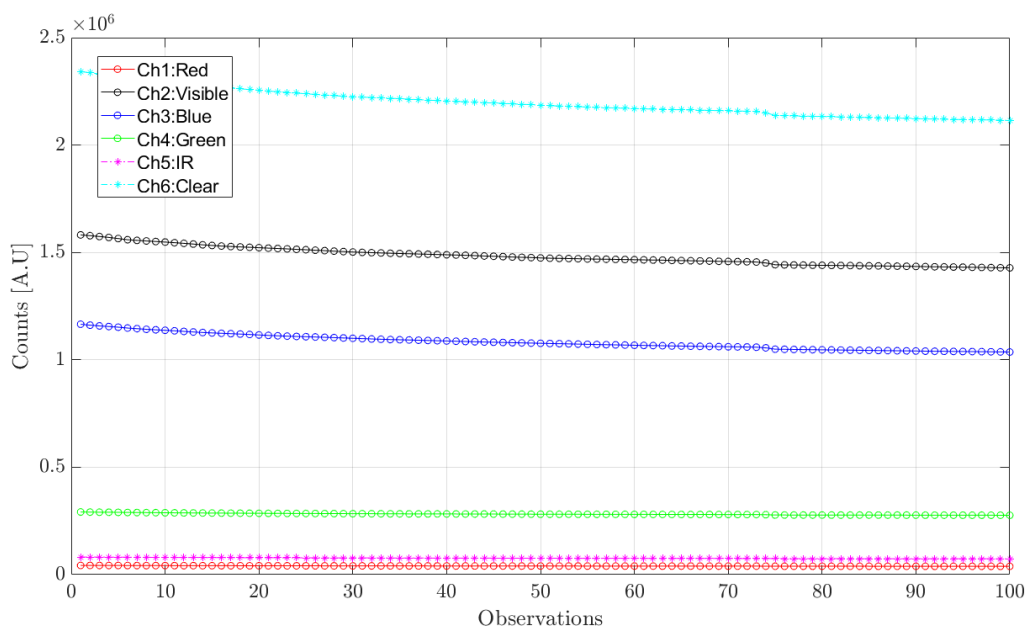


Figura 4.27: Calo del picco all'aumentare della temperatura del LED.

Ed ecco che in questo modo è stato raggiunto un primo traguardo, consistente nel rilevare le derivate termiche nel LED. Infatti dopo avere lasciato il LED in *free-running* per un paio di minuti circa ed acquisendo continuamente col sensore si è riusciti ad ottenere il grafico appena riportato, in cui si vede il calo rilevato.

Dopo questo piccolo successo lato sensore si è passati ovviamente ad acquisire lo stesso evento, nelle stesse condizioni, usando lo spettrometro.

Il risultato ottenuto è il seguente:

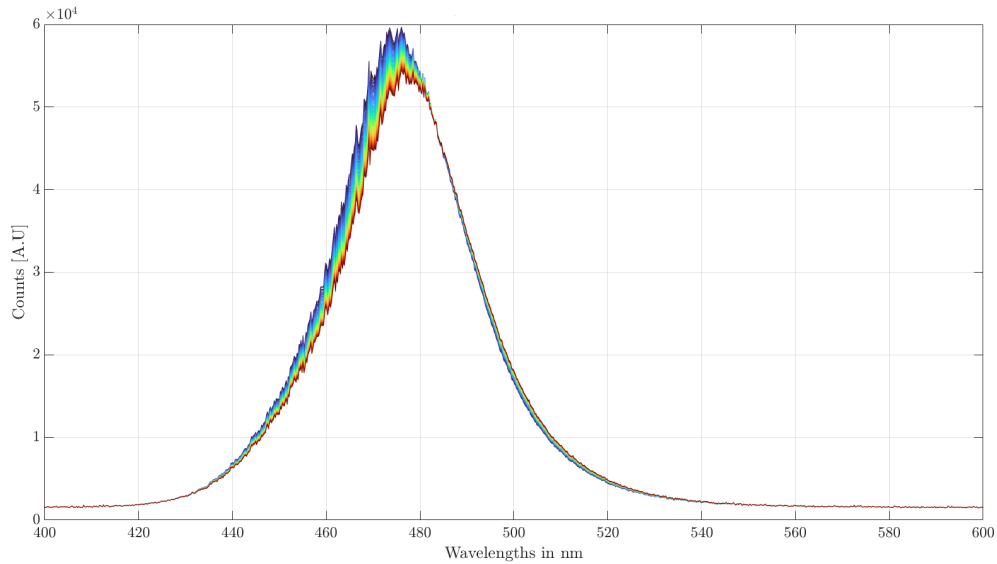


Figura 4.28: Spettri medi del LED blu in funzione dell'aumento della temperatura.

Anche qui è visibile il calo, nella parte centrale degli spettri dove si ha il picco. Inoltre è stato ricavato anche un ulteriore grafico, che mostra quanto si riducono sia il picco che l'area degli spettri medi acquisiti durante il riscaldamento del LED:

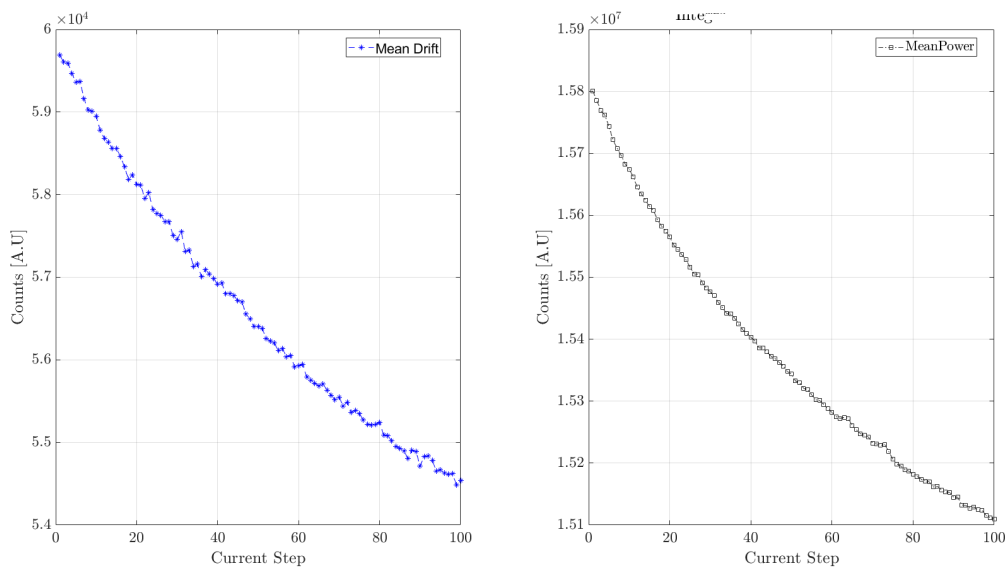


Figura 4.29: Riduzione del picco e delle aree degli spettri del LED.

Il LED ambra

Quanto fatto per il LED blu è stato anche svolto per il LED ambra, in entrambe le condizioni viste prima acquisendo gli spettri del LED sia col *Rainbow* che con lo spettrometro. La prima parte di questa nuova prova si è svolta impostando per i dispositivi i seguenti parametri:

- $T_{exp} = 32ms$ e
- $gain = 1x$ per il *Rainbow*,
- $T_{exp} = 80ms$ per lo spettrometro,

mentre il LED è stato polarizzato con una rampa di corrente crescente avente i seguenti parametri:

- $I_{min} = 0A$,
- $I_{max} = 1A$,
- $\Delta I_{LED} = 100mA$.

Ciò che il sensore riesce a vedere è riportato qui sotto:

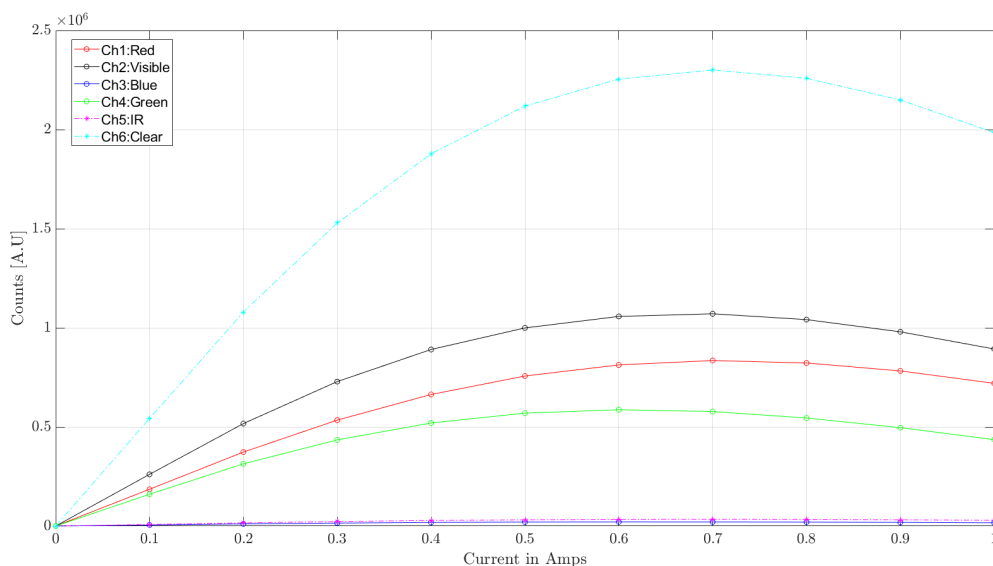


Figura 4.30: Andamento del LED ambra visto dal *Rainbow*.

Dal risultato del sensore si nota benissimo che questo LED soffre maggiormente la deriva termica. Infatti andando ad aumentare la corrente di un singolo step ci si aspetta un incremento della luminosità emessa, che si ha soltanto nella fase iniziale del transitorio.

Subito dopo infatti la luminosità si riduce. Mentre per quanto riguarda lo spettrometro si ottiene invece:

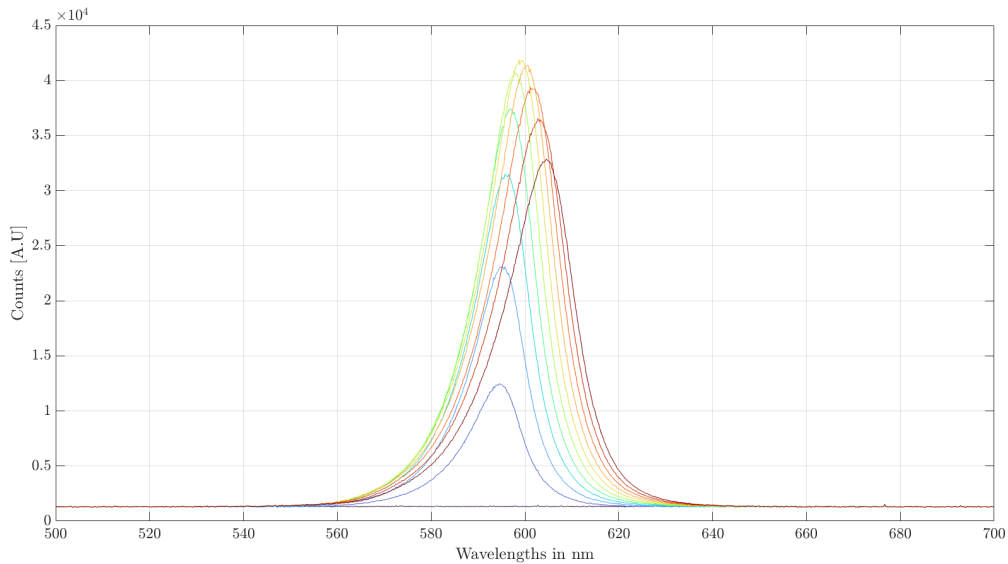


Figura 4.31: Andamento del LED ambra visto dal *Rainbow*.

Anche dal risultato ottenuto dallo spettrometro in figura 4.31 si può notare quanto riportato poco prima, cioè che all'aumentare della corrente di polarizzazione del LED si ha il picco che in una prima fase aumenta ma che poi decresce spostandosi nel contempo verso destra, si ha quindi anche uno shift in λ .

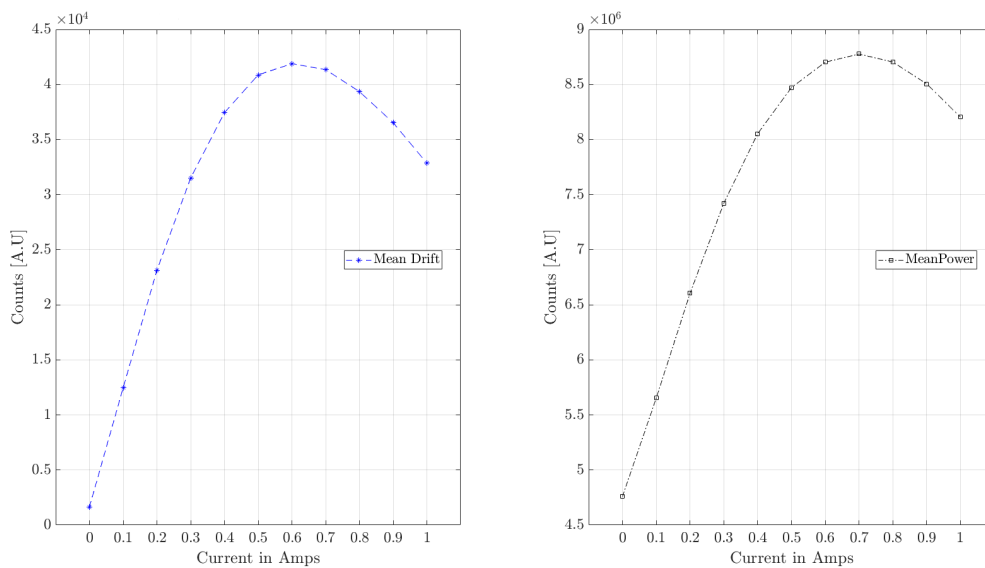


Figura 4.32: Andamento del picco e dell'area del LED ambra.

Nella figura 4.32 sono riportati gli andamenti del picco, che rispecchia quanto finora descritto e dell'area media degli spettri del LED che mostrano ad ulteriore conferma quanto questo LED perde all'aumentare della sua corrente di polarizzazione e di conseguenza della potenza dissipata. Infine abbiamo anche ricavato quanto vale lo shift in λ :

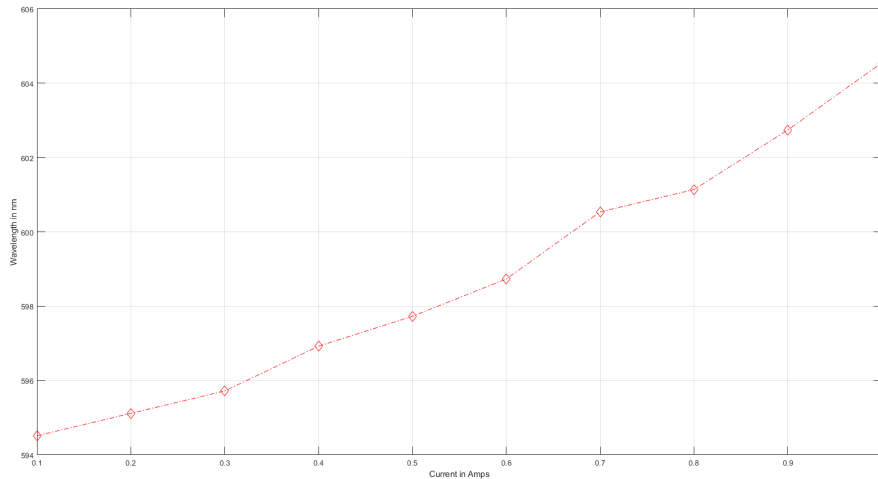


Figura 4.33: Shift in λ del picco del LED ambra in nm .

Dal grafico si vede che lo shift è abbastanza consistente, infatti si ricava $\Delta\lambda = 10nm$. Dopo avere visto questi risultati abbiamo deciso di condurre una nuova prova che consisteva nel fornire al LED degli step in corrente pari a $\Delta I_{LED} = 100\mu A$ e non più da $100mA$ e passare quindi a basse correnti di polarizzazione.

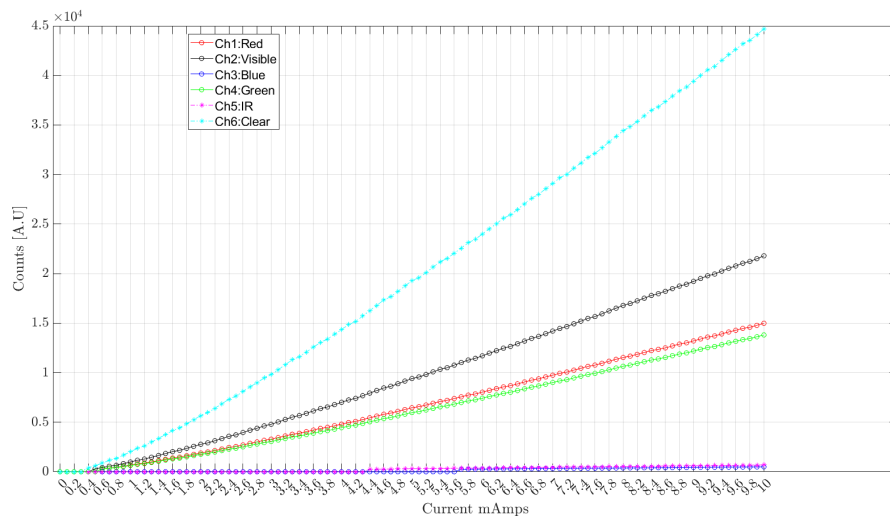


Figura 4.34: LED ambra visto nuovamente con il *Rainbow*.

Riassumendo quanto visto si può affermare che questa prova ci ha condotto ad un duplice e significativo risultato:

- il LED ambra è quello che soffre di più la deriva termica, ma polarizzandolo con step pari $\Delta I_{LED} = 100\mu A$ torna ad essere molto più lineare in funzione della corrente di polarizzazione fornitagli,
- il *Rainbow* riesce a misurare le variazioni nella luminosità emessa dal LED con $\Delta I_{LED} = 100\mu A$, come era successo prima quando il LED sotto misura era quello blu.

4.3. Effetti della temperatura sui LED

Le successive prove condotte sui LED ai fini della loro caratterizzazione sono state sempre tutte di tipo termico ed ottico e ciò è stato svolto con il duplice scopo di capire che relazione vi fosse tra l'autoriscaldamento oppure un riscaldamento imposto dall'esterno con l'emissione del LED stesso e lo shift in lunghezza d'onda, ma anche la quantificazione della variazione della temperatura durante l'esercizio.

Le prove sono state suddivise in 4 categorie, che sono:

1. LED in forno controllato spento con temperatura della camera climatica costante e polarizzazione costante, condizione che potremmo definire *free-running* e che somiglia molto alla condizione operativa nel dispositivo Q3-Plus,
2. LED in forno controllato con applicazione di rampa termica esterna,
3. LED in forno controllato sempre spento polarizzato con rampa di corrente dall'alimentatore,
4. LED in forno controllato spento ma raffreddato tramite ventolina esterna.

Queste prove sono state condotte monitorando sia la temperatura del LED che quella *ambientale* mediante l'uso di 2 termocoppie, lette dal multiplexer, di cui una vicino al dissipatore sul quale viene saldato il LED ed una vicino ad una delle pareti laterali del forno stesso.

Ovviamente tutte le prove elencate sono state condotte sia per il LED blu che per quello ambra, come era stato svolto precedentemente durante la loro caratterizzazione iniziale. Il setup di misura si compone di: alimentatore, multiplexer, *Rainbow*, i LED, la ventola e degli elementi realizzati ad hoc mediante software CAD e stampati in 3D che servivano da supporto al *Rainbow*, al LED con il suo dissipatore ed alla ventola.

Nelle immagini a seguire saranno riportati la visione esterna e quella interna del setup impiegato.

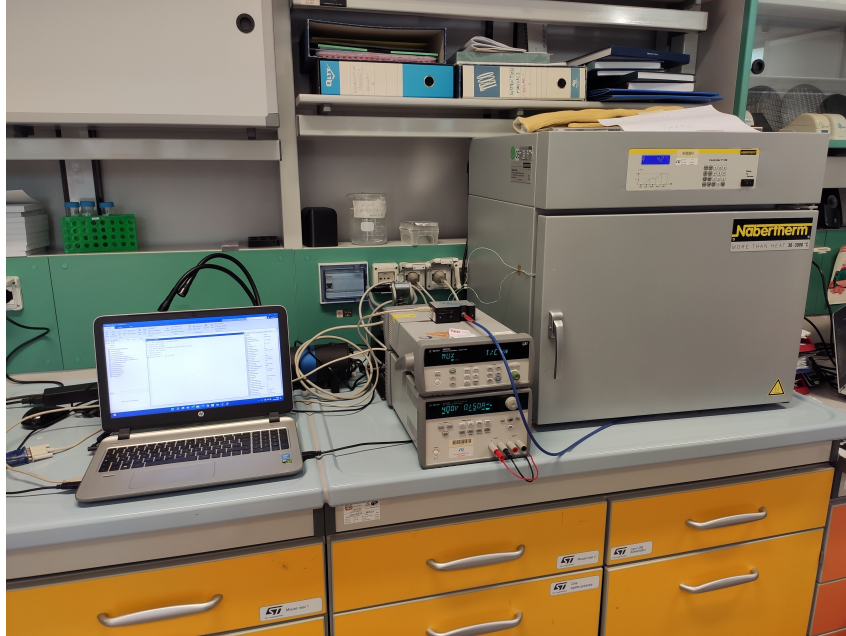


Figura 4.35: Setup esterno e strumenti usati per le misure LED vs temperatura.



