

Macro Micro Nano: Dal Visibile all'Indivisibile

Studenti degli Stages

Giulia Oliveti - Liceo Scientifico L. Da Vinci

Sofia Garagnani - Liceo Scientifico A. Righi

Federico La Face - Liceo Scientifico G. M. Colombini

Responsabili Scientifici c/o Istituto per lo Studio dei Materiali Nanostrutturati CNR-ISMN

**Dott. A. Gambardella
(Ph. D.)**

**M. Checchi
(Laureanda del Corso di Biotecnologie c/o ALMA Mater Studiorum-Bologna)**

20.0kV X25000 120µm

La Microscopia: Oltre l'Occhio

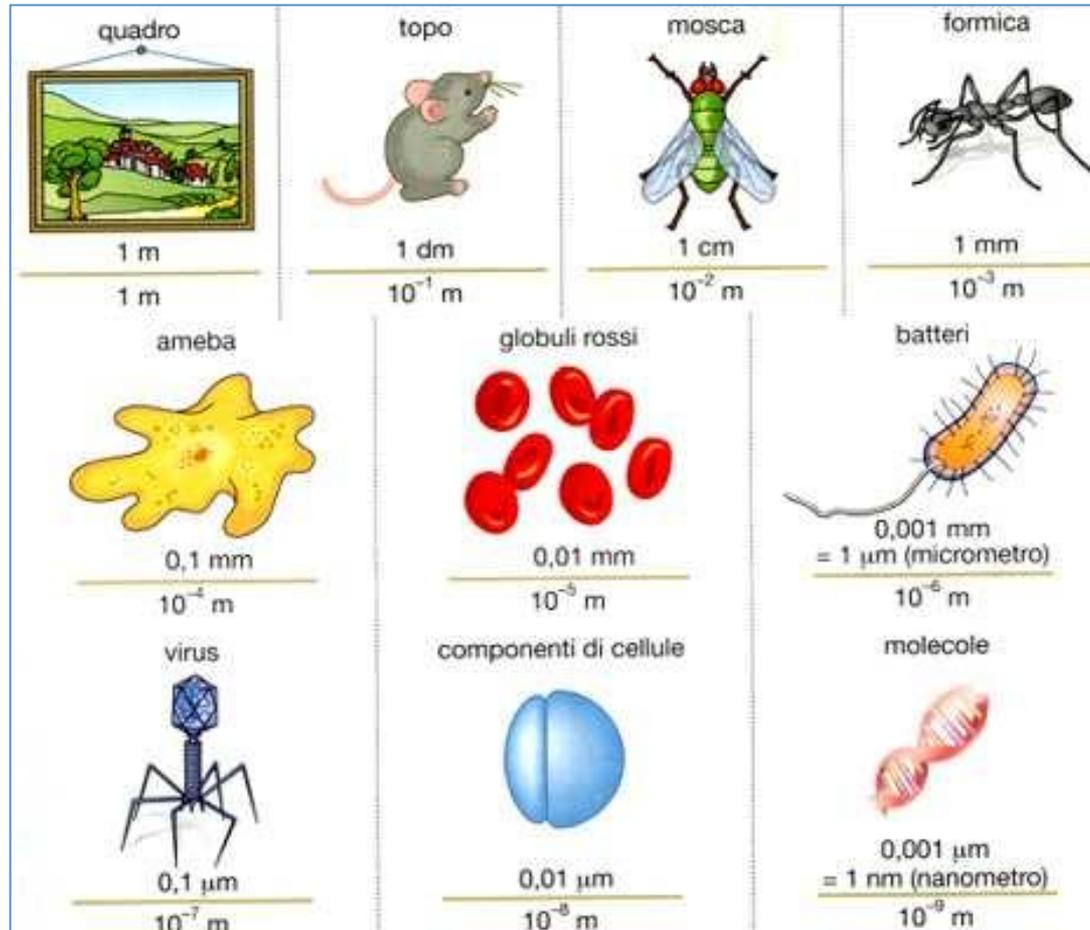
La microscopia nasce con l'uso delle prime lenti lavorate intorno al XV secolo, e inizia a perfezionarsi nel XVII. Durante la seconda metà del XX secolo la microscopia ebbe un salto evolutivo, favorendo la nascita di una lunga serie di microscopi dai principi operativi complessi, a partire dai microscopi elettronici (SEM) fino ad arrivare ai microscopi a forza atomica (AFM) e a scansione tunnel (STM).

Grazie a questa crescita abbiamo potuto esplorare immagini sempre più ingrandite ("risolte") fino a visualizzare la struttura atomica della materia.

Sebbene sia possibile ottenere risoluzioni sempre più elevate, nasce tuttavia un problema: una tecnica microscopica rispetto ad un'altra si basa su un diverso **principio operativo**, per cui sarà impossibile che un campione possa essere studiato mediante qualsiasi microscopio; infatti il **meccanismo di contrasto** su cui si basa ognuno di essi può essere via via molto, poco o per niente compatibile con la natura del materiale che si sta visualizzando. Alcuni campioni richiedono una determinata **preparazione** che serve per estrarre le parti da analizzare e renderle visibili al microscopio che si vuole adoperare. Questo significa che ogni campione prima di essere osservato può avere bisogno di una specifica tecnica preparatoria, anche per cercare di eliminare il più possibile le contaminazioni esterne come l'ossigeno, l'acqua e la polvere. Ogni tecnica ha inoltre dei limiti per cui non tutti i campioni possono essere trattati per essere visualizzati con una data tecnica.

Facciamo un esempio: una mosca è possibile vederla al microscopio ottico senza nessun problema, mentre invece incontreremmo grosse difficoltà se noi volessimo vederla al SEM, questo perché dato che tale microscopio sfrutta la conduttività dei metalli, la mosca, essendo fatta di materiale organico, non è abbastanza conduttrice, perciò le cariche negative si accumulerebbero sulla superficie senza scaricarsi, impedendo i processi di emissione elettronica che sono alla base del principio operativo del SEM.

Questa esperienza sarà un excursus attraverso diversi **ordini di grandezza**, utilizzando tecniche via via più avanzate su materiali diversi: campioni ORGANICI (mosca e zanzara), INORGANICI (grafite), tecnologici (smartphone e CD-rom).



Rappresentanti di diversi ordini di grandezza

Il Nostro Strumento Ottico: L'occhio umano

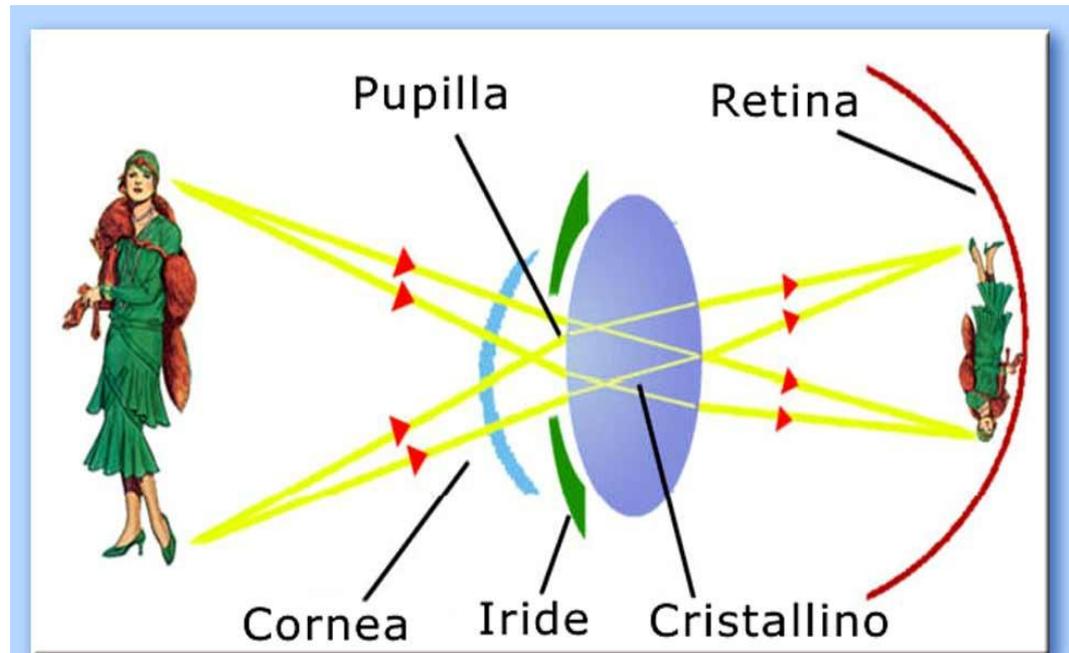
Questa esperienza vuole essere un tentativo di vedere oltre l'**occhio umano** (organo pur complesso e raffinato).

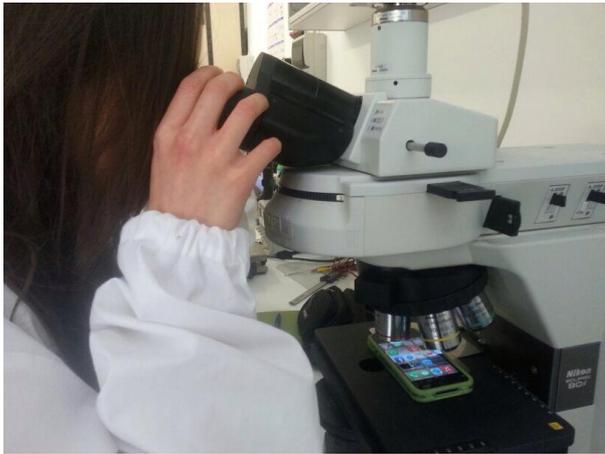
Quest'ultimo utilizza una lente convergente (**crystallino**) per convogliare i raggi luminosi provenienti da un oggetto qualsivoglia su una superficie sensibile (**retina**). Questa energia luminosa viene trasferita attraverso il nervo ottico al cervello il quale la trasforma in una rappresentazione che noi chiamiamo **immagine**. Per vedere un oggetto distintamente è necessario che sulla retina si formi un'immagine nitida (che risulta inizialmente capovolta e rimpicciolita): il cristallino è in grado di modificare la sua forma - e quindi la sua distanza focale- per ottenere una visione distinta degli oggetti.

Questo complesso meccanismo ci consente di orientarci nel mondo attorno a noi, cogliere l'espressione e i sentimenti delle persone, godere di straordinarie immagini e degli spettacoli della natura.

La capacità dell'occhio di distinguere i dettagli di un'immagine è caratterizzata dal suo **potere risolutivo** che rappresenta la capacità di percepire come chiaramente separati due punti vicini. In particolare, il potere risolutivo dell'occhio umano è pari a circa $0,1 \text{ mm} = 100 \text{ }\mu\text{m}$.

Schema dell'occhio umano





Campioni utilizzati nell' esperienza:
Mosca, zanzara, CD, grafite, Smartphone.

MICROSCOPIO OTTICO: Meccanismo di contrasto- La microscopia ottica è in grado capace di produrre immagini ingrandite di oggetti o di particolari di essi, troppo piccoli per essere osservati ad occhio nudo. Il Microscopio Ottico, per mezzo di una combinazione opportuna di lenti ingrandisce l'immagine del campione, illuminandolo da sotto (luce trasmessa) oppure da sopra (luce riflessa), oppure utilizzando opportuni filtri, a seconda delle condizioni di misura. L'immagine ingrandita prodotta da un obiettivo viene focalizzata e ulteriormente ingrandita da un oculare. L'ingrandimento totale è dato dal prodotto tra l'ingrandimento dell'oculare (10x) e quello dell'obiettivo (5x,10x,20x,50x,100x).

Limitazioni- Non è possibile andare al di sotto della lunghezza d'onda della luce visibile (circa 0.2 micron); inoltre, ad ogni rifrazione il segnale luminoso risulta indebolito. Ingrandimento max: circa 1000x.

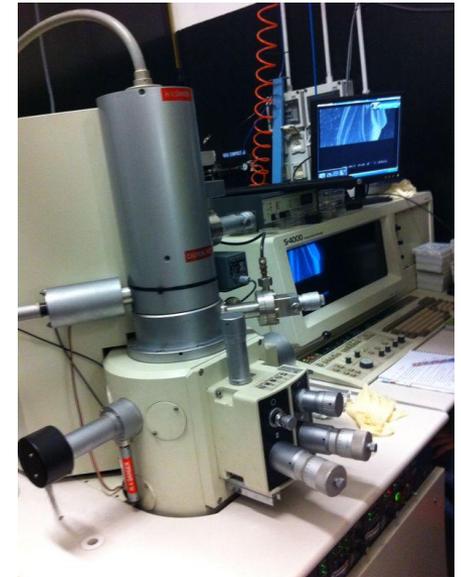


SEM (Scanning electron Microscopy): Meccanismo di contrasto- Il SEM non sfrutta la luce come sorgente di radiazioni, ma utilizza un fascio di elettroni primari focalizzati che colpiscono il campione.