Figura 4.36: Setup interno per le misure LED vs temperatura con relative stampe 3D.

4.3.1. Le variazioni nel LED ambra

Per quanto riguarda le prove termiche sul LED ambra iniziamo a riportare i risultati del caso n°1, cioè LED acceso con corrente di polarizzazione costante e pari a $I_{LED} \approx 700mA$, valore abbastanza vicino a quello che si imposta col protocollo termico 4λ che vedremo più avanti, mostrando cosa si ottiene sia a livello termico che ottico:

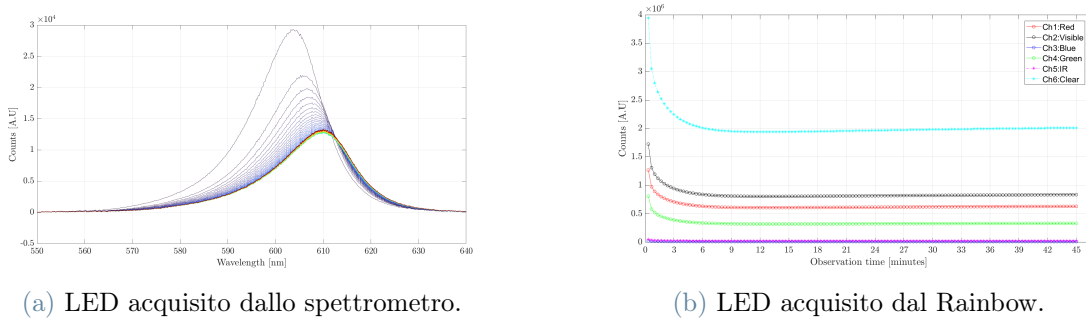


Figura 4.37: Variazioni nell'emissione del LED ambra a causa dell'autoriscaldamento.

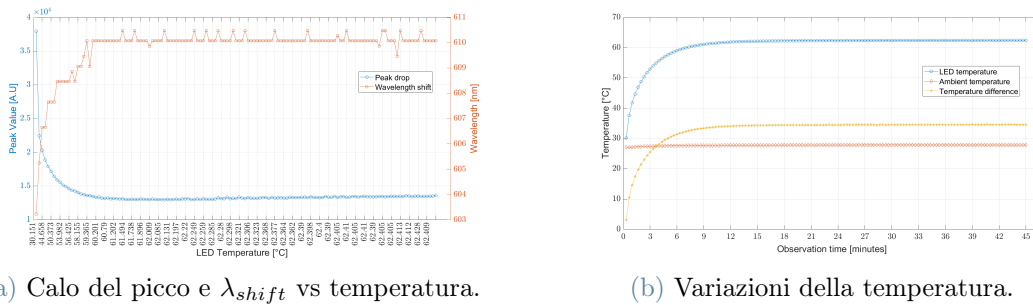


Figura 4.38: Variazioni nell'emissione del LED ambra a causa dell'autoriscaldamento.

Quanto si può leggere nei grafici è stato riassunto per comodità nella tabella:

ΔT	$\Delta\lambda$	$\Delta Rainbow$	$\Delta spect$
32°C	7nm	50%	57%

Tabella 4.2: Risultati del LED ambra statico.

Dai risultati si nota che effettivamente la condizione di free-running provoca un consistente riscaldamento che poi sarà limitato dal dissipatore in rame e un relativo shift, soprattutto in lunghezza d'onda.

Passando al caso 2 e applicando la rampa termica, simile a quella impiegata nella caratterizzazione del rumore di buio del sensore, al LED ambra polarizzato sempre con corrente costante si ottiene invece:

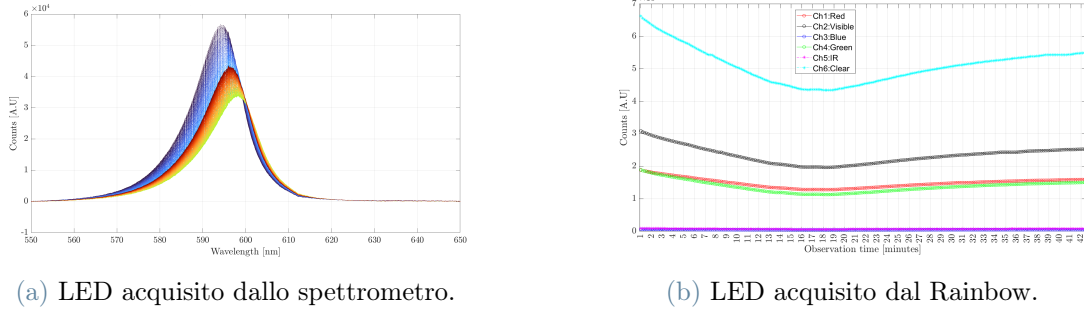


Figura 4.39: Variazioni nell'emissione del LED ambra a causa della rampa termica.

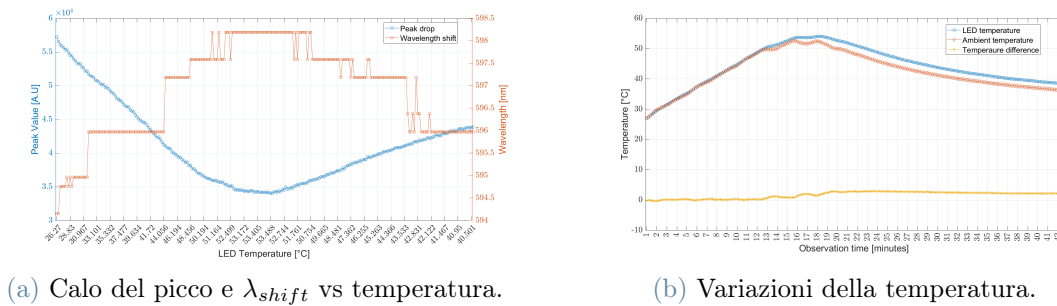


Figura 4.40: Variazioni nell'emissione del LED ambra a causa della rampa termica imposta.

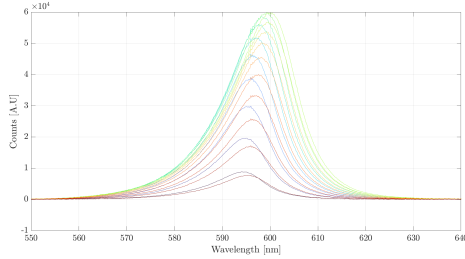
Anche qui i risultati sono riportati in tabella per comodità:

ΔT	$\Delta \lambda$	$\Delta Rainbow$	$\Delta spect$
28°C → 55°C → 38°C	4nm → 2nm	33% → 16%	40% → 21%

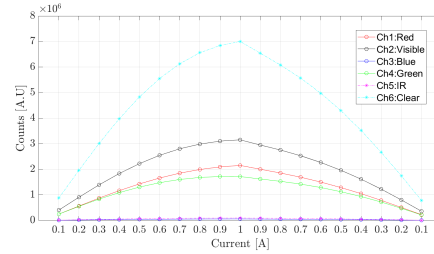
Tabella 4.3: Risultati del LED ambra in rampa di temperatura.

In questo caso invece si può notare che le derive termiche del LED in termini di emissione e shift in λ seguono in modo coerente la rampa termica che viene imposta esternamente dal forno, infatti si ha una prima fase nella quale si ha un calo netto connesso all'aumento della temperatura per poi avere una leggera ripresa con la successiva diminuzione della temperatura stessa. Infatti in tabella sono stati riportati anche i valori intermedi.

Passiamo ora a mostrare i risultati ottenuti nel caso n°3, in cui il LED è stato alimentato con una rampa di corrente prima crescente e poi decrescente, che va da $I_{LED,min} = 100mA$ fino ad $I_{LED,max} = 1A$, fornendo uno step pari a $\Delta I_{LED} = \pm 100mA$:

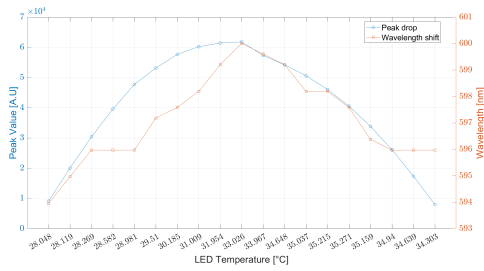


(a) LED acquisito dallo spettrometro.

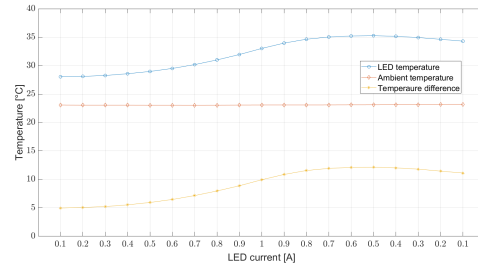


(b) LED acquisito dal Rainbow.

Figura 4.41: Variazioni nell'emissione del LED ambra a causa della rampa di corrente.



(a) Calo del picco e λ_{shift} vs temperatura.



(b) Variazioni della temperatura.

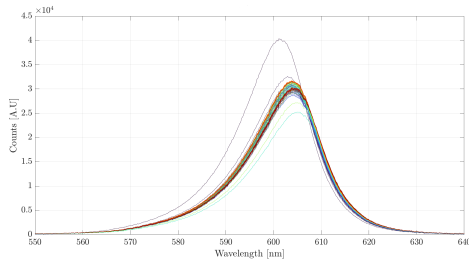
Figura 4.42: Variazioni nell'emissione del LED ambra a causa della rampa in corrente imposta.

In questo caso invece si nota che l'andamento del LED si può definire in un certo senso simmetrico rispetto alla rampa in corrente che gli è stata fornita, infatti i valori iniziale e finale di ognuna delle grandezze fisiche acquisite coincidano, ad eccezione della sola lunghezza d'onda che shifta ancora e della temperatura che non torna giustamente al valore iniziale poiché essendo alimentato a bassa corrente nello stato finale il LED consumerà pur sempre della potenza essendo ancora acceso.

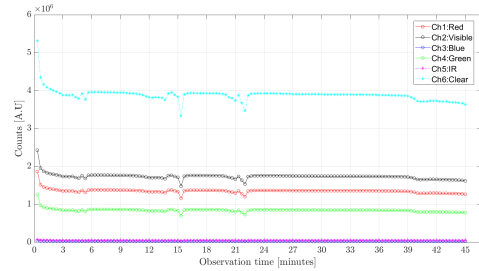
ΔT	$\Delta \lambda$	$\Delta Rainbow^1$	$\Delta spect^1$
28°C \rightarrow 34°C	2nm	$2.5 \cdot 10^4$ nel Visible	$5 \cdot 10^4$

Tabella 4.4: Risultati del LED ambra in rampa di corrente.

Come ultimo caso si ha quello che potrebbe essere la *candidata soluzione* al problema termico dei LED: il raffreddamento non più passivo usando la sola barretta dissipatrice in rame, ma diventa di tipo attivo con una ventolina che riduce il calore:

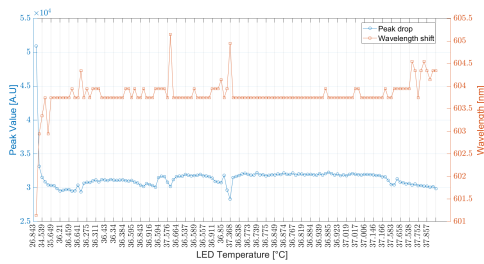


(a) LED acquisito dallo spettrometro.

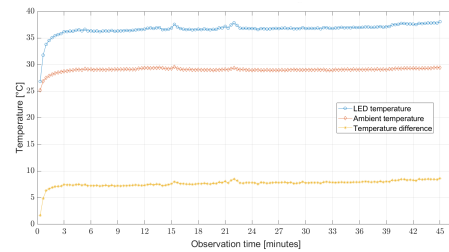


(b) LED acquisito dal Rainbow.

Figura 4.43: Variazioni nell'emissione del LED ambra raffreddato dalla ventola.



(a) Calo del picco e λ_{shift} vs temperatura.



(b) Variazioni della temperatura.

Figura 4.44: Variazioni nell'emissione del LED ambra raffreddato dalla ventola.

ΔT	$\Delta \lambda$	$\Delta Rainbow$	$\Delta spect$
28°C \rightarrow 38°C	3nm	30%	40%

Tabella 4.5: Risultati del LED ambra raffreddato con la ventola.

In questo ultimo caso si può notare già partendo dagli spettri che il LED è molto più stabile: si ha un overshoot iniziale all'accensione ma subito dopo gli spettri sono concentrati in una singola zona come succede anche per il picco.

Inoltre anche il *Rainbow* riporta dei segnali molto più piatti e la leggera discesa iniziale conferma l'elongazione iniziale. Infine, essendo la variazione in temperatura più contenuta, anche la variazione in lunghezza d'onda λ_{LED} è, a sua volta, più contenuta.

4.3.2. Le variazioni nel LED blu

Adesso passeremo al LED blu e seguiremo lo stesso ordine impiegato per il LED ambra per l'acquisizione dei dati. Saranno poi mostrati tutti i risultati che sono stati ottenuti, iniziando dal caso n°1 nel quale si ha il LED acceso con polarizzazione costante.

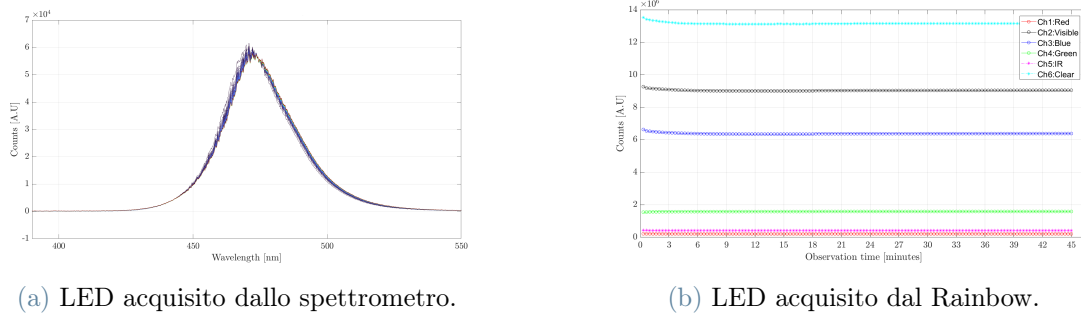


Figura 4.45: Variazioni nell'emissione del LED blu a causa dell'auto-riscaldamento.

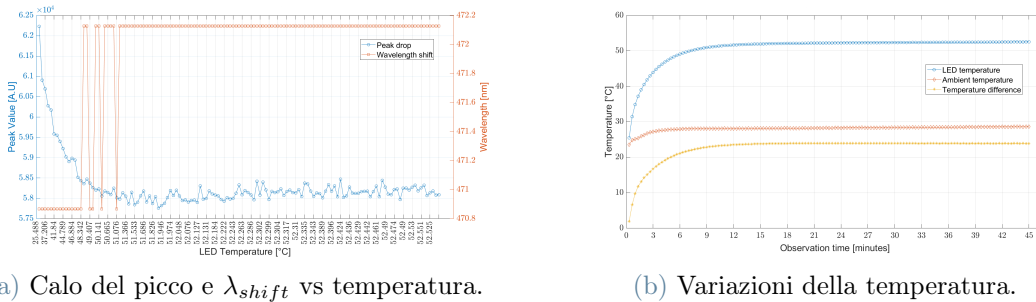


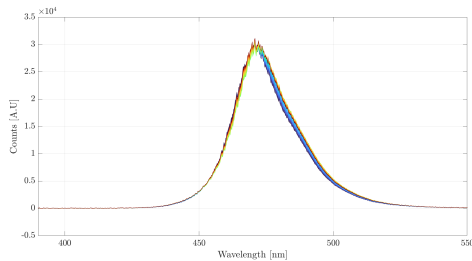
Figura 4.46: Variazioni nell'emissione del LED blu a causa dell'auto-riscaldamento.

Guardando in ordine tutti i risultati del primo caso, si nota subito che il LED blu soffre sempre di meno la deriva termica rispetto all'ambra, come si era visto precedentemente nei risultati della sezione 4.2.1. Infatti anche in questo caso le variazioni in termini di lunghezza d'onda e luce emessa sono davvero contenute, infatti gli spettri sono tutti sovrapposti e il *Rainbow* non misura un calo. Tutte le informazioni sono riportate in tabella:

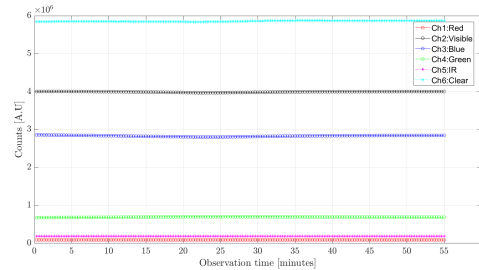
ΔT	$\Delta \lambda$	$\Delta_{Rainbow}$	Δ_{spect}
25°C \rightarrow 52°C	1.2nm	5%	7%

Tabella 4.6: Risultati del LED blu statico.

Passando al caso n°2 invece, applicando la stessa rampa termica vista più volte. Il LED è stato alimentato con $I_{LED} = 250mA$ e si sono ottenuti i seguenti risultati:

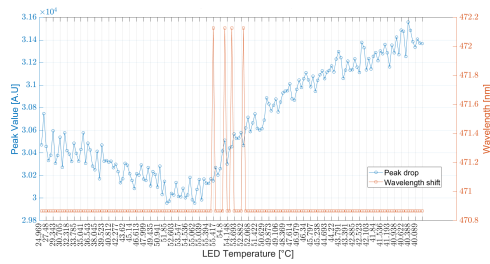


(a) LED acquisito dallo spettrometro.

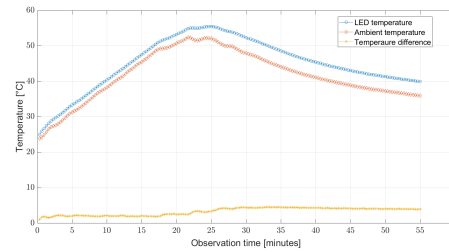


(b) LED acquisito dal Rainbow.

Figura 4.47: Variazioni nell'emissione del LED blu a causa della rampa termica esterna.



(a) Calo del picco e λ_{shift} vs temperatura.



(b) Variazioni della temperatura.

Figura 4.48: Variazioni nell'emissione del LED blu a causa della rampa termica esterna.

Andiamo ad analizzare i dati ottenuti dal LED blu sotto l'azione della rampa termica. Guardando in prima battuta gli spettri acquisiti dallo spettrometro sembra non ci sia dispersione in termini di picco emesso e lunghezza d'onda, infatti gli spettri sono tutti sovrapposti. Anche dai dati rilevati dal *Rainbow* sembra che il LED sia molto stabile per quanto riguarda l'emissione. Nel grafico 4.48b invece la stabilità in termini di λ viene confermata, si nota solo qualche punto con un leggero shift che poi rientra; mentre per quanto riguarda il picco pare esserci un leggero incremento ma è dovuto al raffreddamento dell'ambiente circostante al LED stesso.

ΔT	$\Delta \lambda$	$\Delta_{Rainbow}$	Δ_{spect}
25°C → 55°C → 40°C	No variazione	No variazione	2% → +2.5%

Tabella 4.7: Risultati del LED blu in rampa termica.

Passando nuovamente al caso n°3 anche per il LED blu, nel quale si alimenta il LED con la rampa di corrente vista per il LED ambra, i risultati che si ottengono sono:

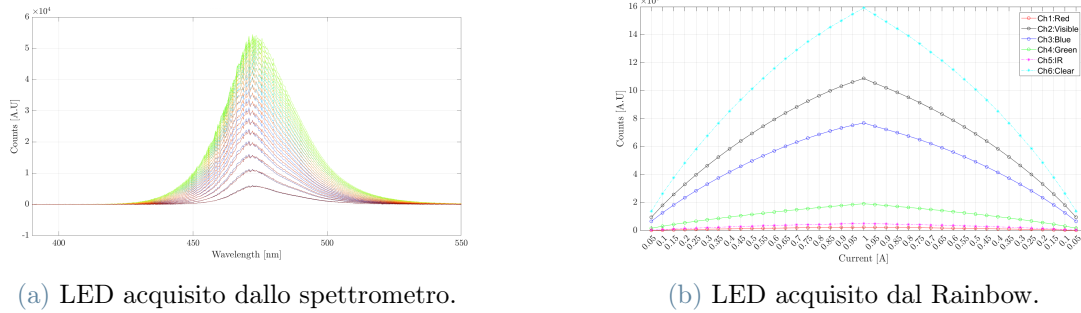


Figura 4.49: Variazioni nell'emissione del LED blu a causa della rampa di corrente.