Il fascio primario viene fatto scandire, ossia pilotato punto dopo punto e riga dopo riga, su una piccola zona quadrata del campione (**finestra di scansione**). Nell'interazione tra il fascio primario e gli atomi del campione, vengono emessi (scatterati) degli elettroni detti **elettroni secondari**. Il SEM analizza questa seconda emissione; infatti questi elettroni sono catturati da uno speciale rivelatore e convertiti in impulsi elettrici che vengono inviati in tempo reale ad uno schermo. Il risultato è un'immagine in bianco e nero ad elevata risoluzione e grande profondità di campo che ha caratteristiche simili a quelle di una normale immagine fotografica.

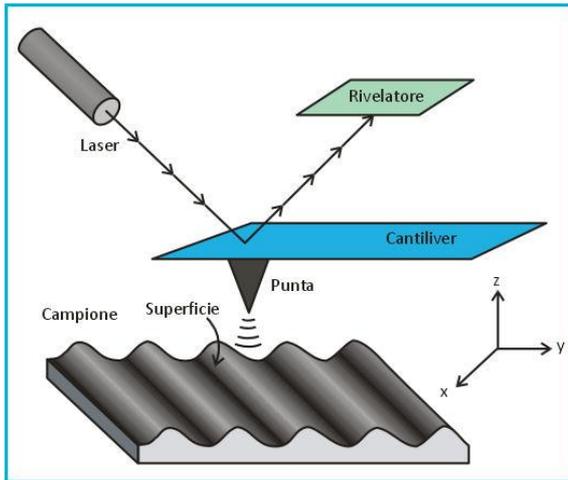
Limitazioni- Il fascio di elettroni che viene usato come sonda ha necessariamente una dimensione finita; ciò implica una risoluzione teorica di circa 5nm.

Il campione deve essere inoltre in grado di condurre corrente, ossia deve essere conduttivo in origine o reso tale attraverso tecniche di laboratorio.



Campioni utilizzati nella esperienza: Mosca, zanzara, grafite.

AFM = Atomic Force Microscopy (Microscopio a Forza Atomica)



Meccanismo di Contrasto

L'AFM è costituito da una microleva (cantilever) alla cui estremità è montata una punta acuminata (tip), generalmente di silicio che presenta un raggio di curvatura dell'ordine dei nanometri. La punta investigatrice viene avvicinata alla superficie del campione di cui si vuole effettuare la scansione. La Forza di van der Waals che agisce tra la punta ed il campione provoca una deflessione del cantilever, che viene misurata utilizzando un punto laser riflesso dalla sommità della microleva verso un rivelatore o fotodiodo che registra questi spostamenti e ci fornisce la topografia della superficie del campione.

Generalmente il campione è collocato su un tubo piezoelettrico, che può spostarlo in direzione perpendicolare (direzione z) per mantenere una forza costante e nel piano (direzioni x ed y) per analizzarne la superficie.

Limitazioni

Il campione non deve essere sottoposto a vibrazioni meccaniche che potrebbero modificare la misura e creare un artefatto; con l'utilizzo di molle, il sistema in cui è inserito il campione viene sospeso e la vibrazioni vengono assorbite.

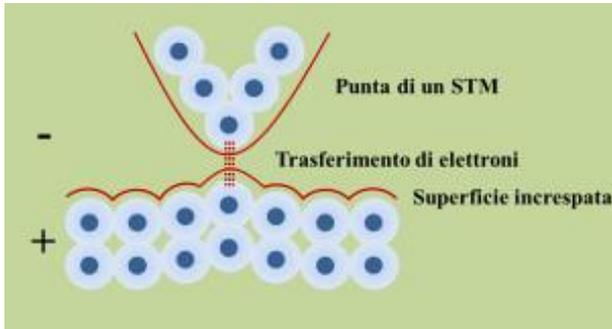
L'AFM può riprodurre una profondità dell'ordine del micrometro ed un'area massima di circa 100 per 100 micrometri. La sua risoluzione verticale teorica è di circa 0.1 nm, mentre quella laterale è di circa 1 nm.

Inoltre tale microscopio non è in grado di analizzare le immagini altrettanto velocemente di un microscopio elettronico a scansione: per effettuare la scansione di un'area ci vogliono tipicamente diversi minuti.

Campioni utilizzati nella esperienza- CD-ROM, grafite.



STM = Scanning Tunnelling Microscopy (Microscopio a Scansione Tunnel)



Meccanismo di contrasto

Quando una punta conduttrice, (ad es. di platino-iridio, tungsteno o altri metalli adatti) è portata molto vicino alla superficie da esaminare, viene applicata una differenza di potenziale tra i due che può permettere agli elettroni di realizzare un tunnel attraverso il vuoto tra di loro. Le informazioni sono acquisite monitorando la corrente e in base alla posizione della punta che scandisce l'intera superficie dando luogo alla topografia del campione sotto forma di immagine su uno schermo.



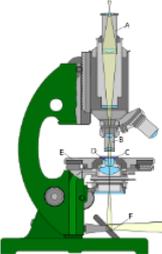
Limitazioni

Per un STM è considerata buona una risoluzione laterale teorica di 0,01 nm. IL'STM può essere utilizzato non solo in condizioni di ultra alto vuoto, ma anche in aria o liquido; si tratta di una tecnica impegnativa, in quanto può richiedere superfici estremamente stabili e pulite, punte acuminate, ottimo controllo delle vibrazioni e abbattimento di ogni rumore meccanico/eltrico/termico.

Inoltre tale microscopio, come l'AFM, non è in grado di produrre immagini altrettanto velocemente di un microscopio elettronico a scansione: per effettuare la scansione di un'area ci vogliono tipicamente diversi minuti.

Campioni utilizzati nella esperienza - Grafite.

TABELLA RIASSUNTIVA

TIPOLOGIA di MICROSCOPIO	MOSCA-ZANZARA (campioni organici)	SMARTPHONE-CD-rom (campioni tecnologici)	GRAFITE (campione inorganico)
<p style="text-align: center;">OTTICO Risoluzione Laterale teorica : 0.2 mm</p> 	<p style="text-align: center;">Nessuna preparazione richiesta</p>	<p style="text-align: center;">Nessuna preparazione richiesta per Smartphone</p> <p style="text-align: center;">Il CD deve essere tagliato in pezzi e ripulito dallo strato superficiale utilizzando lo scotch, poi sonicandolo per 15' in Etanolo.</p>	<p style="text-align: center;">Nessuna preparazione richiesta</p>
<p style="text-align: center;">SEM Risoluzione Laterale Teorica : 10 nm</p> 	<p style="text-align: center;">Disidratazione preventiva mediante alcoli per necessità di vuoto, doratura mediante gas Argon per rendere conduttiva la superficie.</p>	<p style="text-align: center;">NO (campione non conduttivo e doratura incompatibile con campione)</p>	<p style="text-align: center;">Nessuna preparazione richiesta (la grafite è conduttiva)</p>

<p style="text-align: center;">AFM</p> <p style="text-align: center;">Risoluzione Laterale Teorica : 0.1 - 1 nm</p> 	<p>NO (Elevato Aspect Ratio e superficie non conduttiva)</p>	<p>Come per l'Ottico</p>	<p>Nessuna preparazione richiesta</p>
<p style="text-align: center;">STM</p> <p style="text-align: center;">Risoluzione Laterale Teorica: 0.01 – 0.1 nm</p> 	<p>NO (Elevato Aspect Ratio e superficie non conduttiva)</p>	<p>NO (materiale non conduttivo)</p>	<p>Esfoliazione (Cleaving) Mediante nastro adesivo</p>

MICROSCOPIO OTTICO

- a1: Testa e occhio composto
- a2: Dettaglio dell'ala sinistra
- a3: Zampe posteriori

MOSCA DOMESTICA

PHYLUM: Artropodi

ORDINE: Ditteri

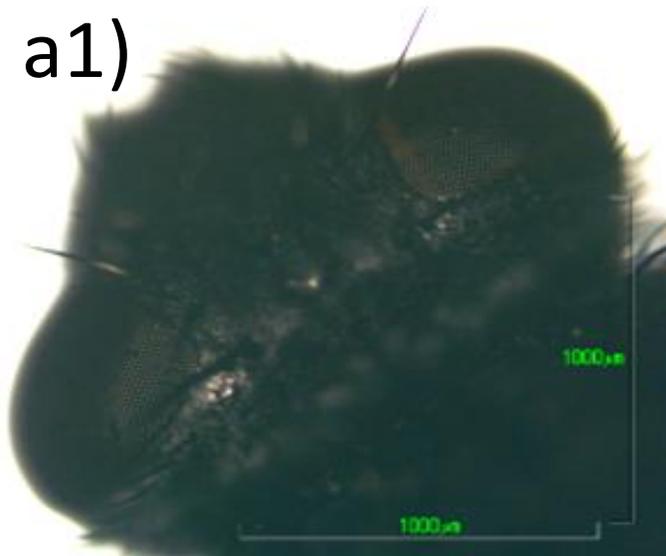
FAMIGLIA: Muscidi

GENERE: *Musca*

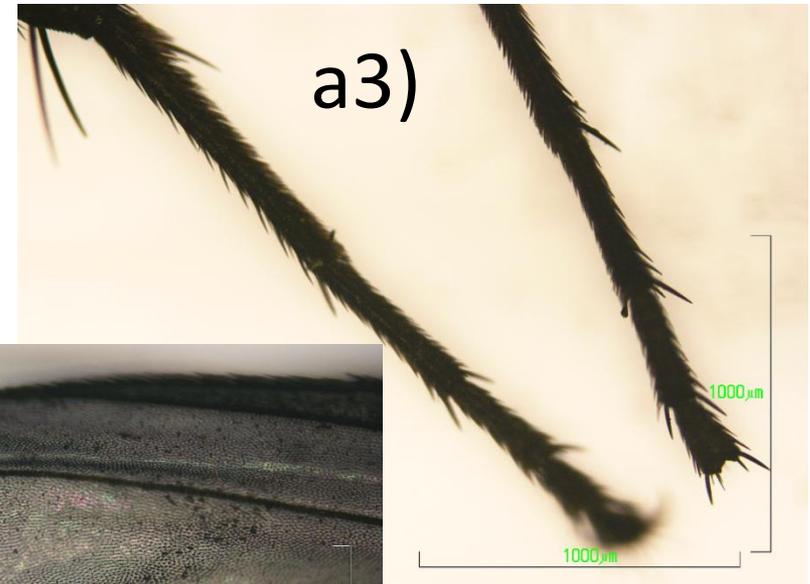
SPECIE: *Musca domestica*



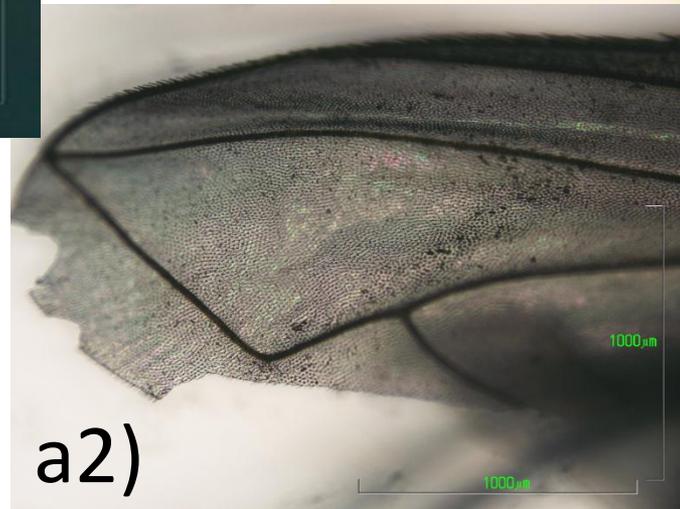
a1)



a3)



a2)