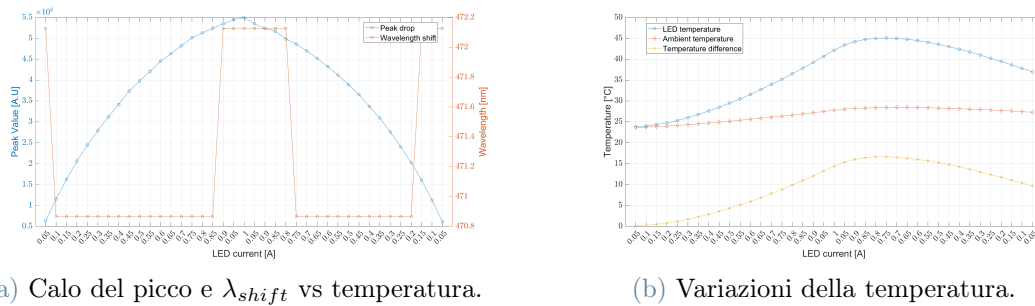


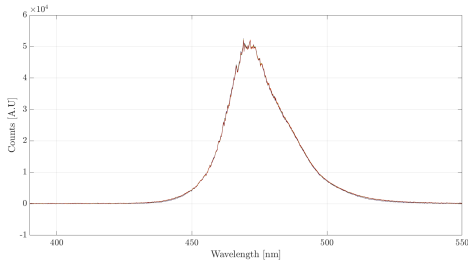
Figura 4.50: Variazioni nell'emissione del LED blu a causa della rampa di corrente.

In questo caso invece si nota come il LED segua in modo più lineare nella sua risposta la variazione della corrente. Anche qui si avranno, per così dire, 2 zone distinte, dettate dalla simmetria della rampa di corrente applicata. Nella parte centrale si avrà la massima corrente, $I_{LED} = 1A$ e di conseguenza le massime derive a causa della massima dissipazione di potenza, inoltre non si hanno variazioni tra i dati acquisiti negli istanti iniziale e finale in termini di luce emessa (picco di emissione misurato sia dal *Rainbow* che dallo spettrometro). Il tutto si può riassumere nella tabella sottostante:

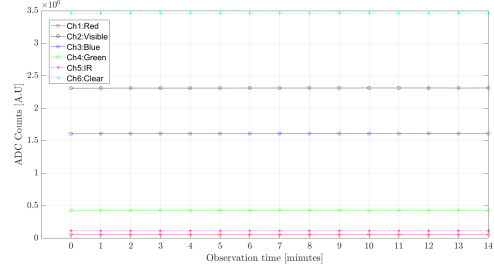
ΔT	$\Delta \lambda$	$\Delta_{Rainbow}^2$	Δ_{spect}^2
25°C → 55°C → 40°C	±2nm	7.5 · 10 ⁶ nel Blu	5 · 10 ⁴

Tabella 4.8: Risultati del LED blu in rampa di corrente.

Come ultimo step, anche per il LED blu è stato ripetuto l'esperimento del caso 1 ma raffreddando il LED con una ventola esterna, come fatto con il LED ambra, ottenendo:

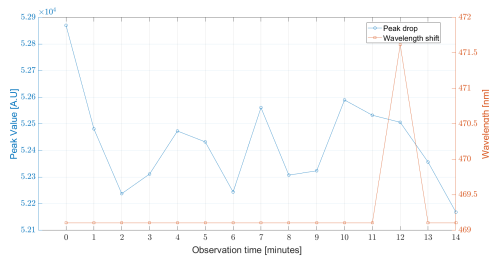


(a) LED acquisito dallo spettrometro.

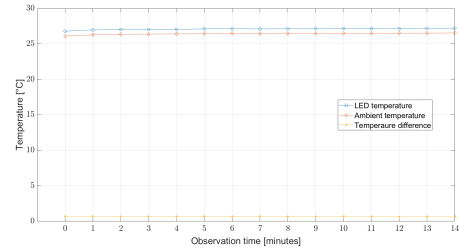


(b) LED acquisito dal Rainbow.

Figura 4.51: Variazioni nell'emissione del LED blu raffreddato dalla ventola.



(a) Calo del picco e λ_{shift} vs temperatura.



(b) Variazioni della temperatura.

Figura 4.52: Variazioni nell'emissione del LED blu raffreddato dalla ventola.

In questo caso invece si può notare per l'ennesima volta che il LED blu non soffre eccessivamente di deriva termica come accade invece al LED ambra, infatti guardando i risultati ottenuti sia dallo spettrometro che dal *Rainbow* si nota chiaramente che gli spettri sono tutti nella stessa regione e che non si ha variazione.

Per quanto riguarda invece l'oscillazione del picco si nota che è molto contenuta mentre per quanto riguarda lo shift in lunghezza d'onda si può dire che è praticamente costante a parte un singolo spike distante $\Delta\lambda = 3nm$ dal valore nominale.

Riassumendo ancora una volta in tabella:

ΔT	$\Delta\lambda$	$\Delta Rainbow$	$\Delta spect$
26°C \rightarrow 26.6°C	3nm	trascurabile	0.6%

Tabella 4.9: Risultati del LED blu raffreddato con la ventola.

Note:

^{1,2} in questo caso non è stata calcolata la variazione relativa nel *Rainbow*, ma è stata invece calcolata l'escursione massima poiché i valori iniziali e finali coincidono a causa della rampa di corrente.

4.4. La caratterizzazione dei filtri del Q3-Plus

Un ulteriore passo avanti svolto durante il lavoro è stato la caratterizzazione dei filtri ottici di cui si era parlato in precedenza nel capitolo 2, precisamente nella sezione 2.2.2 riguardante la parte ottica del dispositivo Q3-Plus.

Tale studio è stato condotto per poter testare utilizzando il *Rainbow* che il loro impiego rispecchiasse le caratteristiche di progetto in termini di trasferimento in banda di interesse e attenuazione nella banda oscura per i segnali.

Inoltre va ricordato che nella tabella 2.1 vista nella sezione 2.2.2 sono riportati i modelli dei filtri impiegati e le loro principali caratteristiche tecniche, in termini di lunghezza d'onda centrale e larghezza di banda unilatera.

Saranno mostrati i risultati dei test svolti sui singoli filtri di ogni canale ottico del dispositivo Q3-Plus, acquisiti utilizzando una sorgente luminosa ad ampio spettro e lo spettrometro introdotto e descritto ad inizio di questo capitolo.

L'ordine di acquisizione degli spettri è il seguente:

1. spettro della sorgente impiegata,
2. spettro del filtro di eccitazione,
3. spettro del filtro di emissione,
4. spettro della cascata di entrambi i filtri.

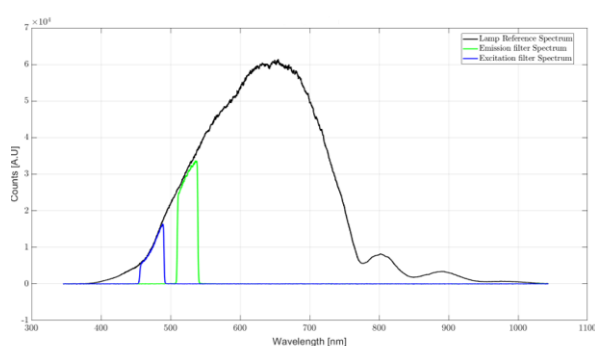
I risultati delle acquisizioni tramite lo spettrometro saranno riportati in 2 diversi tipi di grafico, nell'ordine in basso:

1. grafico con gli spettri della sorgente e dei filtri in funzione della lunghezza d'onda λ ,
2. grafici della trasmissione dei filtri in funzione della lunghezza d'onda λ .

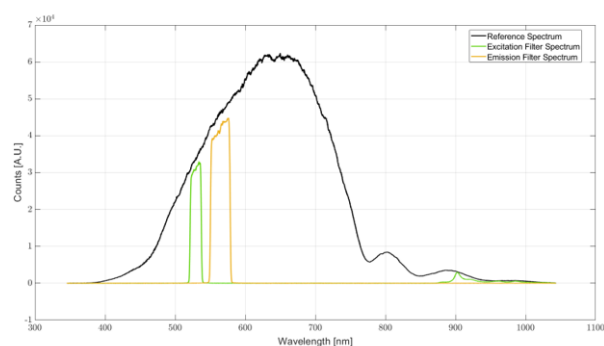
Per leggere in modo ottimale i grafici che seguono, riguardanti i filtri ottici, si può fare ricorso alla legenda dei colori degli spettri riportati in tabella nella pagina successiva.

Canale Q3-Plus	Colore eccitazione	Colore emissione	Colore sorgente
1	Blu	Verde	Nero
2	Verde	Ocra	Nero
3	Verde	Arancio	Nero
4	Rosso	Verde	Nero

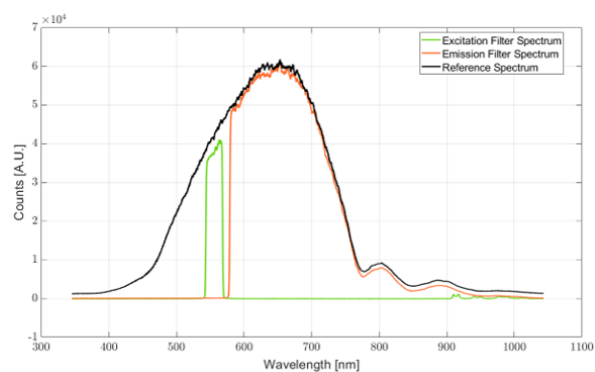
Tabella 4.10: Legenda per i grafici degli spettri dei filtri ottici e delle loro trasmissioni.



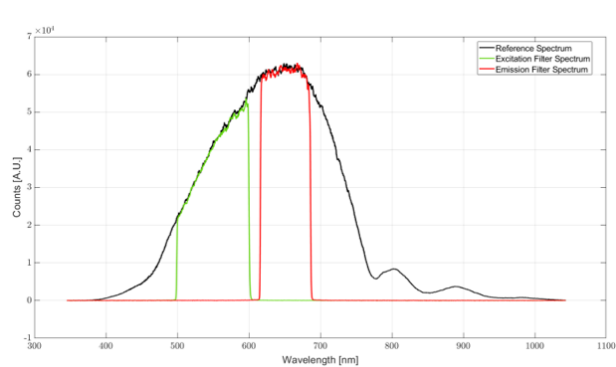
(a) Spettri dei filtri del canale 1.



(b) Spettri dei filtri del canale 2.



(c) Spettri dei filtri del canale 3.

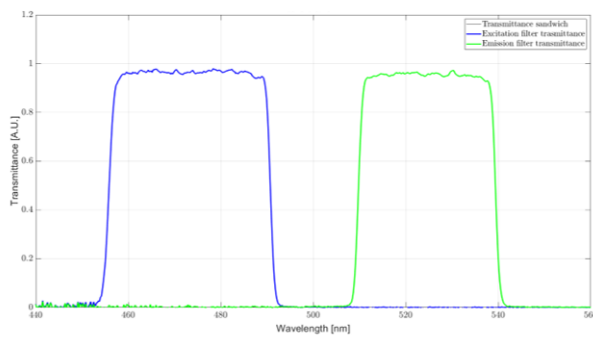


(d) Spettri dei filtri del canale 4.

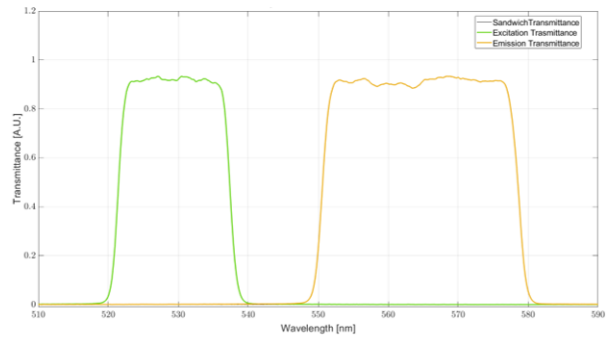
Figura 4.53: Spettri della sorgente ad ampio spettro, del filtro di eccitazione e di emissione dei 4 canali ottici del Q3-Plus.

Nei successivi grafici sono riportate invece le curve di trasmissione dei filtri normalizzate, sul cui asse delle ordinate si ha la frazione percentuale di luce trasmessa rispetto alla luce incidente sul filtro stesso.

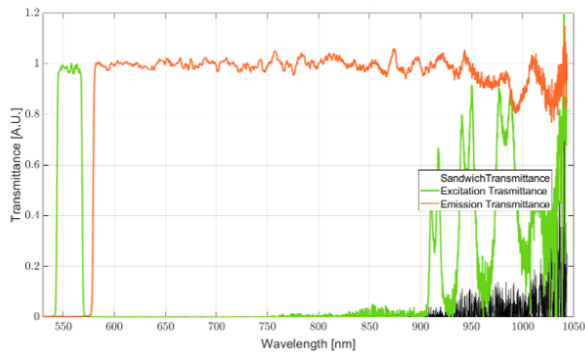
Va ricordato che il setup di misura rimane del tutto invariato, mentre il risultato ottenuto è mostrato nella pagina a seguire.



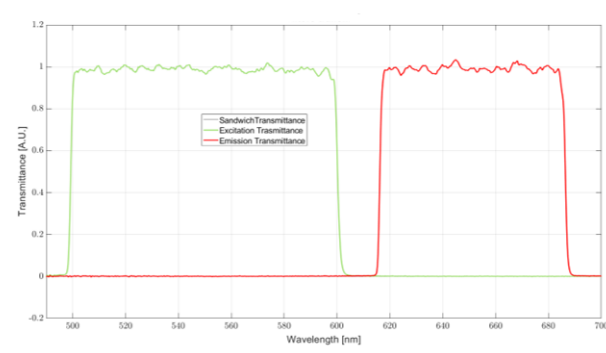
(a) Trasmissione dei filtri del canale 1.



(b) Trasmissione dei filtri del canale 2.



(c) Trasmissione dei filtri del canale 3.



(d) Trasmissione dei filtri del canale 4.

Figura 4.54: Curve di trasmissione dei filtri di eccitazione, emissione dei 4 canali ottici del Q3-Plus e della cascata di entrambi.

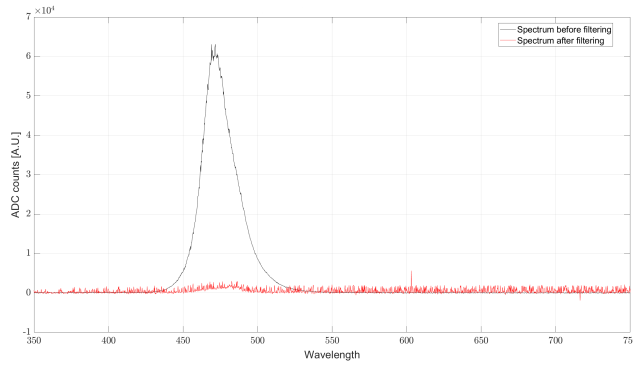
Riassumiamo brevemente cosa si ottiene dai grafici sui filtri finora mostrati:

- nei canali 1, 2 e 4 si nota una buona separazione tra la banda ottica passante di eccitazione e la banda ottica passante di emissione, il che significa che si ha una banda oscura nel mezzo che dovrebbe assicurare l'assenza di fenomeni ottici di disturbo per le misure in fluorescenza,
- nel canale 2 si ha una piccola coda del filtro di eccitazione nella zona degli IR ,
- lo stesso discorso è valido nel canale 3 nel quale ricordiamo che il filtro di emissione è un *filtro passabanda* (*BPF*) e l'effetto è molto più visibile nelle relative curve di trasmissione.

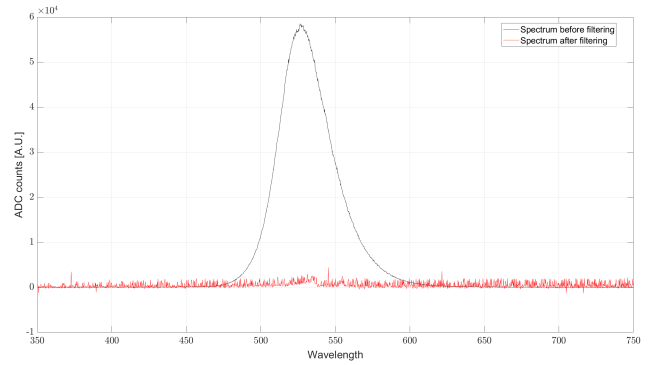
Dopo avere testato i filtri e la loro attenuazione attraverso una sorgente ad ampio spettro, la prova è stata svolta di nuovo impiegando come sorgenti i LED.

Le specifiche vengono rispettate, poiché questa volta avremo l'azione del filtro di eccitazione incentrata ad hoc sullo spettro del LED ed inoltre ciò è stato verificato su 2 fronti

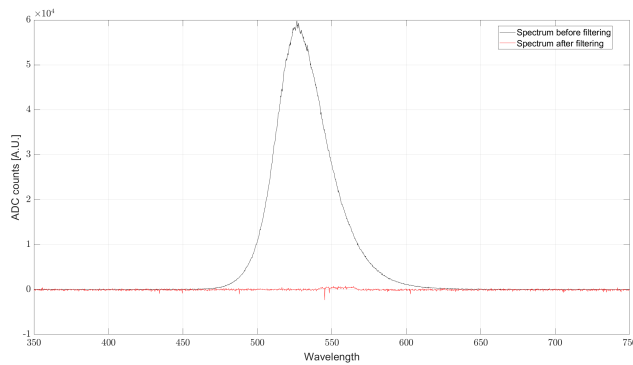
in parallelo, cioè sia attraverso lo spettrometro che attraverso il *Rainbow*. I risultati che si ottengono lato spettrometro sono:



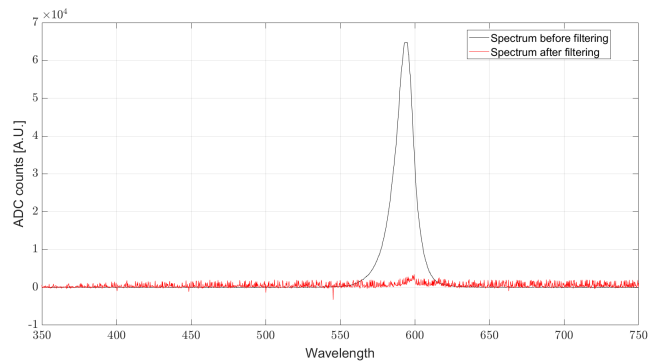
(a) Attenuazione cascata del canale 1.



(b) Attenuazione cascata del canale 2.



(c) Attenuazione cascata del canale 3.



(d) Attenuazione cascata del canale 4.

Figura 4.55: Curve di trasmissione della cascata dei filtri di eccitazione e di emissione dei 4 canali ottici del Q3-Plus illuminati dai LED.

Come si nota dai grafici l'attenuazione attesa, cioè l'OD6, non è visibile poiché il FSR dello spettrometro è nell'ordine del 10^4 dato che il suo ADC lavora su 16bit e quindi il massimo OD rilevabile sarebbe l'OD4. L'esperimento è stato condotto anche con il *Rainbow*, impostandone i seguenti parametri per l'acquisizione:

- $T_{exp} = 800ms$ e $gain = 5x$ per il canale 1,
- $T_{exp} = 832ms$ e $gain = 7.14x$ per il canale 2,
- $T_{exp} = 864ms$ e $gain = 10x$ per il canale 3,
- $T_{exp} = 960ms$ e $gain = 16.67x$ per il canale 4.

In questa prova nel *Rainbow* sono stati impostati dei valori alti sia per il tempo di integrazione che per il guadagno analogico poiché tra il LED ed il *Rainbow* stesso era stato inserito un attenuatore ottico al fine di riuscire poi ad alimentare quasi alla massima corrente nominale i LED stessi per testare l'attenuazione del filtro di eccitazione che lascia passare lo spettro del LED.

I risultati ottenuti sono classificati in tabella e sono divisi per canale ottico del dispositivo, del *Rainbow*, valore lettura pre e post inserimento della cascata dei filtri ed infine valore dell'attenuazione misurato:

Q3-Plus Ch.	Rainbow Ch.	Lettura LED	Lettura Cascata	Attenuazione
1	3 Blu	16251700	338	$2.08 \cdot 10^{-5}$
2	4 Green	10442260	286	$2.74 \cdot 10^{-5}$
3	4 Green	8296875	247	$2.98 \cdot 10^{-5}$
4	1 Red + 4 Green	16240343	446	$2.75 \cdot 10^{-5}$

Tabella 4.11: Risultati prova attenuazione cascata con il *Rainbow*.

Il risultato che è stato ottenuto da tale prova è che il *Rainbow*, essendo molto più sensibile e meno rumoroso dello spettrometro, riesce quasi a rilevare l'ordine di grandezza dell'attenuazione nominale dei filtri.