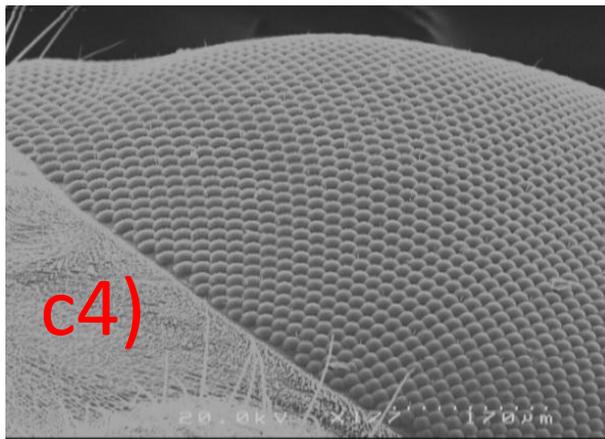
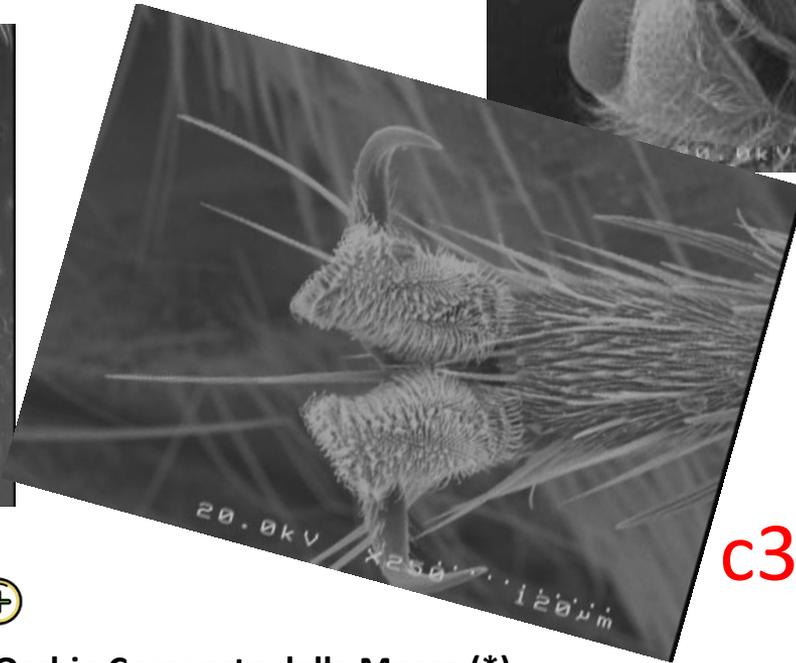
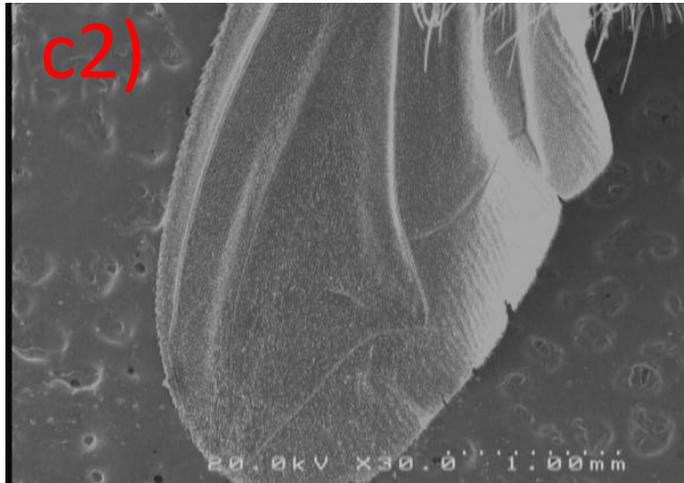
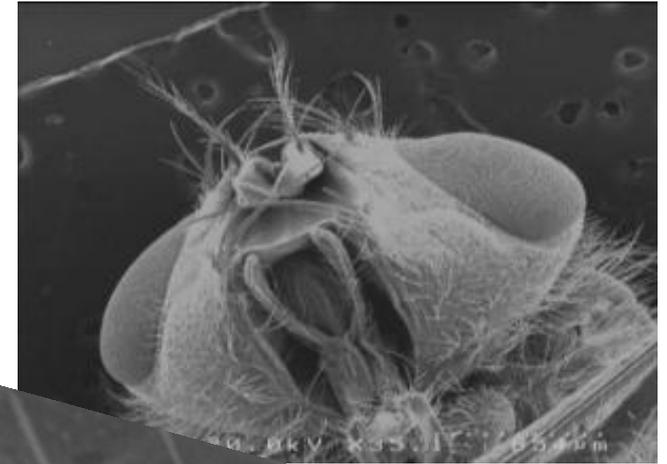
SEM

c1) dettaglio della testa dove è ben visibile l'apparato boccale

c2) dettaglio dell'ala

c3) dettaglio della zampa

c4) dettaglio dell'occhio composto con ommatide (*)



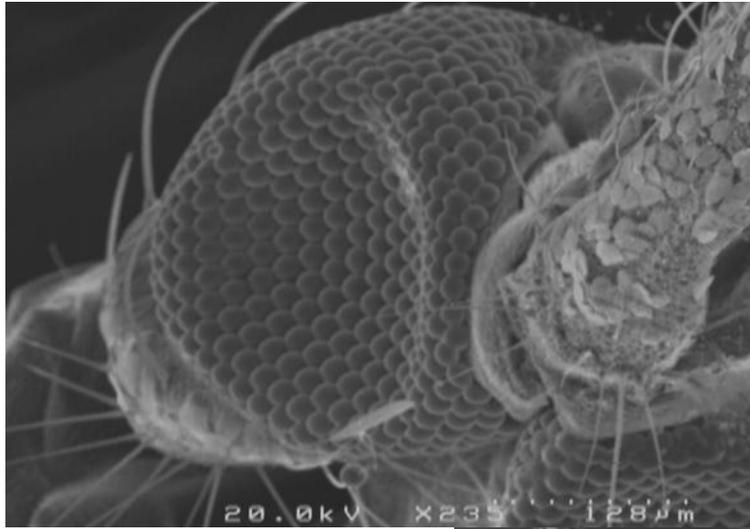
Occhio Composto della Mosca (*)

Gli **occhi composti** sono i fotorecettori più complessi, preposti alla percezione delle immagini. Hanno forma e sviluppo vario e in generale si localizzano nella parte dorso laterale del capo, talvolta fondendosi in un'unica struttura in corrispondenza del vertice. In alcuni insetti sono sostenuti da brevi processi. Strutturalmente sono composti da un insieme di unità elementari, dette **ommatidi**, in numero elevato, fino a diverse migliaia

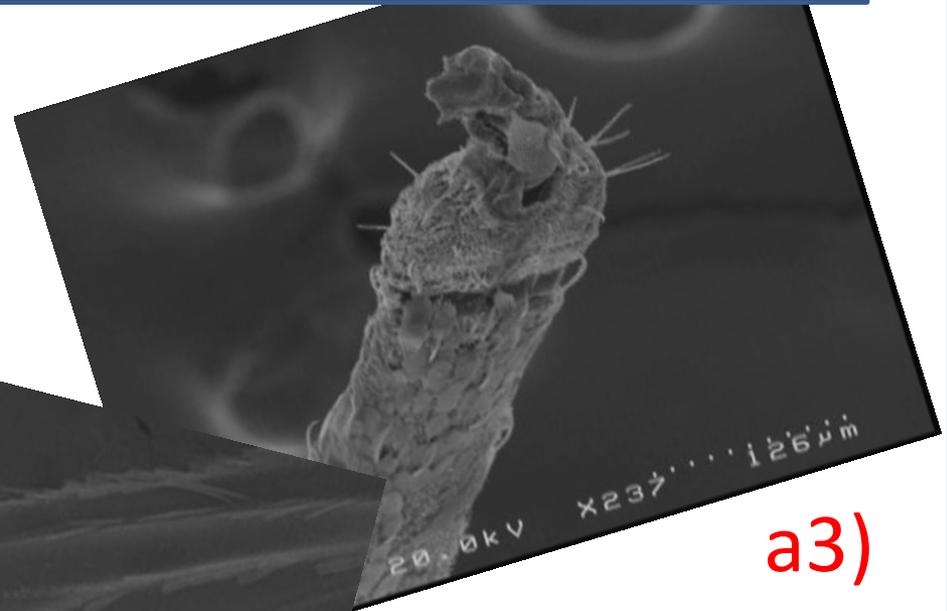
SEM

- a1) dettaglio degli occhi
- a2) dettaglio dell'ala
- a3) dettaglio del pungiglione

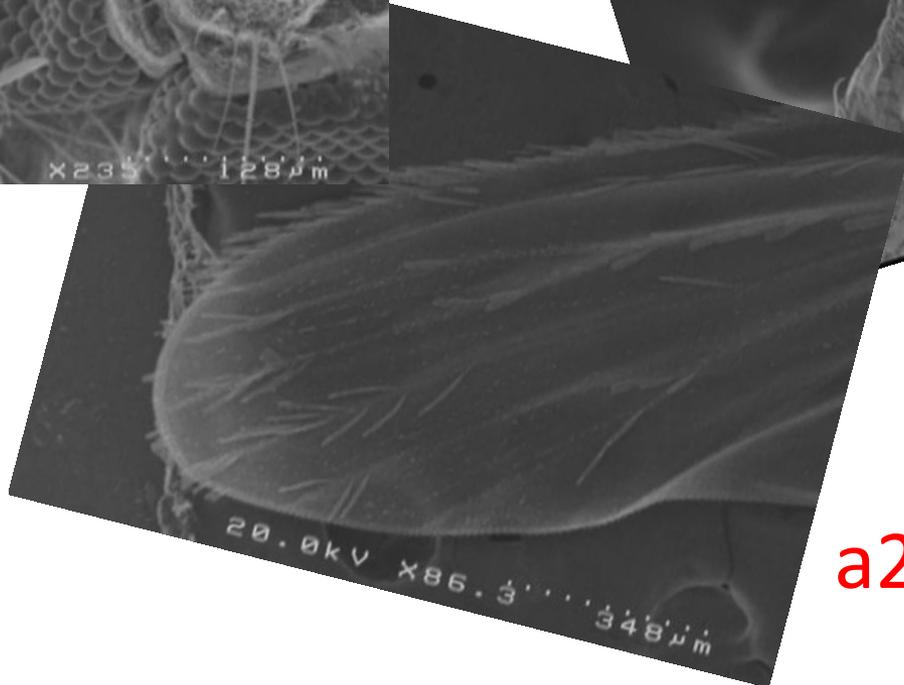
NOME ITALIANO: Zanzara
PHYLUM: Artropodi
ORDINE: Ditteri
FAMIGLIA: Culicidi
GENERE: Aedes
SPECIE: Culex pipiens



a1)



a3)



a2)



Curiosità sulla zanzara:

- Quando una zanzara è piena di sangue, un segnale chimico fa interrompere la puntura. Se questo segnale viene inibito mediante tecniche di laboratorio le zanzare succhiano fino ad esplodere
- Le orecchie dei maschi di zanzara hanno lo stessa quantità di cellule sensoriali delle orecchie umane. Questo serve ai maschi di zanzara per identificare le femmine in base al ronzio prodotto.
- Quando una zanzara rileva il battito d'ali del sesso opposto, comincia a sincronizzare il proprio con quello del potenziale compagno/a. I maschi più abili possono effettuare questa sincronizzazione in pochi secondi. Le femmine impiegano molto più tempo per sincronizzarsi.
- Le zanzare possono accoppiarsi a mezz'aria, spesso in appena 15 secondi
- Gli occhi occupano la maggior parte della testa delle zanzare. Questi occhi sono composti da lenti che trasmettono immagini infrarosse delle mappe di calore prodotte dagli organismi
- Solo le femmine pungono per prelevare il sangue necessario a fornire le proteine alle uova; i maschi prelevano le sostanze nutritive dalle piante.

MICROSCOPIO OTTICO

a1: Distacco tra parte masterizzata e parte vergine

Ingrandimento: 1000x

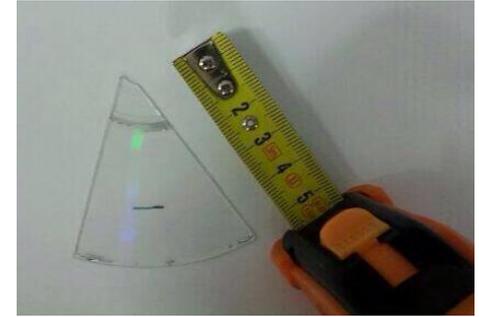
a1)

CD MASTERIZZATO

LUNGHEZZA: 5 cm

SPESSORE: 1,2 mm

MATERIALE: alluminio,
policarbonato e resina
acrilica.



Scrittura e lettura dei supporti scrivibili: CD-R

Il substrato su cui vengono “incise” le informazioni durante la fase di masterizzazione è costituito da un colorante organico chiamato *dye*. Durante il processo di scrittura, l’energia del raggio laser viene assorbita dal *dye*, la cui struttura molecolare subisce una modifica prodotta dal calore del laser.

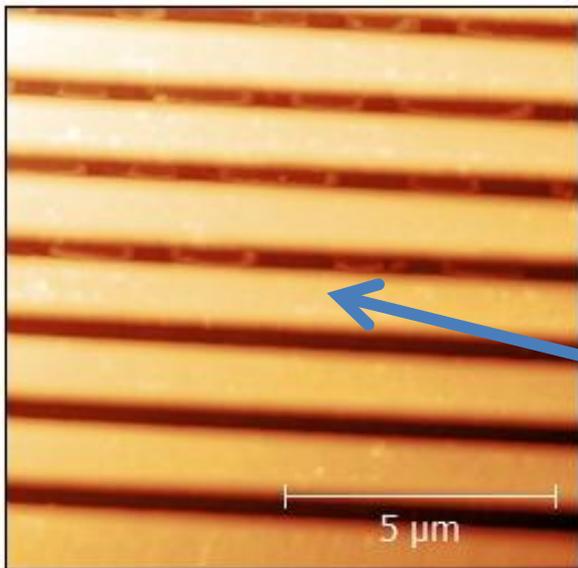
Il raggio laser produce inoltre la parziale fusione del policarbonato e la deformazione dello strato riflettente. Avviene la formazione di una regione di policarbonato fuso (*bump*) all’interfaccia policarbonato/*dye* e di un buco (*pit*) all’interfaccia metallo/*dye* dovuto alla decomposizione del *dye*.