4.5. Il Rainbow nel Q3-Plus

In questo paragrafo sono riportati invece i risultati dell'esperimento core di tutto il lavoro svolto, esperimento che prevedeva di inserire il *Rainbow* all'interno dello strumento Q3-Plus, in modo da avere un tracking dell'andamento dei 4 LED durante i cicli termici della reazione di qPCR. Il protocollo usato è il 4 λ che svolge 40 cicli termici ed usa tutti e 4 i canali disponibili del dispositivo i cui parametri ottici sono riportati in tabella:

Q3-Plus Channel	Fluoroforo	$T_{\text{exposure, Q3-Plus}}$ [ms]	LED power	Gain
1	FAM	500	5	13
2	VIC	1000	6	15
3	NED	500	8	15
4	ROX	500	6	14

Tabella 4.12: Parametri di acquisizione del protocollo 4 λ del Q3-Plus.

Una breve descrizione di tali parametri è riportata qui di seguito:

- $T_{\text{exposure}, Q3-Plus}$ è il tempo di esposizione del Q3-Plus, cioè tempo impiegato per acquisire attraverso le 4 camere il segnale in fluorescenza emesso dai campioni che erano stati precedentemente esposti,
- LED power invece è il valore in decimi (min 1 e max 10) della potenza ottica che può essere irradiata dal LED e ad esempio impostare tale valore sul 5 significa pilotare il LED con una corrente pari al 50% di quella massima,
- Gain invece è il valore del guadagno analogico che si ha dalle camere all'immagine finale (concetto simile alla sensibilità ISO).

Il setup di misura è molto semplice, il *Rainbow* è stato attaccato sopra una cartuccia del dispositivo stesso cosicché potesse monitorare i segnali dei LED provenienti dall'alto dalla testa ottica, come mostrato in figura:



(a) Il sensore sulla cartuccia.



(b) Aggiunta vista della testa ottica.

Figura 4.56: Setup di misura con il sensore all'interno del Q3-Plus.

Per quanto riguarda il sensore abbiamo impostato i seguenti parametri di acquisizione:

- $T_{\text{exp}} = 144ms$,
- $gain = 1x$

e lo abbiamo lasciato acquisire quanti più dati all'interno di ogni singolo canale per ogni ciclo termico seguendo l'espressione:

$$\# \text{ of shots} = \frac{T_{exp,Q3-Plus,channel}}{T_{exp,Rainbow,channel}} \quad (4.3)$$

Dopo avere acquisito e riordinato tutti i dati il risultato ottenuto dal Rainbow è stato il seguente:

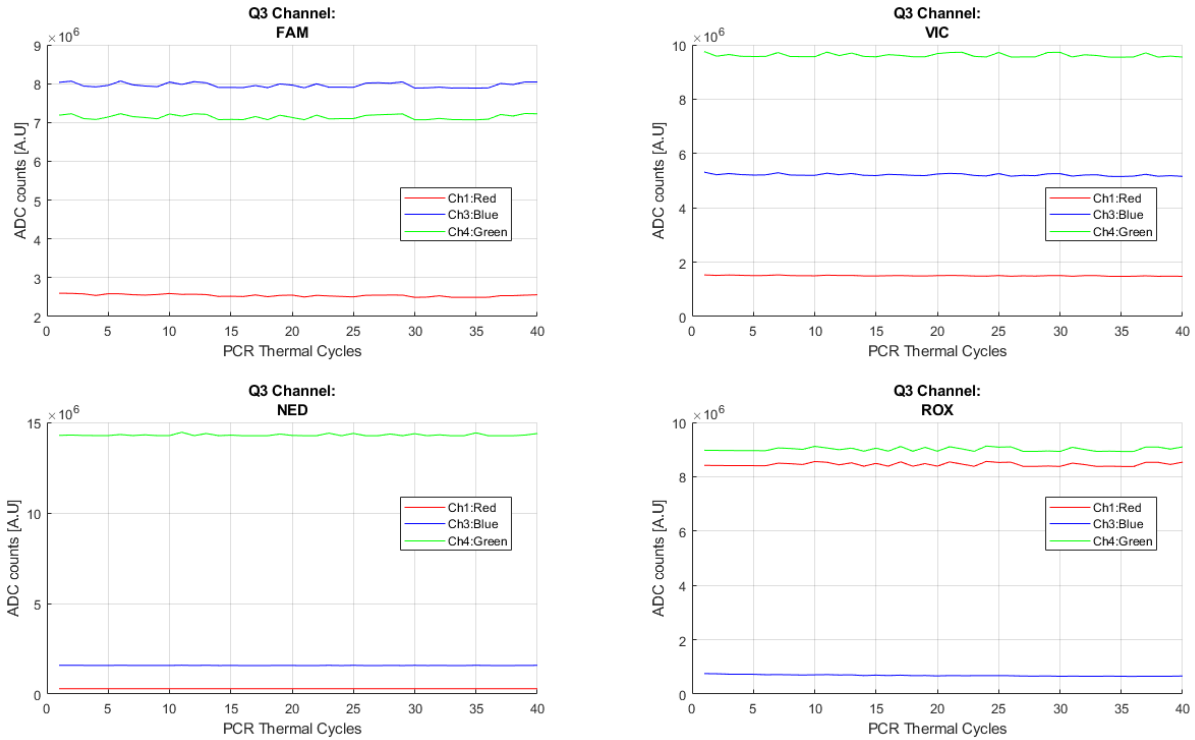


Figura 4.57: Andamento dei LED durante la qPCR monitorati con il sensore.

Purtroppo il sensore non è riuscito a rilevare i cali nei LED che avevamo mostrato con i precedenti esperimenti.

Per ognuno dei 4 canali non si nota infatti un calo netto nelle componenti spettrali della luce emessa dai LED, ma si ha solo una leggera fluttuazione intorno a quello che è il valore medio. Il risultato inoltre è abbastanza inatteso dato che mentre si caratterizzavano i LED il sensore era stato in grado di rilevare variazioni nella luminosità emessa causata da variazioni in corrente di circa $\Delta I_{LED} = 100\mu A$.

Una nuova tipologia di analisi dei dati ottenuti a partire dai canali fisici di acquisizione consiste nel calcolo della *Correlated Color Temperature*. La temperatura di colore [14] è una caratteristica della luce emessa nello spettro del visibile ed è una misura dell'ap-

parenza del colore della luce emessa da una sorgente che va a relazionare tale colore con quello della luce emessa da un corpo nero che viene riscaldato ad una certa temperatura ed emette della luce.

In genere si parla quindi di luce *calda* quando essa vira verso il giallo e si avranno temperature di colore basse oppure di luce *fredda* quando essa vira verso il blu e la temperatura di colore sarà invece più alta.

Generalmente per la temperatura di colore è rappresentata su una scala che va da 1000K a 10000K.

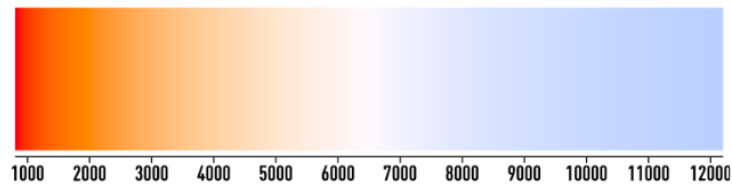


Figura 4.58: Scala delle temperature di colore.

Tecnicamente la CCT è rappresentata in modo più accurato nel *diagramma di cromaticità* espresso dallo standard *CIE 1931* su cui non ci dilungheremo.

Su tale diagramma i colori sono espressi su 2 dimensioni ed avranno come coordinate (x,y) , come si vede nell'immagine illustrata:

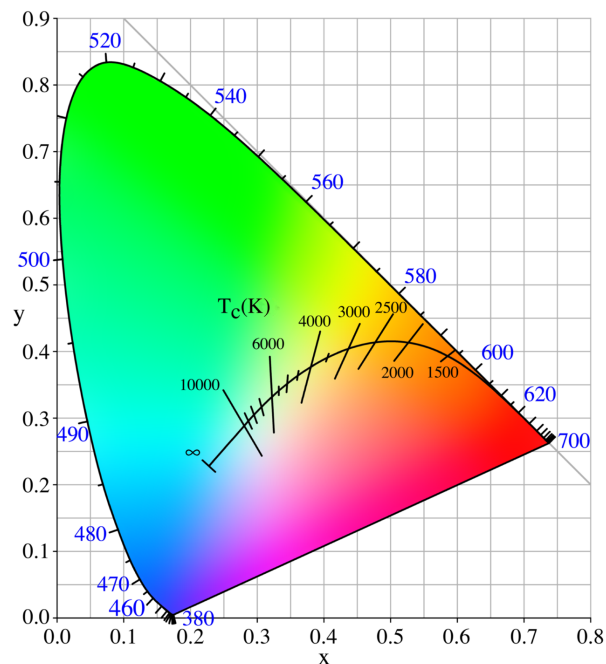


Figura 4.59: Diagramma di cromaticità e luogo di Planck.

In figura è anche riportato ed evidenziato il *luogo di Planck* sul quale, o nel cui intorno, deve trovarsi la sorgente affinché abbia una sua CCT. Nel caso in cui una sorgente sia più distante da tale regione non avrebbe più senso alcuno parlare della CCT.

Il calcolo dell CCT viene svolto a partire dalle coordinate (x,y) usando l'approssimazione di *McCamy*:

$$CCT_{(1)} = 437 \cdot n^3 + 3601 \cdot n^2 + 6861 \cdot n + 5517 \quad (4.4)$$

$$CCT_{(2)} = 449 \cdot n^3 + 3525 \cdot n^2 + 6823.3 \cdot n + 5520.3 \quad (4.5)$$

in cui il parametro n si calcola con l'espressione:

$$n = \frac{x - 0.03320}{0.1858 - y} \quad (4.6)$$

Ovviamente non si avranno dal sensore i valori delle coordinate (x,y) ma i valori della tripletta $[R \ G \ B]$ che dovranno essere convertiti nei rispettivi (x,y) .

Per fare ciò bisogna quindi migrare dallo spazio di colore RGB a quello XYZ, che permette di essere svincolati dal device in uso, mediante la formula:

$$\begin{bmatrix} X & Y & Z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} R & G & B \end{bmatrix} \cdot M \quad (4.7)$$

con M che è la matrice di *correlazione* di dimensioni 3x3 con tali coefficienti:

$$M = \begin{bmatrix} 0.20557 & 0.4167 & -0.14382 \\ -0.02875 & 0.506372 & -0.12061 \\ -0.55263 & 0.335866 & 0.494781 \end{bmatrix} \quad (4.8)$$

appositamente calcolata da *STMicroelectronics* per il *Rainbow* impiegando multiple sorgenti apposite [14] che terrà conto delle interazioni tra le code dei filtri dei canali ottici. Dopo essere passati nel nuovo spazio colore si procede al calcolo delle coordinate in 2D, ottenendo:

$$x = \frac{X}{X + Y + Z} \quad y = \frac{Y}{X + Y + Z} \quad (4.9)$$

Nella pagina successiva è illustrato brevemente lo schema a blocchi del calcolo completo del valore della CCT a partire dai valori ottenuti dal *Rainbow*.

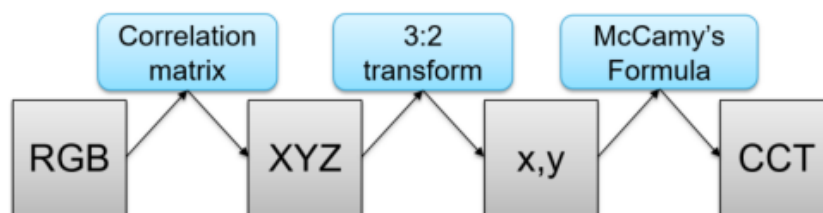


Figura 4.60: Schema a blocchi del calcolo della CCT.

Andando a ripetere l'esperimento applicando tale metodologia di analisi ai dati ottenuti già in un singolo ciclo termico dello strumento è stato ottenuto il seguente risultato:

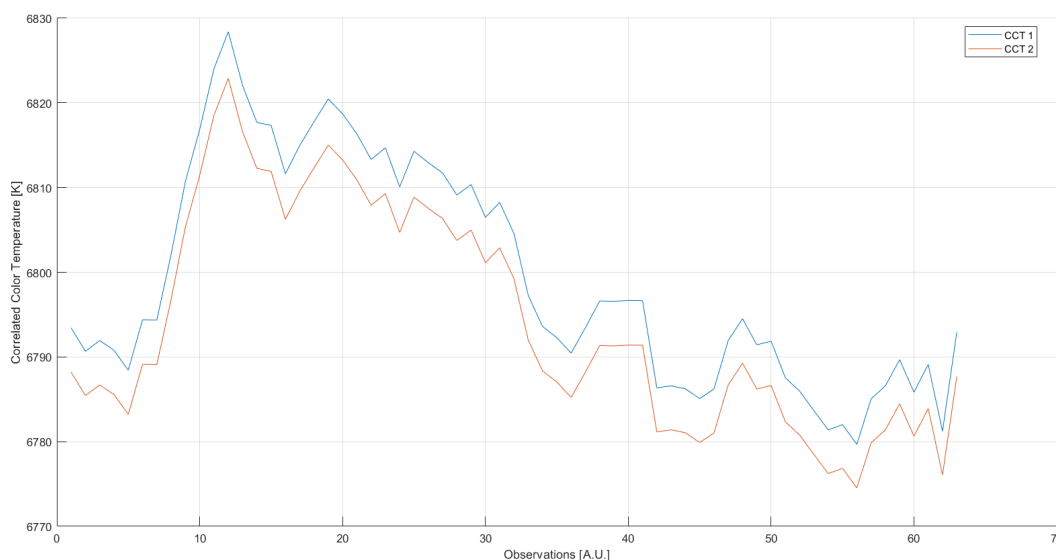


Figura 4.61: CCT calcolata per il LED ambra.

Il risultato mostra chiaramente che c'è stata una riduzione della CCT, che significa a sua volta uno shift del colore emesso dal LED ossia della sua lunghezza d'onda di picco, verso il rosso causato da un aumento della temperatura e ciò è in perfetto accordo con quanto inizialmente ipotizzato.

Quello che si cercherà di fare ora è andare a legare il ΔCCT misurato al relativo $\Delta \lambda$ dello spettro del LED che lo ha provocato.

A tal proposito quindi si andrà a ripetere lo stesso esperimento, ossia andare a monitorare il Q3-Plus mentre porta avanti una reazione di qPCR mediante il protocollo 4 λ ma stavolta sarà impiegato lo spettrometro, essendo capace di fornire anche la lunghezza d'onda della luce osservata.

Il setup di misura rimane pressoché lo stesso, ma questa volta una cartuccia modificata

con delle fibre ottiche per permettere allo spettrometro di acquisire quanto accade all'interno del Q3-Plus, come visibile nell'immagine seguente:

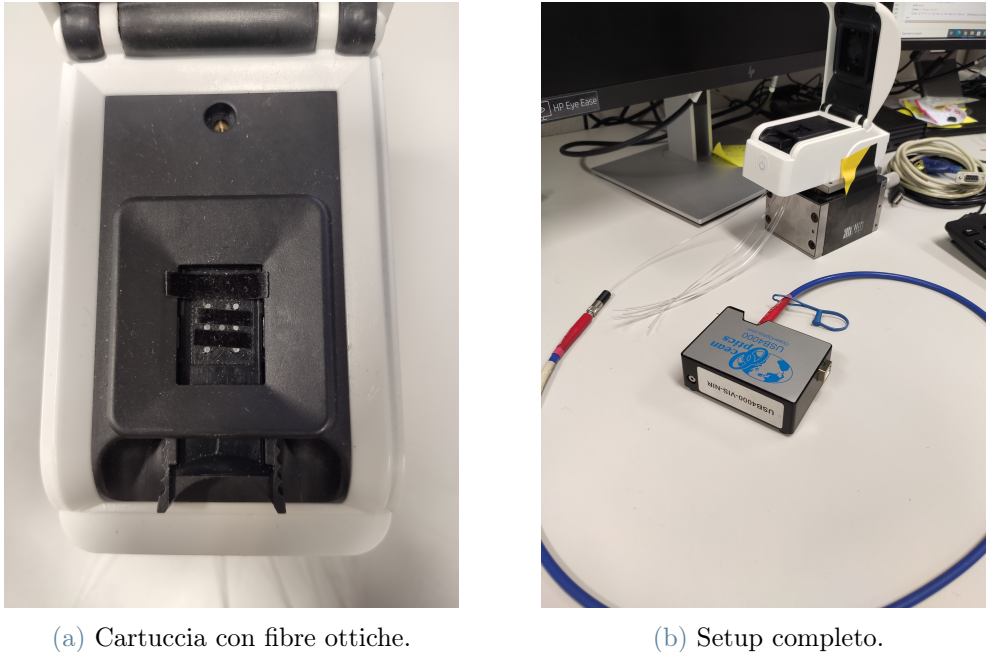


Figura 4.62: Setup di misura con lo spettrometro e le fibre ottiche all'interno del Q3-Plus.

L'esperimento è stato condotto nelle stesse condizioni, con il Q3-Plus che esegue il protocollo termico 4λ e lo spettrometro che acquisisce di volta in volta il segnale di eccitazione proveniente dal LED, usando dei tempi di esposizioni in accordo con la potenza ottica emessa dal LED.

Inoltre durante ogni acquisizione del singolo canale si possono ottenere più di un singolo spettro misurato e ciò è anche d'aiuto grazie al filtraggio del rumore dello spettrometro stesso ottenuto mediando tutti gli spettri che si riescono ad acquisire durante tale intervallo di tempo, come spiegato attraverso l'equazione 4.3.

Quanto descritto è riassunto in tabella:

Q3-Plus Channel	$T_{exposure,spect}$	# di spettri per ciclo
1	55ms	$500ms/55ms = 9$
2	35ms	$1000ms/35ms = 28$
3	40ms	$500ms/40ms = 12$
4	28ms	$500ms/28ms = 17$

Tabella 4.13: Valori dei tempi di esposizione e numero spettri acquisiti per ogni canale.

Dopo avere acquisito a livello ottico tutta la reazione attraverso lo spettrometro, si procede con il calcolo della media di tutti i gruppi di spettri acquisiti per ogni ciclo in ogni canale per ottenere degli spettri medi non rumorosi, filtrati, che sono riportati in figura:

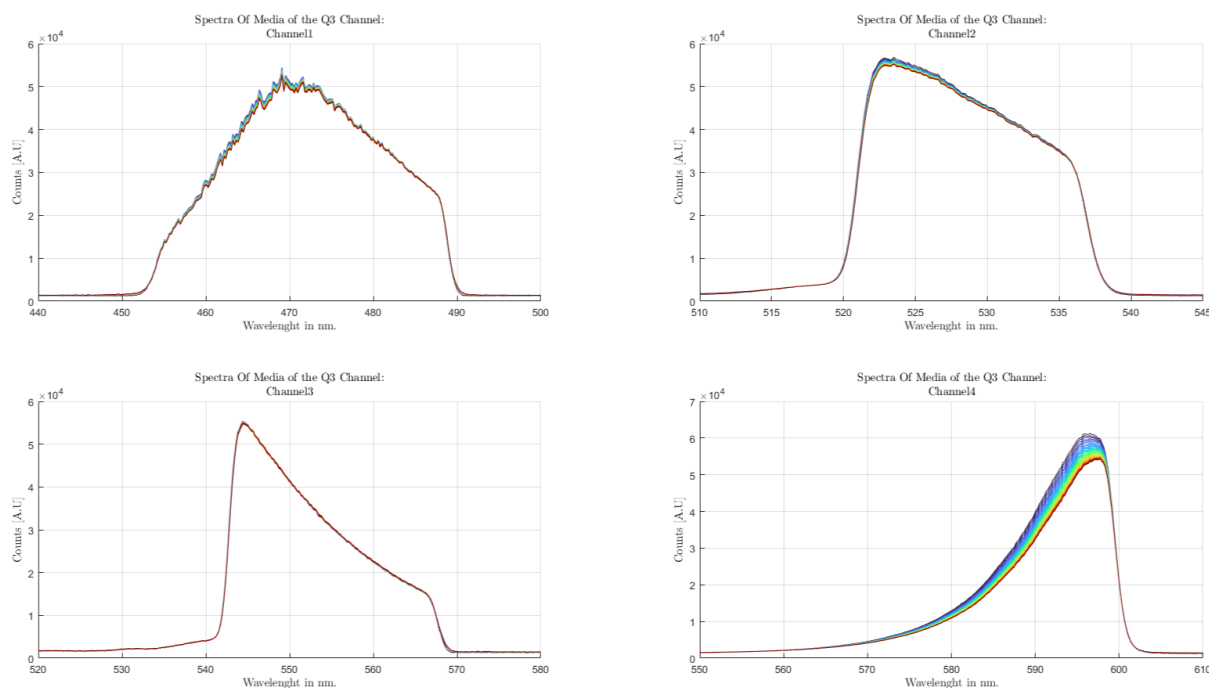


Figura 4.63: Spettri dei LED acquisiti con lo spettrometro.

Guardando attentamente il grafico si possono anche notare quelli che sono i fronti di salita e di discesa, cioè i tagli, dei filtri ottici che si usano per l'eccitazione dei fluorofori, con il relativo picco.

Tuttavia è anche possibile notare un leggero calo nelle ampiezze degli spettri man mano che la reazione procede (colore degli spettri dal blu verso il rosso) e tale effetto si nota maggiormente nel canale 4 che viene eccitato dal LED ambra.