Il lavoro del lettore CD è quello di puntare un suo laser lungo tutta la traccia a spirale del CD. Il raggio laser passando attraverso lo strato di policarbonato, riflette lo strato di alluminio e colpisce un componente ottico che essendo sensibile ai cambiamenti di luce riesce a determinare la presenza di *bump* e di zone piane (*pit*) che hanno intensità riflessa differente. Riconoscendo le sequenze di *bump* e *pit* è possibile ricostruire la traccia che era stata digitalizzata sul CD.

Utilizzando il microscopio ottico le tracce sul CD sono già visibili ad ingrandimento 20x, la differenza tra traccia masterizzata e traccia vergine è visibile e distinguibile al 50x e al 100x.

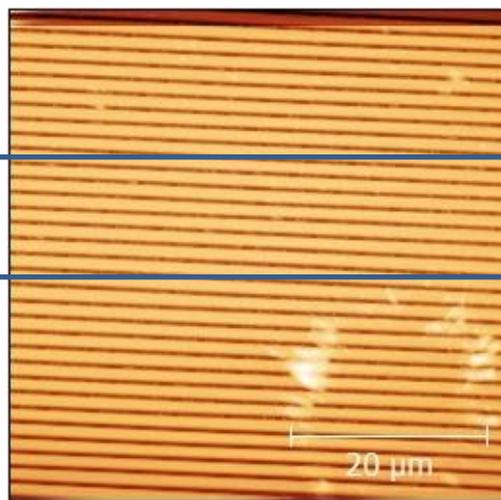
AFM

a2)



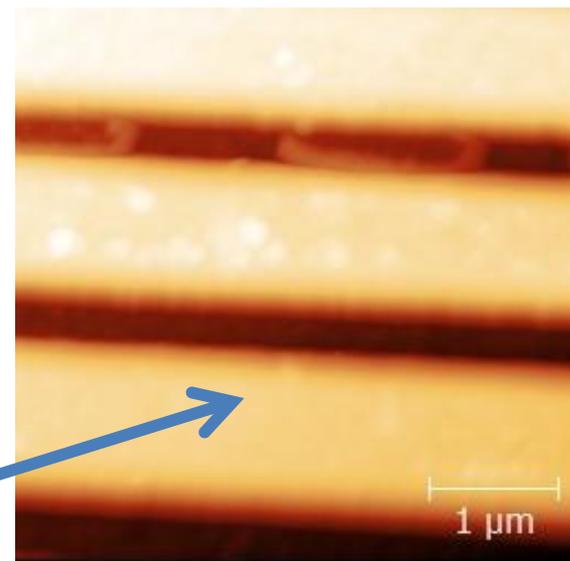
a2: risoluzione 10,5 μm x 10,5 μm

a1)

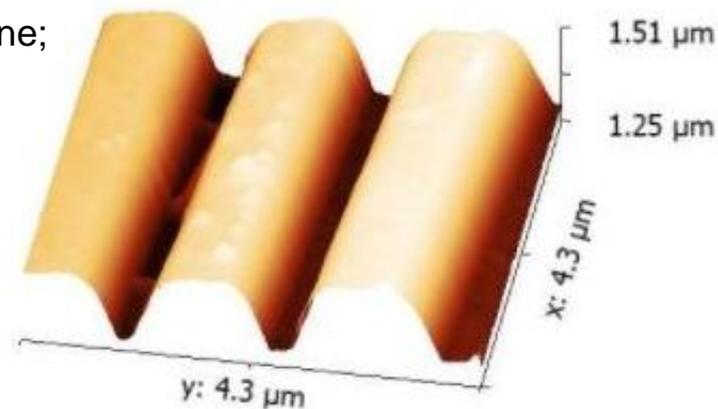
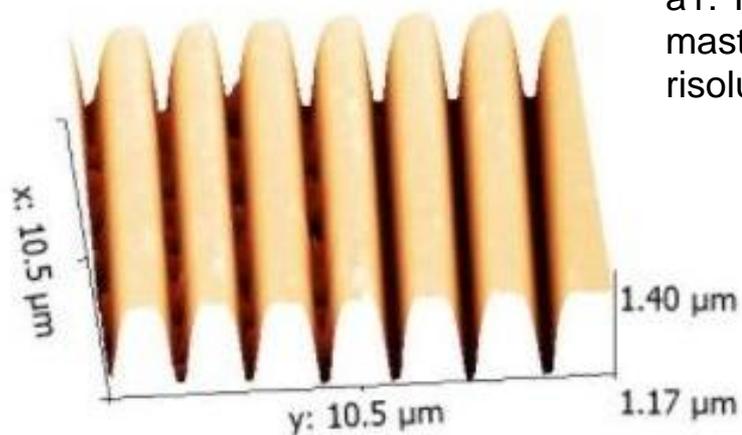


a1: Transizione tra parte masterizzata e parte vergine; risoluzione 50 μm x 50 μm

a3)



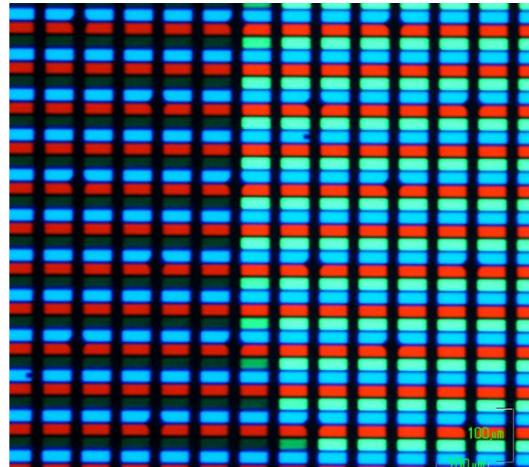
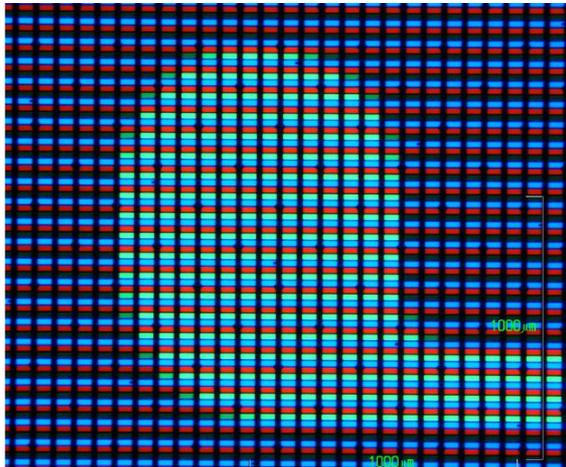
a3: risoluzione 4,3 μm x 4,3 μm