Quindi il risultato questa volta è in accordo con quanto ipotizzato, ma per avere una conferma più marcata sono stati anche calcolati 3 valori:

- il valore massimo medio, cioè il picco medio di ogni gruppo di spettri,
- il valore medio dell'area di ogni gruppo di spettri,
- andamento del picco massimo degli spettri in lunghezza d'onda.

Teoricamente questi ulteriori parametri avrebbero dovuto avere un comportamento analogo a quello degli spettri e subire quindi una continua riduzione in concomitanza all'avanzamento della reazione e quindi all'aumento del numero di cicli termici. L'andamento ottenuto di tali parametri è riportato nelle 2 figure a seguire.

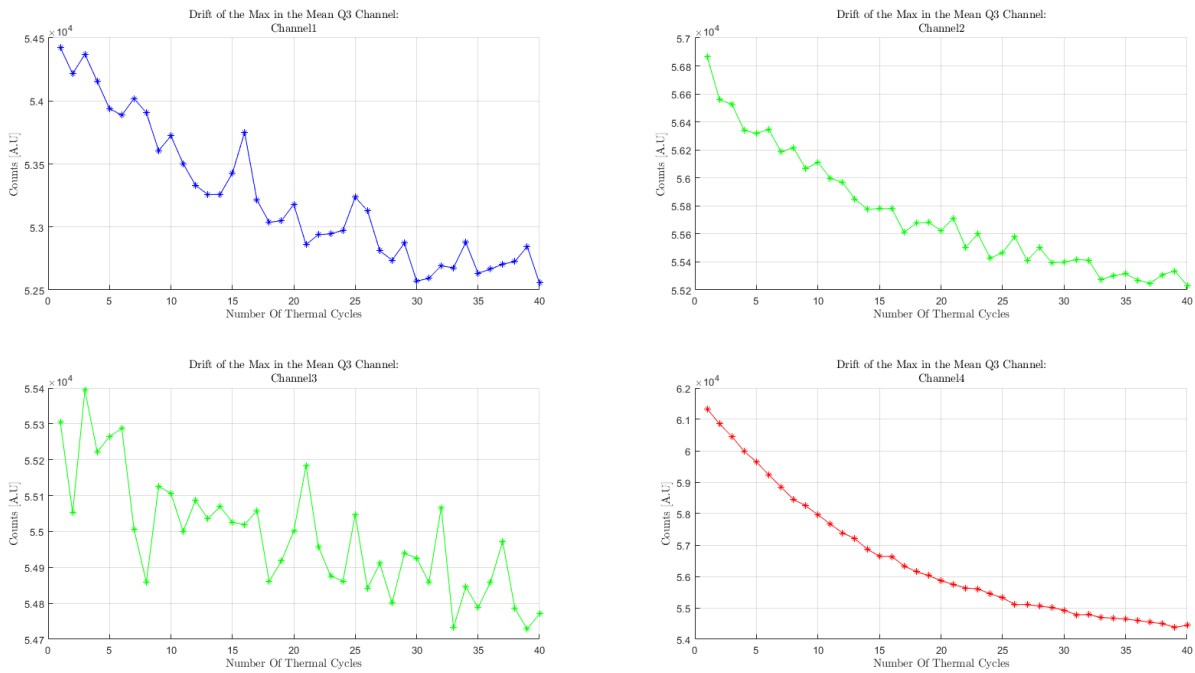


Figura 4.64: Andamento del picco degli spettri nei 4 canali.

Per quanto riguarda l'andamento del picco si ottiene, come visibile nell'immagine superiore, ancora una volta una riduzione con il progredire della reazione dovuto anche ad un probabile aumento in temperatura della testa ottica, sempre in linea con quanto ipotizzato.

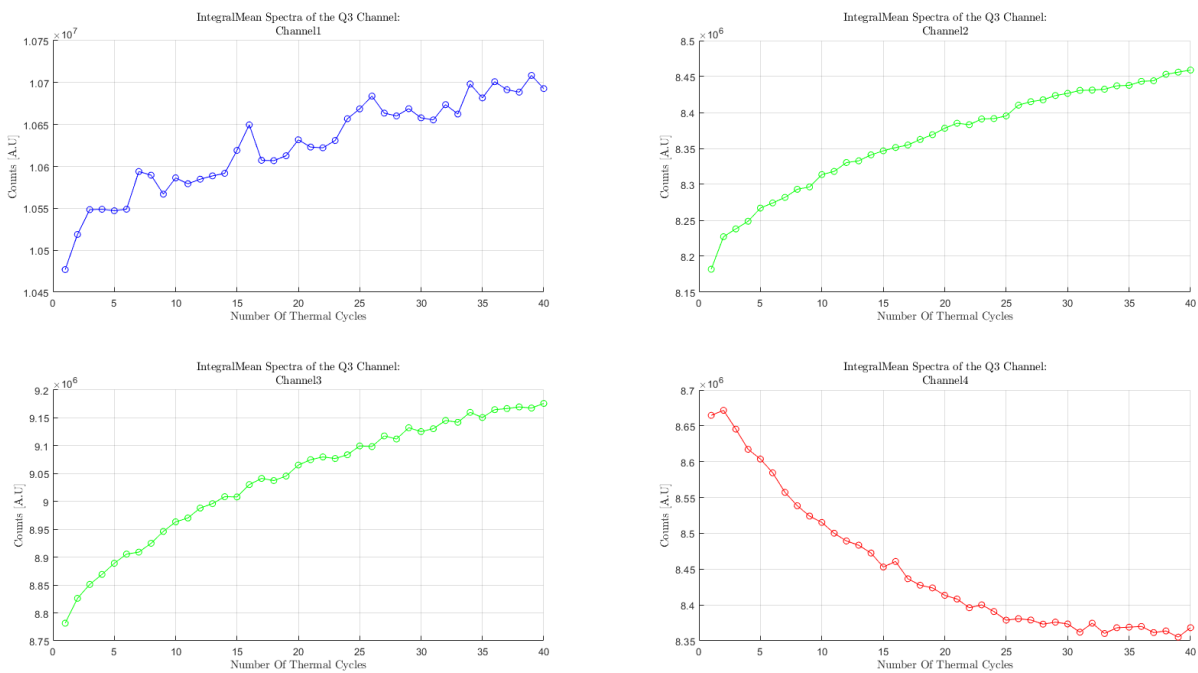


Figura 4.65: Andamento delle aree degli spettri nei 4 canali.

Tuttavia il grafico delle aree mostra un risultato che in prima linea sembra del tutto incongruente con gli altri, infatti le aree degli spettri nei primi 3 canali del Q3-Plus stanno aumentando, trend del tutto opposto con quello che era atteso.

Nel canale 4 invece si nota l'andamento in riduzione.

Andando a misurare infine l'eventuale shift in lunghezza d'onda del picco degli spettri dei LED si è ottenuto:

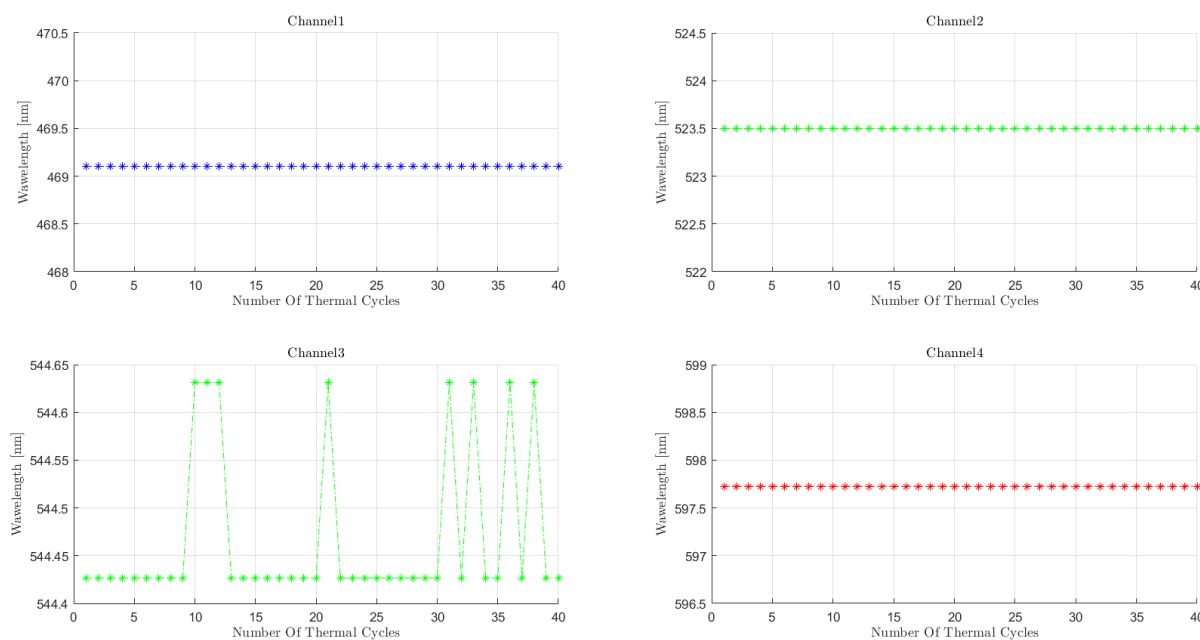


Figura 4.66: Lunghezze d'onda del picco degli spettri nei 4 canali.

Non si nota nessuno shift in lunghezza d'onda nei 4 canali ottici dello strumento.

Ovviamente bisognava capire il perché di tali comportamenti non congrui tra loro.

In primo luogo è stato ipotizzato che tale incongruenza potesse essere causata dall'azione dei filtri ottici di emissione, unitamente ad un leggero shift in lunghezza d'onda degli spettri che avrebbe comportato una maggiore integrazione del rumore e non del segnale con conseguente aumento apparente delle aree nei primi 3 canali.

Ma andando ad osservare l'ultimo risultato ottenuto in termini di un eventuale shift in lunghezza d'onda dei picchi degli spettri si nota invece che nei canali 1, 3 e 4 c'è molta stabilità, mentre vi sono delle leggere oscillazioni nel canale 2.

Il passo successivo è stato ripetere lo stesso esperimento ma senza impiegare i filtri ottici di eccitazione del Q3-Plus per capire se effettivamente ciò andasse a comportare delle differenze nei risultati.

Una volta tolti i filtri ottici di eccitazione l'aspetto della testa ottica è:

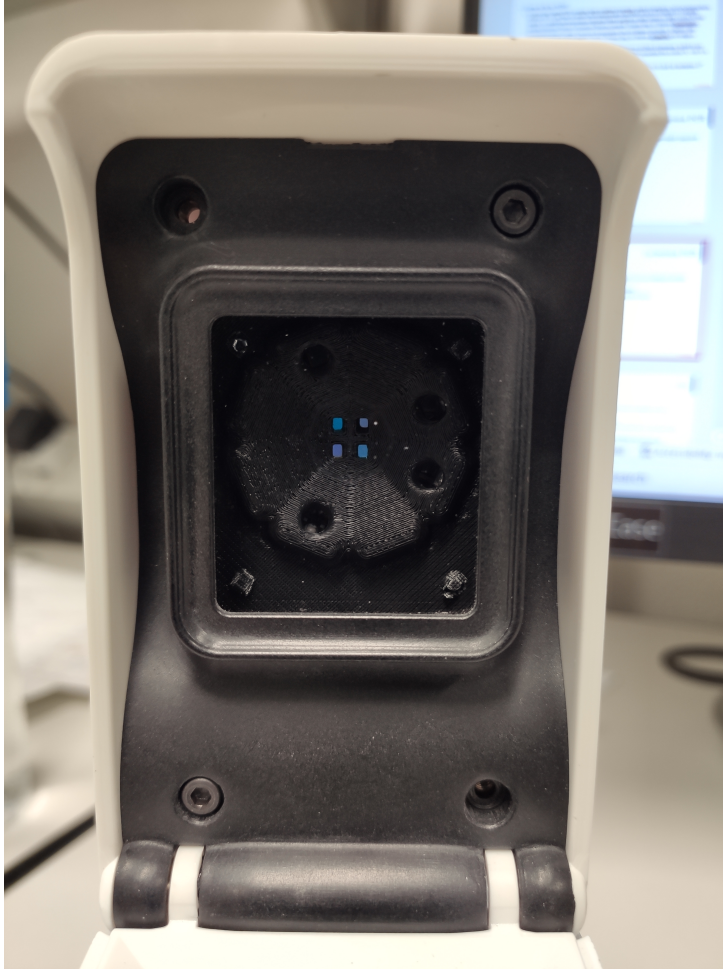


Figura 4.67: Testa ottica del Q3-Plus priva dei filtri ottici di eccitazione.

In questa nuova condizione operativa dello strumento è stato deciso di adoperare per primo lo spettrometro, per avere subito a disposizione gli stessi risultati visti in precedenza e capire cosa comportava l'uso o meno dei filtri, per passare poi nuovamente al *Rainbow*. Lavorando per la seconda volta con lo spettrometro saranno riportati i risultati ottenuti in termini di:

- spettri mediati per ogni ciclo in ogni canale,
- andamento del picco medio per ogni gruppo mediato di spettri acquisiti,
- andamento dell'area media di ogni gruppo mediato di spettri acquisiti,
- andamento della lunghezza d'onda del picco per ogni gruppo di spettri mediati.

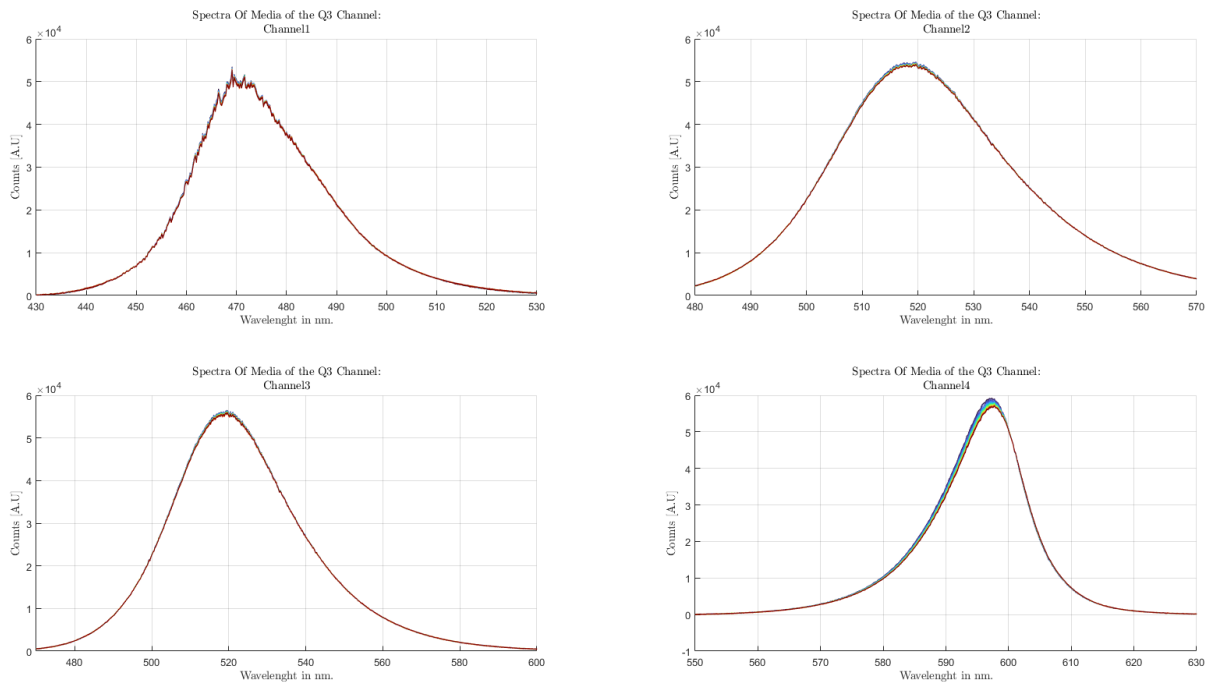


Figura 4.68: Andamento degli spettri medi senza i filtri ottici di eccitazione.

Nel grafico soprastante degli spettri medi l'andamento è molto simile, si può notare adesso l'interezza di tutta la campana dello spettro emesso dal LED senza l'azione del filtro, inoltre sembra ci sia un leggero miglioramento nella dispersione del LED ambr.

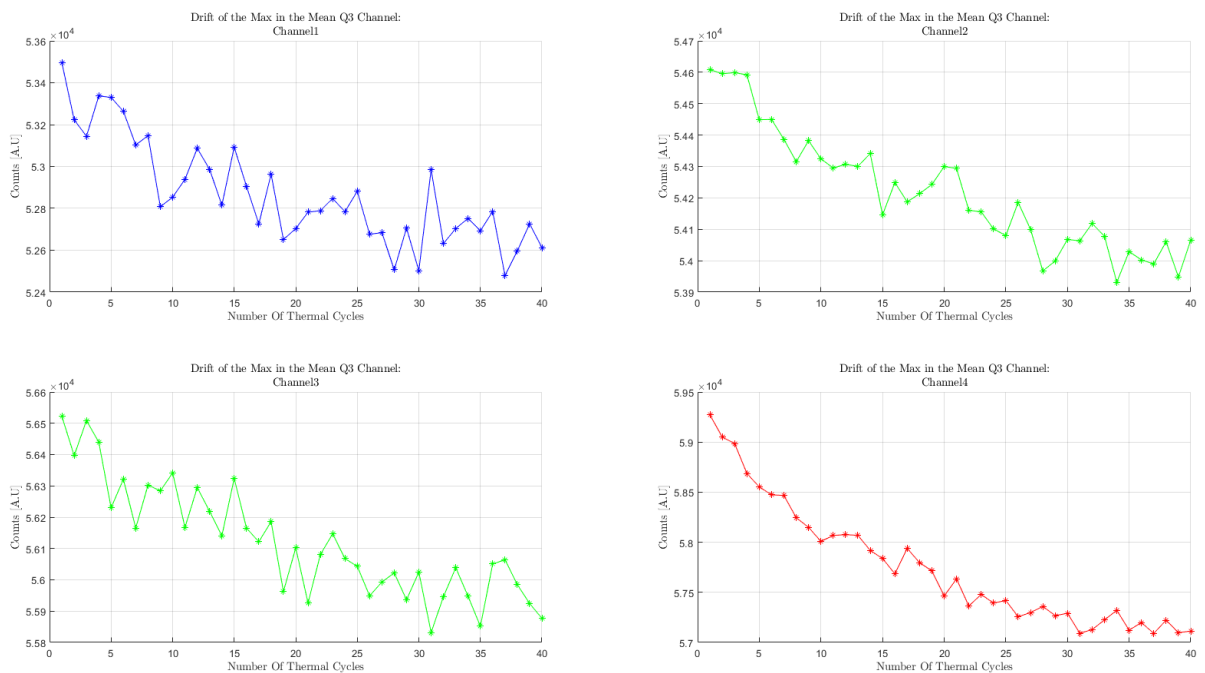


Figura 4.69: Andamento dei picchi degli spettri senza i filtri ottici di eccitazione.

Nel grafico dell'andamento del picco dello spettro medio ottenuto non si notano differenze, l'andamento è decrescente nel tempo in accordo con quanto ipotizzato e ricavato.

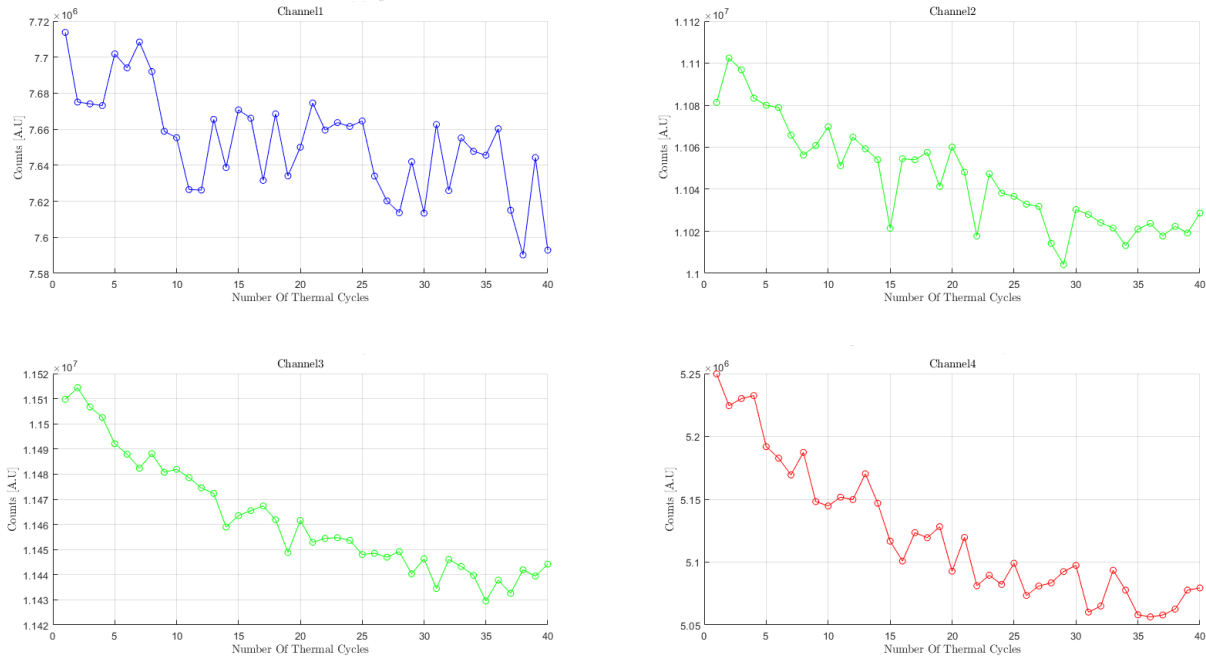


Figura 4.70: Andamento delle aree degli spettri senza i filtri ottici di eccitazione.

Il grafico invece nel quale si mostra lo shift del picco in lunghezza d'onda è:

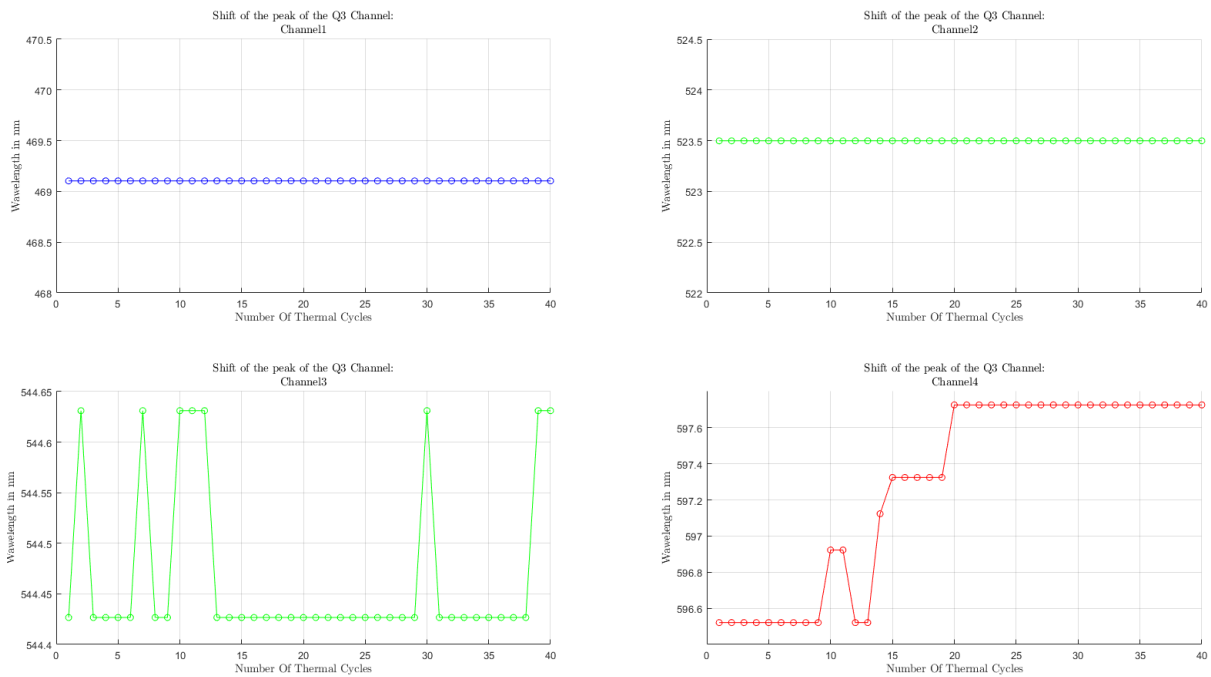


Figura 4.71: Shift del picco degli spettri senza i filtri ottici di eccitazione.

Lo shift del picco è del tutto assente sia nel primo canale che nel secondo, ciò significa che in condizioni operative il LED blu del canale 1 ed il LED verde del canale 2 sono molto stabili. Nel canale 3 si nota molta stabilità per il LED, sempre verde ed uguale a quello del canale 2, gli scostamenti sono dell'ordine del decimo di [nm] e possono essere degli errori numerici. Nel canale 4 si nota invece che il LED si è proprio spostato a destra di $\Delta\lambda = 1nm$.

A questo punto si trattava soltanto di ripetere lo stesso esperimento, nelle stesse condizioni e acquisire di nuovo i dati con il *Rainbow* in modo da ricavare eventuali cali anche con esso.

Questa volta sono stati riportati sui grafici tutti i dati provenienti dai 6 canali del sensore:

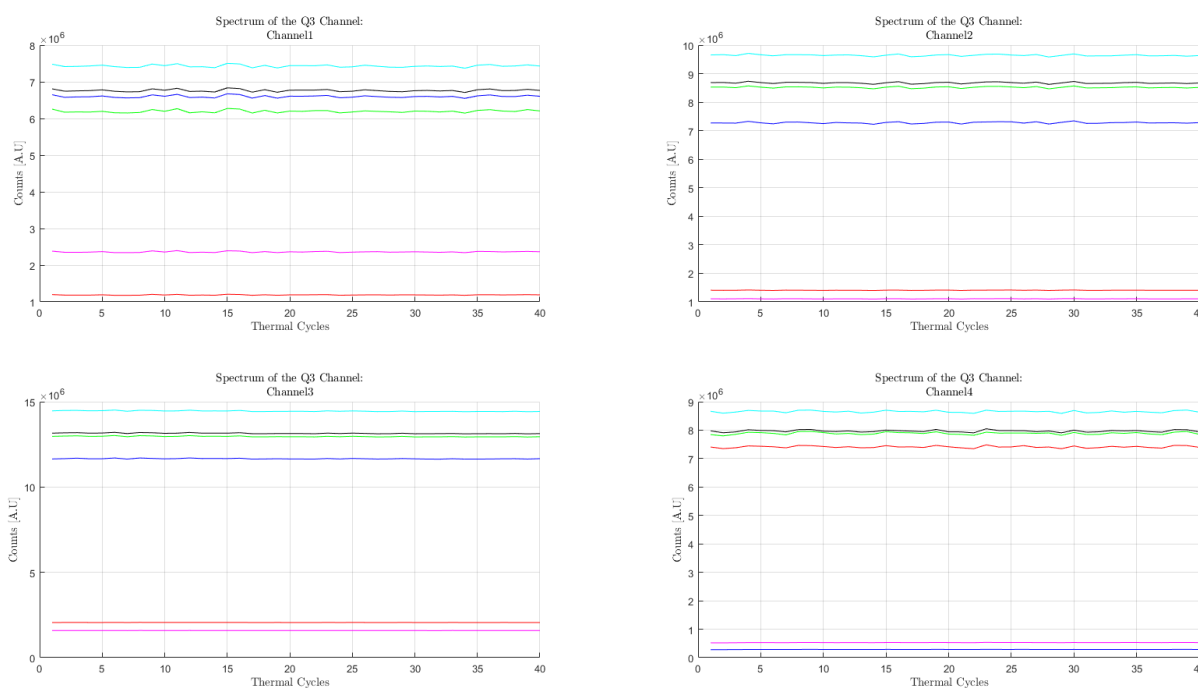


Figura 4.72: Reazione qPCR monitorata con il sensore.

Come si vede nel risultato riportato, i canali del sensore hanno tutti lo stesso andamento, quasi costante nel tempo. Ciò significa che anche in questo caso, come visto in precedenza, il *Rainbow* non è riuscito a cogliere nessuna variazione significativa nei LED della testa ottica dello strumento in fase di eccitazione, nonostante attraverso l'utilizzo dello spettrometro si era ottenuta una conferma di tutto ciò che era stato ipotizzato.

5 | Il Rainbow come misuratore di pH

Come era stato accennato in precedenza nella sezione 3.9 un altro possibile uso del sensore *Rainbow*, essendo in realtà un sensore di tipo spettrometrico, potrebbe essere un misuratore del valore di pH [6].

L'idea è molto semplice e consiste nell'illuminare delle striscette di cartina tornasole, colorante di origine vegetale in grado di cambiare il proprio colore in base al pH cui viene esposto, con un LED bianco per poi misurare la luce riflessa con il sensore e dare una stima del valore del pH misurato dalla cartina.

5.1. Il pH: definizione e applicazione

Prima di procedere è giusto fornire una breve definizione del pH. In chimica ed anche in biologia ai giorni d'oggi, si lavora sempre con delle *soluzioni*. Ad esempio, le mix che citavamo prima mentre si parlava della PCR nella sezione 1.3 possono essere viste come delle soluzioni.

Brevemente, le soluzioni, per definizione, sono dei miscugli omogenei i cui componenti sono fisicamente non più distinguibili ma mantengono però invariate le loro proprietà. Quindi una soluzione è la dispersione omogenea, in diversi rapporti, di 2 diverse specie chimiche che saranno non più distinguibili a livello visivo.

Le componenti principali di una soluzione sono:

- il *solvente*, che è la componente presente in maggiore quantità,
- il *soluto*, che è la componente presente invece in minore quantità che sarà dissolto nel solvente.

In genere in natura si hanno composti che si possono trovare allo stato solido, liquido e gassoso, quindi le soluzioni potrebbero essere a loro volta di tipo solido, liquido o gassoso. In generale il pH si potrebbe misurare in modo più agevole usando le cartine tornasole nelle soluzioni liquide, in cui cioè il solvente è un liquido ed il soluto potrebbe essere allo

stato solido, liquido oppure gassoso. Di solito nelle soluzioni di cui si vuole misurare il pH si hanno come solvente l'acqua e come soluto un acido oppure una base.

Nella soluzione non appena i 2 composti, solvente e soluto, verranno a contatto si innesca una reazione chimica, che partendo da tali *reagenti* darà un successivo *composto*.

Durante la reazione chimica si possono liberare degli ioni H^+ oppure OH^- la cui concentrazione in soluzione darà origine a quelli che sono rispettivamente il *pH* ed il *pOH*.

Matematicamente tali concentrazioni saranno calcolate in [M], cioè concentrazioni molari, mentre il pH ed il pOH saranno calcolati in modo logaritmico:

$$pH = -\log_{10}[H^+] \quad (5.1)$$

$$pOH = -\log_{10}[OH^-] \quad (5.2)$$

Considerando l'acqua in condizioni standard (STP), cioè pressione e temperatura ambiente, si hanno le seguenti concentrazioni di ioni: $[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}[M]$. Con delle ovvie considerazioni matematiche si ricava anche questa importante proprietà:

$$pH + pOH = 14 \quad (5.3)$$

che esprime il cosiddetto **prodotto ionico** dell'acqua.

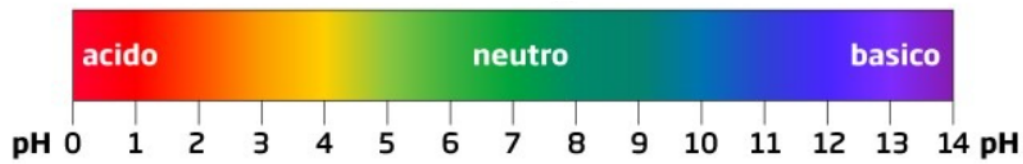
Quindi partendo ad esempio dall'acqua come solvente, con relativo pH = 7, nel momento in cui si va ad aggiungere in soluzione ad essa un acido oppure una base le relative concentrazioni di ioni varieranno e ciò farà variare di conseguenza sia il pH che il pOH.

Riassumendo il tutto in una tabella si avrà:

Tipo di soluzione	Valore pH	Valore pOH
Acida	pH < 7	pOH > 7
Neutra	pH = 7	pOH = 7
Basica/Alcalina	pH > 7	pOH < 7

Tabella 5.1: Tipi di soluzioni e relativi valori di pH e pOH.

Il pH avrà quindi come valori ammessi un minimo pari a 0 ed un massimo pari a 14, che possiamo vedere a livello cromatico sia su una scala di riferimento che su un rotolo di cartina tornasole disponibile in commercio, nelle immagini visibili nella pagina seguente.



(a) Scala colorimetrica del pH.



(b) Rotolo di cartina per misura pH.

Figura 5.1: Rappresentazione cromatica della scala del pH.

I colori nella scala vanno dal rosso per i valori bassi del pH (acido), al verde per i valori medi del pH (neutro) fino al viola per i valori più alti del pH (basico).

5.2. Le acquisizioni del pH

Tornando adesso all'idea iniziale, cioè quella di 'leggere' delle strisce di cartina tornasole con il sensore, quello che è stato svolto in prima battuta in laboratorio è stato acquisire i colori dei vari pH della cartina tornasole. Il setup si componeva di:

- sensore *Rainbow*,
- LED bianco pilotato attraverso l'*Agilent E3631A*,
- supporto realizzato tramite CAD e stampato in 3D in cui poter inserire il dischetto, riportato nell'appendice A.

Per quanto riguarda le acquisizioni, sono state svolte illuminando tale dischetto attraverso il LED polarizzato con $I_{LED} = 50mA$ e ne sono state eseguite in totale 5. L'analisi dei dati ottenuti è stata così svolta: da ognuna delle acquisizioni sono stati isolati e raccolti i dati provenienti dai canali R , G , B per andarne poi a calcolare il valore RMS, la sua

norma e successivamente rappresentarlo graficamente.

In termini matematici ciò che è stato fatto è costruire il vettore e calcolare quindi la sua norma, ottenendo così un versore contenente le soli componenti cromatiche, $RG\vec{B}_{rms}$ andando in teoria a rimuovere qualsiasi informazione riguardante l'illuminazione.

L'operazione di normalizzazione svolta è la seguente:

$$RG\vec{B}_{rms} = \frac{[R_{rms} \quad G_{rms} \quad B_{rms}]}{\sqrt{R_{rms}^2 + G_{rms}^2 + B_{rms}^2}} \quad (5.4)$$

Il risultato che si ottiene è in figura:

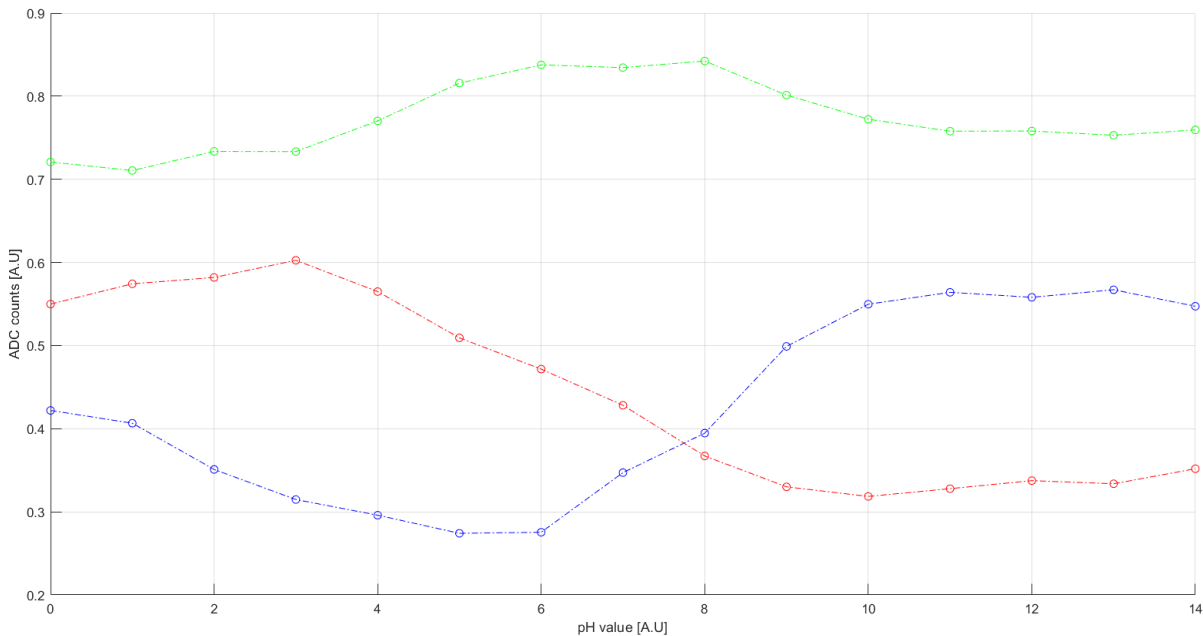


Figura 5.2: Andamenti dei 3 canali RGB acquisiti dal dischetto.

Da come si può notare non si è ottenuto un andamento di tipo monotono per i 3 canali, caratteristica che avrebbe di certo aiutato nell'algoritmo di riconoscimento del valore del pH in quanto avrebbe evitato delle possibili doppie soluzioni.

Tuttavia si nota un comportamento particolare nei canali R e B, che vanno ad intersecarsi nell'intorno del $\text{pH} = 8$ e che potrebbe già essere considerato come una prima soglia o un primo check nell'algoritmo di ricerca per escludere mezzo semipiano delle soluzioni.

Inoltre si nota che:

- nell'intervallo dei pH da 0 a 6 il canale verde sale mentre il canale blu tende a scendere,
- il canale rosso invece scende per valori del pH nell'intervallo da 3 a 10.

Il problema più stringente si trova invece nel semipiano destro, esattamente dopo l'incrocio dei 2 canali, in quanto da tale punto in avanti tutti e 3 i canali sono pressoché costanti, facendo fallire l'algoritmo di ricostruzione del pH. Si poteva pensare quindi di includere un'ulteriore informazione in più, per rendere più robusto l'algoritmo: tale informazione era la CCT che abbiamo appena visto nella sezione 4.5.

Calcolando anche in questo caso tale per ognuno dei valori di pH, a partire dalla relativa tripletta $\begin{bmatrix} R & G & B \end{bmatrix}$ si ottiene il grafico seguente:

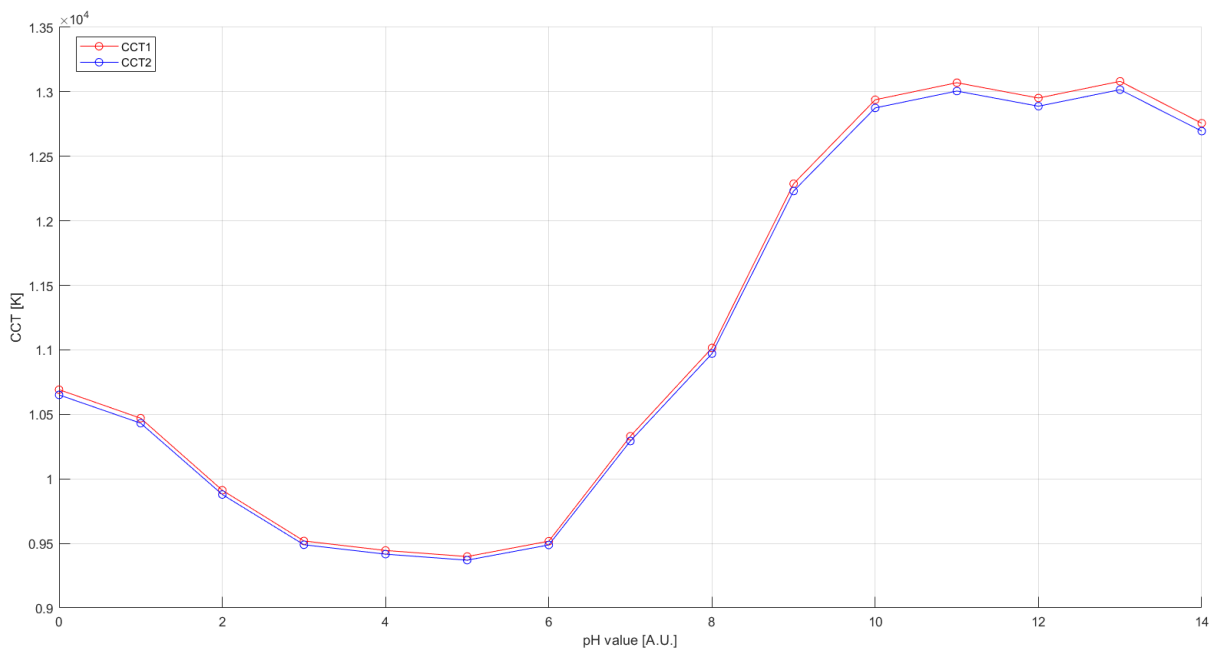


Figura 5.3: Andamenti delle 2 CCT dei pH acquisiti dal dischetto.

Anche qui si può notare un comportamento non monotono ed a tratti che tuttavia dà una conferma come visto poco fa nelle zone in cui sia la CCT stessa che i canali RGB sono localmente monotoni, mentre va a presentarsi sempre lo stesso problema dell'ambiguità della soluzione per valori di pH maggiori di 10, regione in cui anche la CCT rimane pressoché costante.

Anche in questo caso è stato tentato un nuovo tipo di approccio al problema: sempre attraverso il *Rainbow* sono state acquisite delle strisce di cartine tornasole imbevute in soluzione dopo avere effettuato i seguenti passaggi:

- calibrazione di un pH-metro analogico con elettrodo a vetro,
- titolazione di 3 soluzioni a pH noto.

In tal modo si è quindi cercato di creare una sorta di retta di calibrazione con i 3 punti ottenuti, sulla quale poi provare a cercare valori di pH nell'intorno di quelli noti. Il setup impiegato è uguale al precedente e si compone di:

- sensore *Rainbow*,
- LED bianco pilotato attraverso l'*Agilent E3631A*,
- supporto realizzato tramite CAD e stampato in 3D in cui inserire le cartine usate in precedenza.

Le 3 soluzioni impiegate avevano pH noto e pari a 4.1 per la più acida, 7 per la neutra e 9.2 per la basica.

Le rette di calibrazione sono state sempre ricavate partendo dai dati ottenuti dal sensore nei canali *Red*, *Green* e *Blu*, per poi elaborarli come visto poco prima nell'equazione 5.4. Il grafico ottenuto è il seguente:

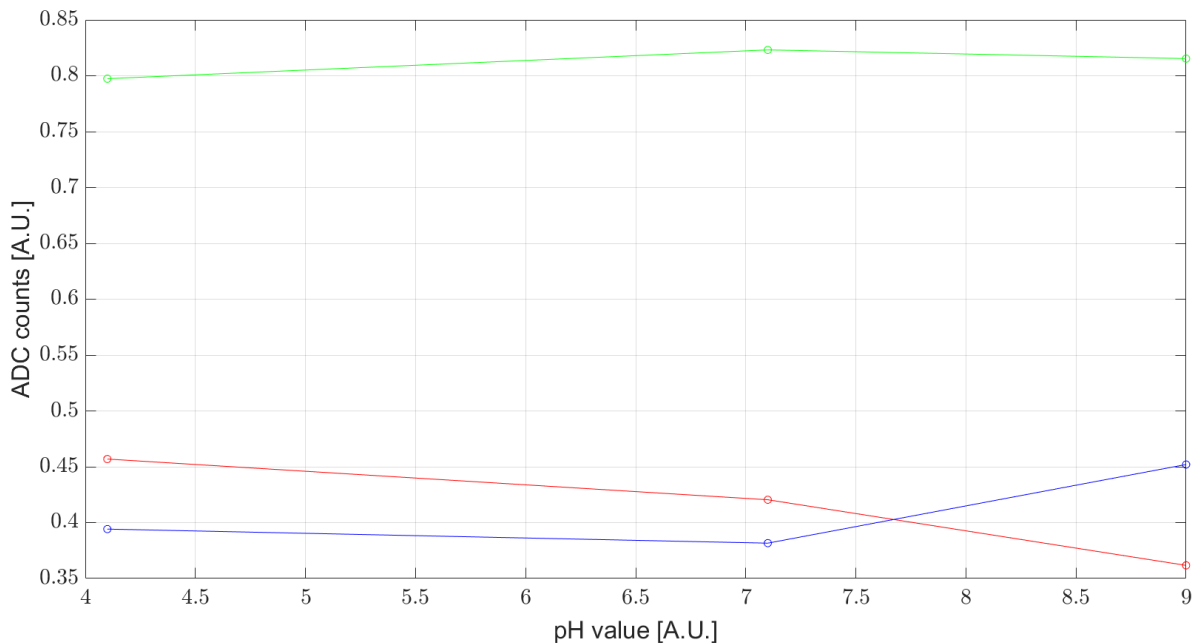


Figura 5.4: Risultato in RGB dei 3 pH acquisiti dalle cartine.

Anche in questo caso purtroppo non si riesce a sfruttare il grafico con le curve RGB per costruire un buon algoritmo di ricerca e ciò sempre a causa della non monotonia delle curve ottenute.

Quindi l'unica alternativa è sempre quella di passare dalle curve RGB alle curve della CCT dei dati acquisiti.

Il corrispondente grafico è riportato nella pagina successiva.

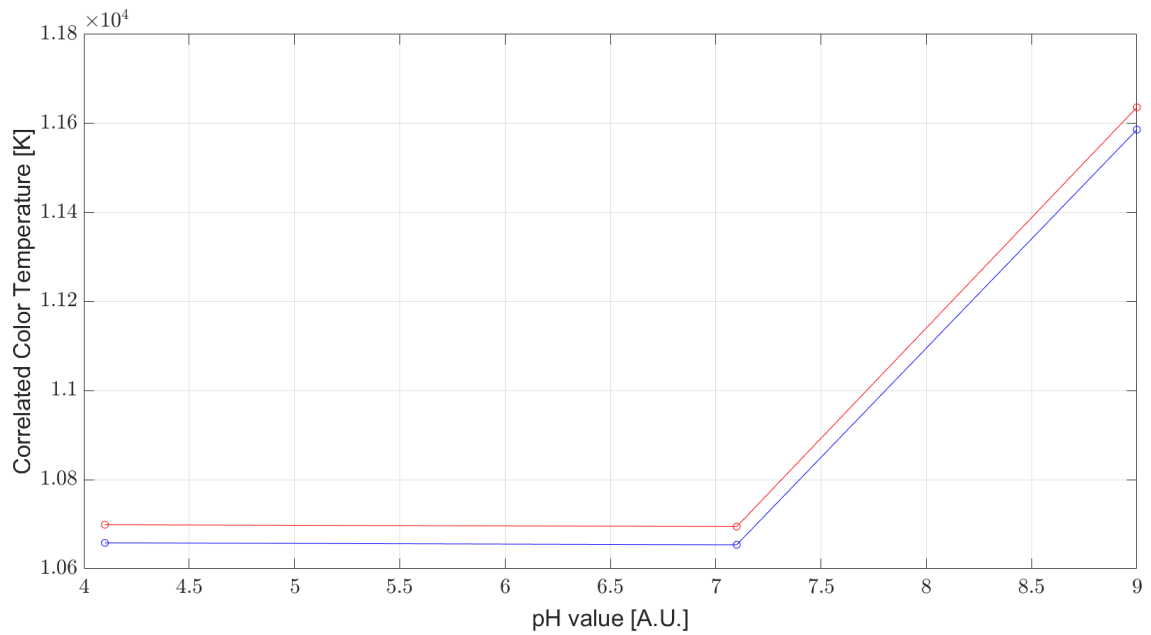


Figura 5.5: Risultato in CCT dei 3 pH acquisiti dalle cartine.

Anche con queste misure non si riesce ad ottenere un algoritmo in grado di discernere in modo univoco il valore del pH, infatti le curve di caratterizzazione hanno dei tratti per lo più piatti e non monotoni. Quanto svolto nell'ultima acquisizione però è stato ripetuto ma senza l'ausilio dell'illuminazione del LED. Ciò che si ottiene è:

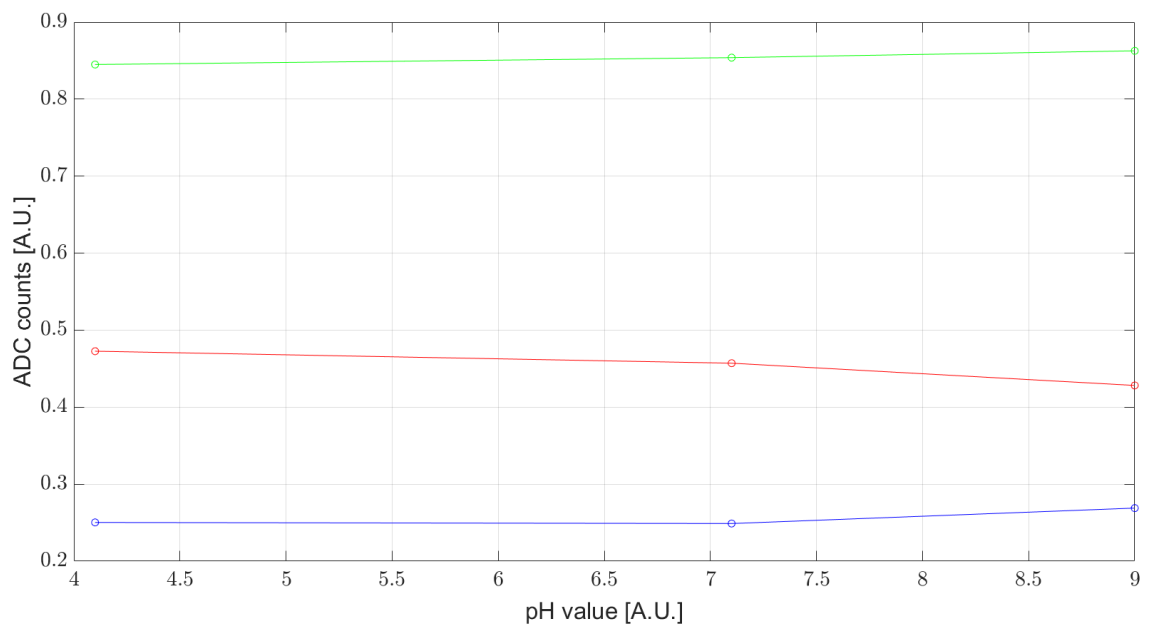


Figura 5.6: Risultato in RGB dei 3 pH acquisiti dalle cartine senza LED.

Guardando il risultato la situazione non sembra purtroppo trovare un miglioramento, mentre passando alla CCT si ottiene:

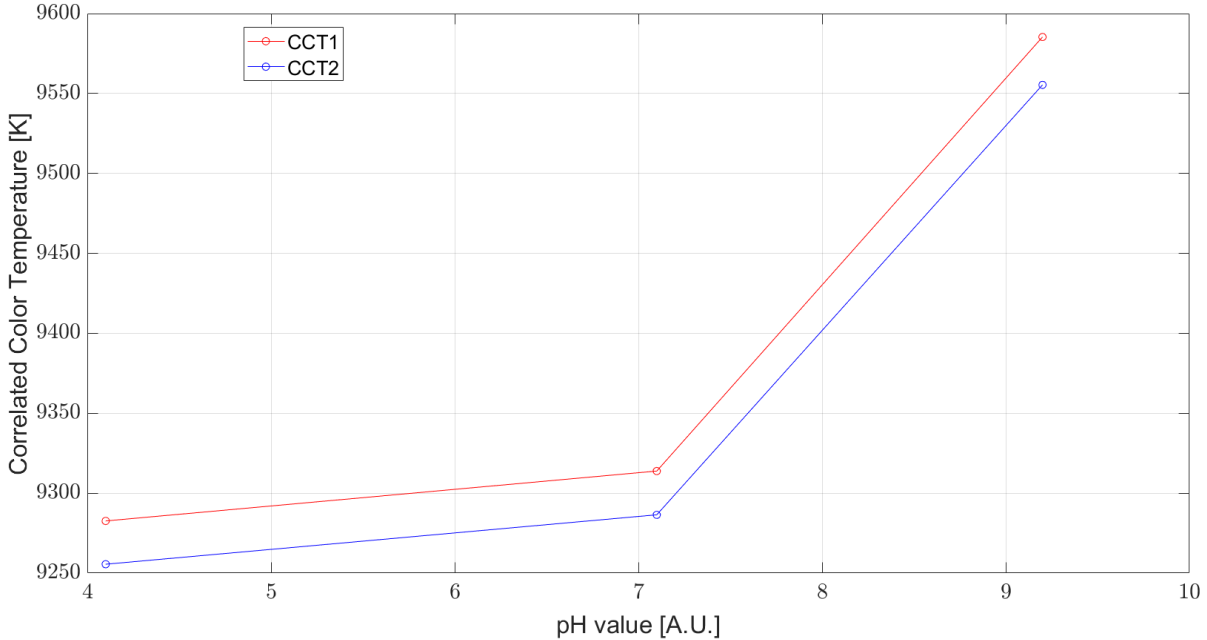


Figura 5.7: Risultato in CCT dei 3 pH acquisiti dalle cartine senza LED.

Con questa nuova versione del setup la situazione migliora, si nota come le rette di caratterizzazione questa volta abbiano un andamento monotono come ricercato. Come ulteriore conferma è stata svolta una nuova prova, che consisteva nell'acquisizione di 2 cartine intinte in 2 diverse soluzioni a pH incognito, ottenute tramite la diluizione delle soluzione a pH acido e basico con quella a pH neutro.

Dopo avere intinto le cartine nelle 2 soluzioni si è passati alla fase di acquisizione vera e propria attraverso il *Rainbow*. Il risultato atteso era misurare e ricavare quindi 2 valori del pH nei rispettivi semipiani, sinistro e destro, con $pH < 7$ e con $pH \geq 7$.

Guardando le 2 curve della CCT potremmo scriverne le equazioni:

$$\begin{cases} CCT1_{pH < 7} = 10.433 \cdot pH + 9239.96 [K] \\ CCT1_{pH \geq 7} = 129.3 \cdot pH + 8395.79 [K] \\ CCT2_{pH < 7} = 10.3033 \cdot pH + 9213.3 [K] \\ CCT2_{pH \geq 7} = 126.067 \cdot pH + 8377.18 [K] \end{cases} \quad (5.5)$$

Dopo avere acquisito i dati da entrambi i campioni ed averli elaborati sono state ricavate quindi le CCT di entrambe le soluzioni a pH incognito che sono state successivamente

riportate sulla rette di caratterizzazione per ricavare i corrispondenti valori del pH. Graficamente si ottiene:

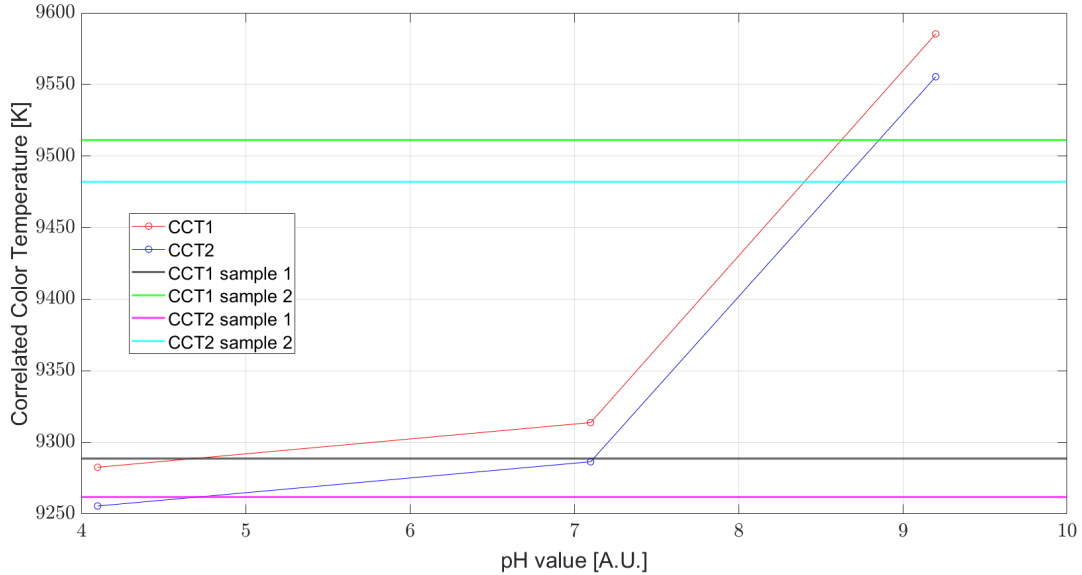


Figura 5.8: Incrocio del CCT dei 2 campioni sulle rette caratteristiche.

Stimando l'incrocio delle rette orizzontali dei campioni con le curve della CCT si ottengono come soluzione $pH_{sample,1} \approx 4.7$ e $pH_{sample,2} \approx 8.7$ come visibile sul grafico. Da ultimo passaggio invece è stata effettuata una misura ripetuta del pH delle 2 soluzioni diluite con un pHmetro ad elettrodo a vetro; la fine di ottenerne un valore medio e una deviazione standard per i valori del pH dei 2 campioni e per confrontare il risultato qui ottenuto con quello ottenuto tramite il *Rainbow*.

Le misure ottenute sono:

$$pH_{sample1} = [4.74 \quad 4.69 \quad 4.71 \quad 4.70 \quad 4.71] \quad (5.6)$$

$$pH_{sample2} = [9.01 \quad 9.02 \quad 9.06 \quad 9.01 \quad 8.89] \quad (5.7)$$

mentre in tabella sono riportate le analisi sui dati:

Soluzione	Valore \overline{pH}	σ_{pH}
Acida, campione 1	$\overline{pH_{campione1}} = 4.7$	$\sigma_{pH} = 0.0187$
Basica, campione 2	$\overline{pH_{campione2}} = 9$	$\sigma_{pH} = 0.0596$

Tabella 5.2: Misure effettuate sui 2 campioni a pH incognito.

Confrontando i valori stimati del pH dal sensore, con i valori medi ottenuti dal pHmetro si ottiene una buona precisione nel caso del campione a pH acido, mentre si ricava un leggero scarto nel caso del pH basico, con un errore massimo di misura pari a $\Delta pH_{max} \approx 0.3$.

6 | Conclusioni e sviluppi futuri

Lo scopo di questo lavoro è la caratterizzazione di un nuovo sensore spettrometrico ibrido al fine di utilizzarlo in applicazioni di biologia molecolare.

Si è partiti dalla definizione di un protocollo di comunicazione con il sensore per poi passare alla definizione dei comandi operativi ed alla sua successiva caratterizzazione e impiego reale.

La caratterizzazione ha avuto esiti e risvolti molto positivi, infatti sono state confermate tutte le caratteristiche e le potenzialità dichiarate, spaziando dai valori di saturazione forniti in uscita, passando allo studio dei guadagni analogici ed infine alle caratteristiche di rumore di buio, sia statico che in funzione della temperatura, di cui non si avevano molte informazioni a riguardo sul datasheet.

Dagli ottimi risultati ottenuti dalla caratterizzazione ha preso realmente forma l'idea dell'impiego del sensore in campo reale, in uno strumento reale che è il Q3-Plus; per poterne correggere alcune limitazioni. Le prime prove svolte in questo contesto, con il *Rainbow* come sensore per il monitoraggio del funzionamento dello strumento, hanno condotto a duplici risultati:

- lavorando con il metodo classico dell'analisi dei dati provenienti dai canali RGB nel lungo periodo e cioè durante la fase di caratterizzazione dei LED dello strumento Q3-Plus, il sensore si è mostrato davvero molto sensibile, preciso e con un'ottima risoluzione,
- lavorando invece internamente allo strumento purtroppo tutte le ottime qualità mostrate in precedenza sembravano non fornire i risultati previsti.

Tuttavia il lavoro svolto in parallelo con lo spettrometro confermava il fatto che nel lavoro su lungo periodo il sensore era estremamente preciso e sensibile, mentre nel breve era totalmente trasparente a quanto si cercava di studiare e non fornendo quindi alcun riscontro utile delle variabili del sistema Q3-Plus che si cercava di monitorare.

Dopodiché si è passati ad un'ulteriore tipologia di analisi dei dati ottenuti, lavorando con il metodo della temperatura di colore (CCT), che sembrava dare risultati dove con il metodo classico non si ottenevano, anche durante il monitoraggio dello strumento.

In questo stesso modo sono state poi condotte delle prove per l'utilizzo del sensore come rilevatore di colore per il caso del pH ed anche in questo caso si ottengono dal sensore informazioni più significative lavorando in CCT piuttosto che in RGB.

Uno sviluppo futuro prevede di monitorare l'andamento della temperatura della testa ottica dello strumento Q3-Plus durante lo svolgimento dei suoi protocolli termici, al fine di chiarire il contributo del dissipatore termico presente alla dissipazione del calore prodotto dai LED ed al loro raffreddamento.

Un altro possibile scenario di sviluppo futuro prevede anche la caratterizzazione non più a livello hardware dello strumento Q3-Plus, ma più dal punto di vista biologico/molecolare per stimare anche un'eventuale riduzione nell'efficienza di emissione da parte dei fluorofori impiegati, al fine di legarla con la riduzione dell'efficienza in emissione dei LED e capire quanto questo vada ad impattare sui risultati ottenuti.

Un possibile utilizzo futuro prevede il perfezionamento dell'utilizzo del *Rainbow* come colorimetro ma anche come possibile rilevatore della fluorescenza delle reazioni di qPCR nello strumento Q3-Plus in sostituzione alle 4 camere **CMOS** che attualmente sono impiegate. Inoltre si potrebbe condurre anche uno studio più approfondito sulla sua operazione in CCT in modo da capirne i relativi vantaggi/svantaggi rispetto all'utilizzo dei canali fisici di acquisizione.

Bibliografia

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, and P. Walter. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 4 edition, 2002.
- [2] P. Bolzern, R. Scattolini, and N. Schiavoni. *fondamenti di controlli automatici*. McGraw-Hill Education, 2015.
- [3] A. Gamal and H.Eltoukhy. Cmos image sensor. *IEEE Circuits and Devices Magazine*, 5 2005.
- [4] N. Instrument. Oriel Cornestore 130 1/8m, Reference Website, 2014. URL <https://www.newport.com/f/cs130-high-resolution-monochromators>.
- [5] S. Kasap. *Optoelectronics and Photonics*. PrenticeHall, 2011.
- [6] J. Kotz, P. Treichel, J. Townsend, and D. Treichel. *Chimica*. Edises Università, 2017.
- [7] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. Specific enzymatic amplification of dna in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1986.
- [8] K. B. Mullis and F. Faloona. Specific synthesis of dna in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzimol*, 155:335–350, 1987.
- [9] J. Nakamura and Others. *Basics of Image Sensors*. Taylor and Francis, 2006.
- [10] I. Rech and G. Acconcia. *Signal recovery*. Online, 2019.
- [11] ResearchGate. OceanOptics USB-4000 Fiber Optic Spectrometer, Optical Bench, 2017. URL <https://www.newport.com/f/cs130-high-resolution-monochromators>.
- [12] A. Sedra and K. Smith. *Circuiti per la microelettronica*. Edises Università, 2019.
- [13] Semorck. Semrock Optical Filters, Official Website, 2022. URL <https://www.semrock.com/>.

- [14] STMicroelectronics. CCT computation using VD6283, Application Note, 2021. URL <https://www.st.com/en/imaging-and-photonics-solutions/vd6283tx.html#documentation>.
- [15] STMicroelectronics. Hybrid filter multispectral sensor with light flicker engine, VD6283TX Datasheet, 2021. URL <https://www.st.com/en/imaging-and-photonics-solutions/vd6283tx.html#documentation>.
- [16] M. Veronesi. *Regolazione PID*. FrancoAngeli, 2011.

A | Appendice A

Un'immagine reale del sensore catturata al microscopio elettronico è la seguente:

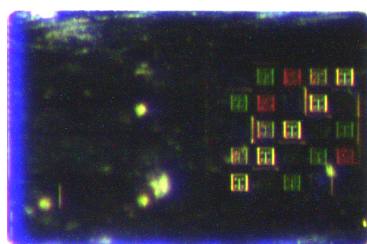


Figura A.1: Foto tramite microscopio elettronico del sensore.

Nella parte destra si può notare la matrice dei fotodiodi introdotta e descritta nella sezione 3.3.1 ed i diversi filtri ottici impiegati, che appaiono di diverso colore.

Un'ulteriore immagine, come anticipato nella sezione 4.1.4 mostra l'andamento del rumore di buio in funzione della temperatura, acquisito con tempo di integrazione sul sensore davvero basso e pari a $T_{exp} = 64ms$ e $gain$ pari a $2.5x$.

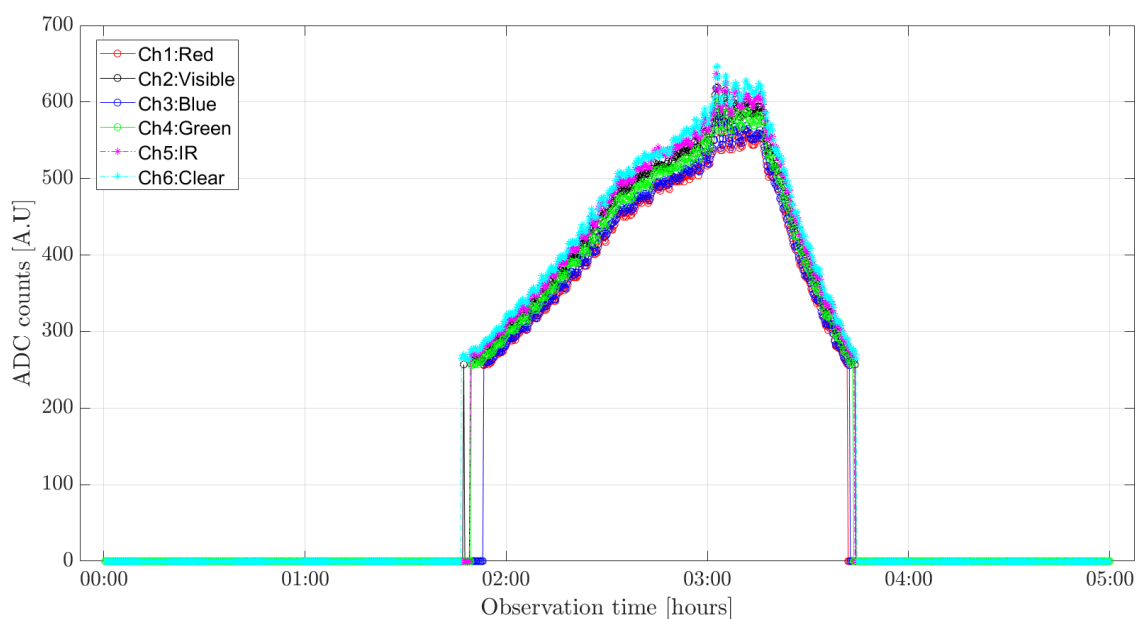


Figura A.2: Andamento del rumore di buio in funzione della temperatura.

Da questa nuova figura si può cogliere un importante risultato per il *Rainbow*, finché non si raggiunge una temperatura operativa di circa 40-45°C il valore uscita di rumore dal sensore è praticamente nullo.

Infine, ricollegandoci al paragrafo 5.2 riguardante la descrizione dei setup di misura impiegati, si riporta qui in basso un estratto del CAD del supporto realizzato e stampato in 3D:

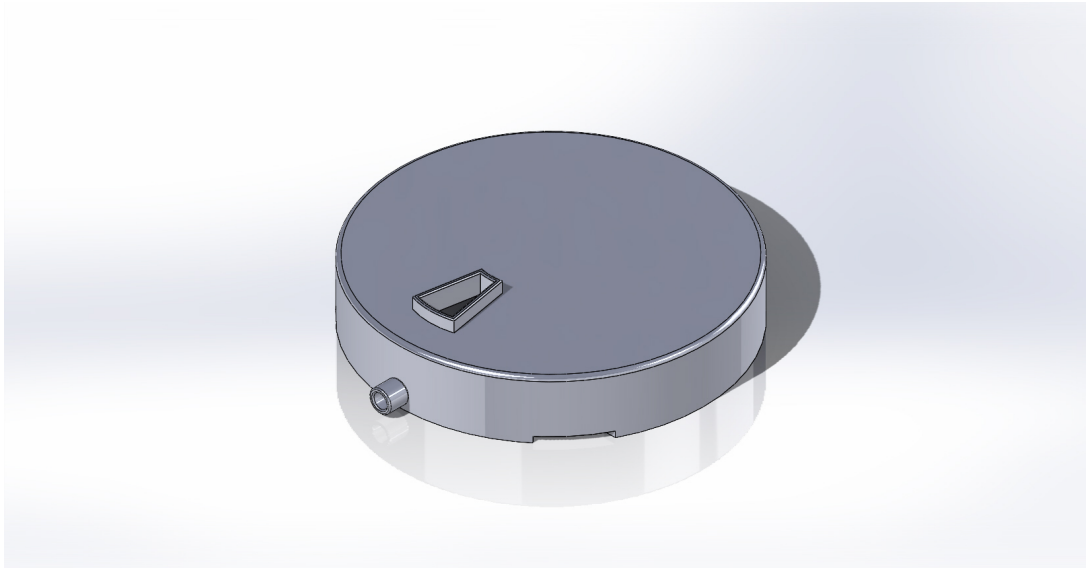


Figura A.3: Supporto fisico usato per le acquisizioni del pH.

Sono visibili gli alloggiamenti per il *Rainbow* nella parte superiore e per il LED bianco nella parte laterale, unitamente alla fessura per l'inserimento della cartina tornasole.

Elenco delle figure

1.1	Struttura a doppia elica del DNA e accoppiamenti tra le quattro basi azotate.	6
1.2	Passaggi svolti in un ciclo di PCR.	8
1.3	Dinamica della tecnica qPCR.	10
2.1	Lo strumento e la cartuccia.	15
2.2	Grafico esploso dal CAD dello strumento.	15
2.3	Dettaglio sul chip della cartuccia del Q3-Plus.	16
2.4	Relazione resistenza-temperatura nel chip.	17
2.5	Andamento termico di un singolo ciclo di PCR.	18
2.6	Testa ottica del Q3-Plus.	19
2.7	Calo dell'emissione in fluorescenza.	21
2.8	Esempio del possibile controllo in feedback nel Q3-Plus.	22
3.1	Sezione della giunzione <i>pn</i> .	24
3.2	Assorbimento nel Silicio in funzione della lunghezza d'onda.	26
3.3	Andamento del coefficiente e della lunghezza di assorbimento nel Silicio.	26
3.4	Assorbimento del fotone con $E_{photon} > E_{gap}$	27
3.5	Fotodiodo: struttura, bande energetiche, densità di carica, campo elettrico e profilo di assorbimento.	28
3.6	Efficienza quantica ideale.	29
3.7	Schematico di un <i>TransImpedance Amplifier</i> .	31
3.8	Configurazione circuitale di un <i>3T active-pixel</i> .	32
3.9	Circuito equivalente del fotodiodo in fase di acquisizione.	33
3.10	Andamento dei potenziali sulla capacità e sull'uscita del pixel.	34
3.11	Versioni BGA e flex del Rainbow	36
3.12	Schematico del Rainbow	36
3.13	Matrice dei fotodiodi del <i>Rainbow</i>	38
3.14	Struttura del pacchetto dati.	39
3.15	Rappresentazione schematica del rumore stazionario gaussiano.	48
3.16	Modelli dell'elettrone per fini di rumore.	49

3.17	Modelli impulso per elettrone in movimento.	50
3.18	Valutazione del valore medio di corrente costituito dalla sovrapposizione di impulsi di forma costante.	51
3.19	Valutazione del valore quadratico medio.	52
3.20	Spettro del rumore con andamento a seno cardinale e primo zero.	54
3.21	Le curve di trasmissione dei filtri ottici.	56
3.22	Trasmissione in banda ottica del visibile, <i>RGB</i>	57
3.23	Risposta angolare del Rainbow	58
4.1	Spettrometro impiegato, USB4000.	59
4.2	Struttura dello spettrometro e percorso ottico della luce.	60
4.3	Guadagni misurati nei 6 canali.	62
4.4	Guadagni teorici Vs ottenuti.	63
4.5	Andamento del valore di saturazione.	64
4.6	Andamento del rumore di buio sui 6 canali.	65
4.7	Grafico 1-D del rumore di buio.	66
4.8	Grafico 1-D del rumore di buio linearizzato.	67
4.9	Curve di interpolazione del rumore.	67
4.10	Andamento della <i>varianza</i> del rumore.	68
4.11	Andamento del valore <i>RMS</i> del rumore.	69
4.12	Grafico <i>error-bar</i> del canale 1.	69
4.13	Il forno controllato.	70
4.14	La rampa termica generata.	70
4.15	Rumore di buio in funzione della temperatura visto nel tempo.	71
4.16	Temperatura acquisita con il multiplexer.	72
4.17	Zoom sull'andamento esponenziale del rumore in funzione della temperatura.	73
4.18	Struttura interna del monocromatore e percorso ottico della luce.	74
4.19	Monocromatore impiegato.	74
4.20	Acquisizione dello spettro del monocromatore con il <i>Rainbow</i>	75
4.21	Spettro della lampada del monocromatore.	76
4.22	Spettri normalizzati dei canali del <i>Rainbow</i> rispetto al canale <i>Clear</i>	77
4.23	Setup impiegato per la stima della sensibilità del <i>Rainbow</i>	79
4.24	LED blu polarizzato con doppia rampa acquisito dal Rainbow.	79
4.25	Spettri del LED blu.	80
4.26	Andamento del picco emesso in funzione della corrente I_{LED}	80
4.27	Calo del picco all'aumentare della temperatura del LED.	81
4.28	Spettri medi del LED blu in funzione dell'aumento della temperatura.	82

4.29	Riduzione del picco e delle aree degli spettri del LED.	82
4.30	Andamento del LED ambra visto dal <i>Rainbow</i>	83
4.31	Andamento del LED ambra visto dal <i>Rainbow</i>	84
4.32	Andamento del picco e dell'area del LED ambra.	84
4.33	Shift in λ del picco del LED ambra in <i>nm</i>	85
4.34	LED ambra visto nuovamente con il <i>Rainbow</i>	85
4.35	Setup esterno e strumenti usati per le misure LED vs temperatura.	87
4.36	Setup interno per le misure LED vs temperatura con relative stampe 3D.	87
4.37	LED ambra statico	88
4.38	Effetti termici sul LED ambra	88
4.39	LED ambra sotto effetto rampa termica.	89
4.40	Effetti termici sul LED ambra	89
4.41	LED ambra con polarizzazione variabile	90
4.42	Effetti termici sul LED ambra	90
4.43	LED ambra con ventola	91
4.44	Effetti termici sul LED ambra	91
4.45	LED blu statico	92
4.46	Effetti termici sul LED blu	92
4.47	LED blu sotto effetto rampa termica.	93
4.48	Effetti termici sul LED blu della rampa termica.	93
4.49	LED blu sotto rampa di corrente	94
4.50	Effetti termici sul LED blu della rampa di corrente	94
4.51	LED blu con ventola	95
4.52	Effetti termici sul LED blu	95
4.53	Spettri della sorgente ad ampio spettro e dei filtri dei 4 canali ottici.	97
4.54	Curve di trasmissione dei filtri dei 4 canali ottici.	98
4.55	Curve di trasmissione della cascata dei filtri dei 4 canali ottici.	99
4.56	Setup esperimento in Q3-Plus.	101
4.57	Andamento dei LED durante la qPCR monitorati con il sensore.	102
4.58	Scala delle temperature di colore.	103
4.59	Diagramma di cromaticità e luogo di Planck.	103
4.60	Schema a blocchi del calcolo della CCT.	105
4.61	CCT calcolata per il LED ambra.	105
4.62	Setup esperimento con Q3-Plus e spettrometro.	106
4.63	Spettri dei LED acquisiti con lo spettrometro.	107
4.64	Andamento del picco degli spettri nei 4 canali.	108
4.65	Andamento delle aree degli spettri nei 4 canali.	108

4.66	Lunghezze d'onda del picco degli spettri nei 4 canali.	109
4.67	Testa ottica del Q3-Plus priva dei filtri ottici di eccitazione.	110
4.68	Andamento degli spettri medi senza i filtri ottici di eccitazione.	111
4.69	Andamento dei picchi degli spettri senza i filtri ottici di eccitazione.	111
4.70	Andamento delle aree degli spettri senza i filtri ottici di eccitazione.	112
4.71	Shift del picco degli spettri senza i filtri ottici di eccitazione.	112
4.72	Reazione qPCR monitorata con il sensore.	113
5.1	Valori ammessi per il pH.	117
5.2	Andamenti dei 3 canali RGB acquisiti dal dischetto.	118
5.3	Andamenti delle 2 CCT dei pH acquisiti dal dischetto.	119
5.4	Risultato in RGB dei 3 pH acquisiti dalle cartine.	120
5.5	Risultato in CCT dei 3 pH acquisiti dalle cartine.	121
5.6	Risultato in RGB dei 3 pH acquisiti dalle cartine senza LED.	121
5.7	Risultato in CCT dei 3 pH acquisiti dalle cartine senza LED.	122
5.8	Incrocio dell CCT dei 2 campioni sulle rette caratteristiche.	123
A.1	Foto tramite microscopio elettronico del sensore.	129
A.2	Andamento del rumore di buio in funzione della temperatura.	129
A.3	Supporto fisico usato per le acquisizioni del pH.	130

Elenco delle tabelle

2.1	Descrizione della parte ottica del Q3-Plus.	20
3.1	Lista degli OpCodes disponibili.	41
3.2	Registri del T_{exp} e loro indirizzi.	43
3.3	Pacchetto per impostazione del $T_{exposure}$	43
3.4	Parametri di esposizione su 2 byte.	43
3.5	Registro dell'IMP e relativo indirizzo.	44
3.6	Lista dei guadagni analogici e dei loro valori.	45
3.7	Indirizzi dei registri di guadagno.	45
3.8	Pacchetto per impostazione del guadagno.	46
3.9	Parametri del pacchetto dati di guadagno.	46
4.1	Lista dei T_{exp} usati per acquisire il rumore di buio.	65
4.2	Risultati del LED ambra statico.	88
4.3	Risultati del LED ambra in rampa di temperatura.	89
4.4	Risultati del LED ambra in rampa di corrente.	90
4.5	Risultati del LED ambra raffreddato con la ventola.	91
4.6	Risultati del LED blu statico.	92
4.7	Risultati del LED blu in rampa termica.	93
4.8	Risultati del LED blu in rampa di corrente.	94
4.9	Risultati del LED blu raffreddato con la ventola.	95
4.10	Legenda per i grafici degli spettri dei filtri ottici e delle loro trasmissioni.	97
4.11	Risultati prova attenuazione cascata con il <i>Rainbow</i>	100
4.12	Parametri di acquisizione del protocollo 4λ del Q3-Plus.	100
4.13	Valori dei tempi di esposizione e numero spettri acquisiti per ogni canale.	106
5.1	Tipi di soluzioni e relativi valori di pH e pOH.	116
5.2	Misure effettuate sui 2 campioni a pH incognito.	123

Lista dei Simboli

Variabile	Descrizione	Unità SI
λ	lunghezza d'onda	nm
$\lambda_{emission}$	lunghezza d'onda emessa dal fluoroforo	nm
$\lambda_{excitation}$	lunghezza d'onda assorbita dal fluoroforo	nm
ρ	resistività del materiale	$\frac{\Omega}{cm}$
α_R	Resistive Temperature Coefficient	$\frac{\Omega}{^\circ C}$
N_D	concentrazione atomi donori	cm^{-3}
N_A	concentrazione atomi accettori	cm^{-3}
n_i	concentrazione atomi intrinseca	cm^{-3}
$\chi_{depletion}$	estensione zona svuotata	cm
k_B	costante di Boltzmann	$\frac{eV}{T}$
T	temperatura	$^\circ C$
q	carica dell'elettrone	C
V_{rev}	tensione inversa applicata	V
V_{bi}	tensione di built-in della giunzione	V
ϵ_0	costante dielettrica del vuoto	$\frac{C^2}{N \cdot m^2}$
ϵ_{Si}	costante dielettrica relativa del silicio	[A.U.]
$C_{depletion}$	capacità di svuotamento	F
E_{photon}	energia del fotone	J
E_c	livello energetico della banda di conduzione	J
E_V	livello energetico della banda di valenza	J
E_{gap}	barriera energetica tra le 2 bande	J
h	costante di Planck	$J \cdot s$
$\chi_{diffusion}$	lunghezza di diffusione	cm
χ_{active}	spessore della zona attiva	nm
$\chi_{absorption}$	lunghezza di assorbimento	nm

Variabile	Descrizione	Unità SI
$D_{n,p}$	coefficienti di diffusione dei portatori	$\frac{cm^2}{s}$
$\mu_{n,p}$	mobilità dei portatori	$\frac{cm^2}{V \cdot s}$
$\tau_{n,p}$	tempo di vita medio dei portatori	s
α	coefficiente di assorbimento	cm^{-1}
L_a	lunghezza d'assorbimento	cm
η	efficienza quantica di conversione	$[A.U]$
R	responsività del fotodiodo	$\frac{A}{W}$
P_{inc}	potenza ottica incidente sul fotodiodo	W
I_{ph}	corrente generata dal fotodiodo	$\frac{A}{W}$
T_{Si-Air}	coefficiente di trasmissione	$[A.U]$
T_{exp}	tempo di esposizione del sensore	s
σ^2	<i>varianza</i> del rumore	$[A.U]$
σ	<i>Root Mean Square</i> del rumore	$[A.U]$

Ringraziamenti

Qui siamo giunti alla fine della stesura di questo mio lavoro di tesi e penso sia il momento di ringraziare, dal profondo del mio cuore, tutte le persone che mi hanno seguito, supportato e spronato in questi mesi di lavoro trascorsi.

Innanzitutto partirei dal ringraziare in modo particolare i miei genitori per avermi offerto e dato questa grandissima opportunità di studiare presso il *Politecnico di Milano* e per avermi sostenuto durante questo bellissimo percorso, a livello morale ed anche economico. Ringrazio soprattutto mia madre, per avermi cresciuto con tutto l'amore e l'affetto che poteva darmi, mentre papà lavorava lontano dalla famiglia, ma anche per guardarmi ed assistermi sempre da lassù.

Ringrazio tanto mio padre, per i suoi immensi sacrifici lavorativi, per i suoi incoraggiamenti e per i suoi insegnamenti.

Un particolare ringraziamento va al mio relatore, prof. Marco Carminati, per la sua gentilezza, cordialità e disponibilità mostrate durante il periodo di stesura di questa tesi.

Voglio ringraziare anche l'ing. Marco Bianchessi, per avermi accolto nel suo laboratorio e avere reso possibile questa mia esperienza formativa e lavorativa, dalla quale ho appreso molto.

Un importante ringraziamento va al mio tutor, ing. Lillo Raia, che mi ha insegnato e trasmesso tanto sul campo lavorativo, che mi ha seguito, guidato ed indirizzato nel migliore dei modi durante questo mio percorso.

Ci tengo anche a ringraziare tanto Giorgia, che mi ha aiutato molto nei miei primi passi con il software MATLAB e ha sempre chiarito tutti i miei dubbi e le mie curiosità riguardanti l'ottica.

Un ringraziamento va anche a tutti gli altri colleghi del laboratorio, ingegneri e biologi, per avermi fatto sentire a mio agio sin dall'inizio e per i momenti di svago delle pause caffè dopo pranzo.

Infine vorrei anche ringraziare tutti i membri della mia famiglia, mia nonna, i miei zii ed i miei cugini, per avermi sempre supportato ed incitato.