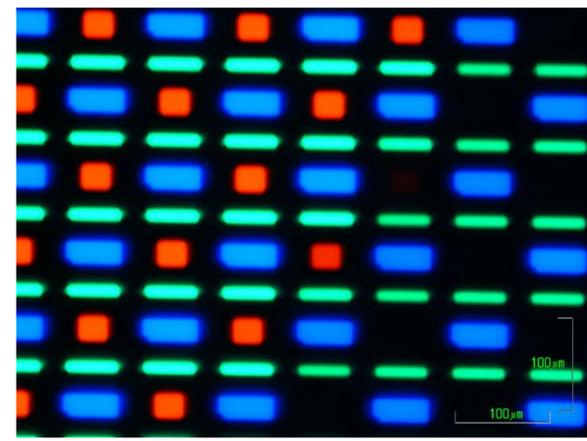
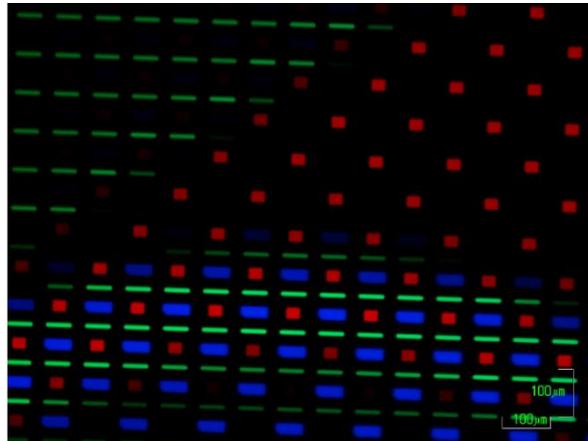
MICROSCOPIO OTTICO E CURIOSITÀ SUGLI SMARTPHONE

Schermi AMOLED - active matrix organic light emitting diode –

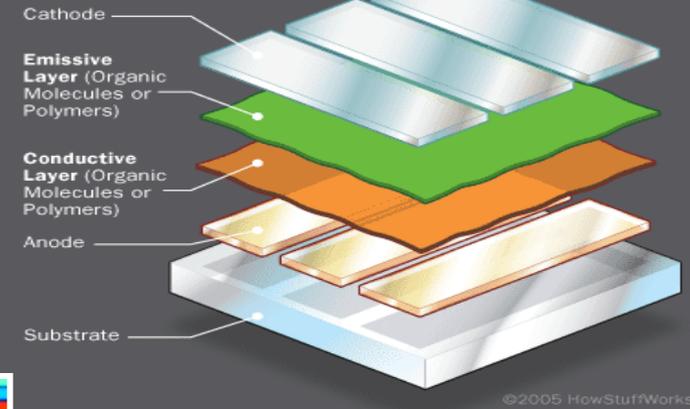
- ampio angolo di visione (quasi 90° dalla normale)
- maggiore brillantezza nei colori
- immediato tempo di risposta
- trasparenti
- a basso consumo
- pieghevoli!



Immagini a confronto: le due sopra mostrano i sub-pixel di uno schermo AMOLED, le due sotto i sub-pixel di uno schermo LCD



OLED Structure



Struttura:

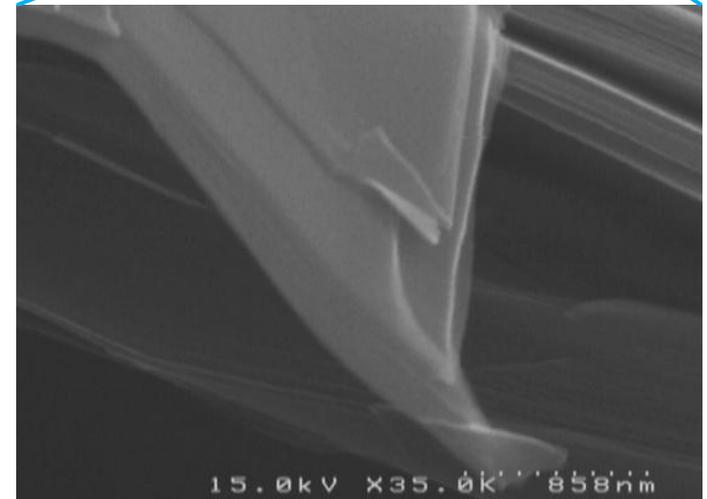
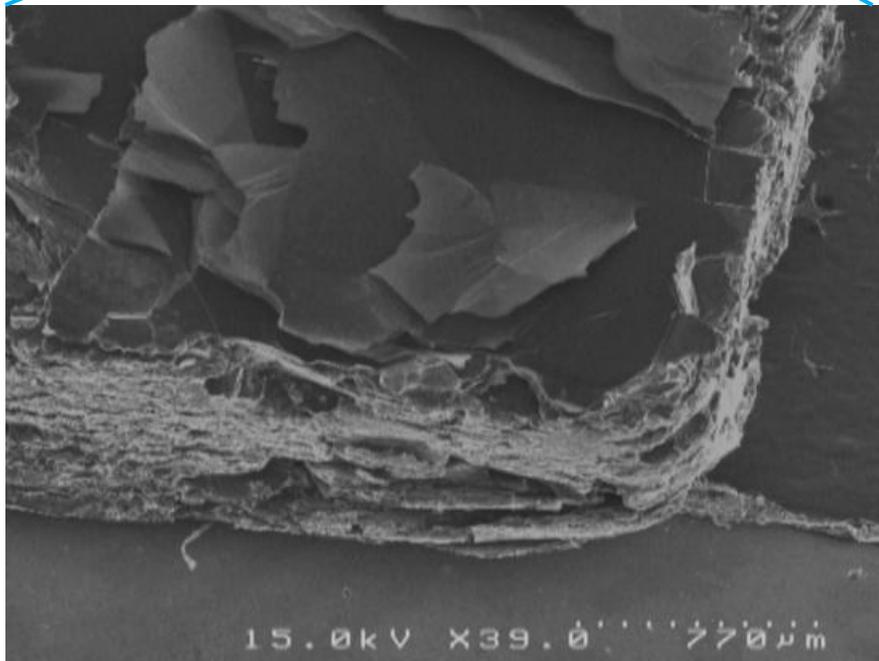
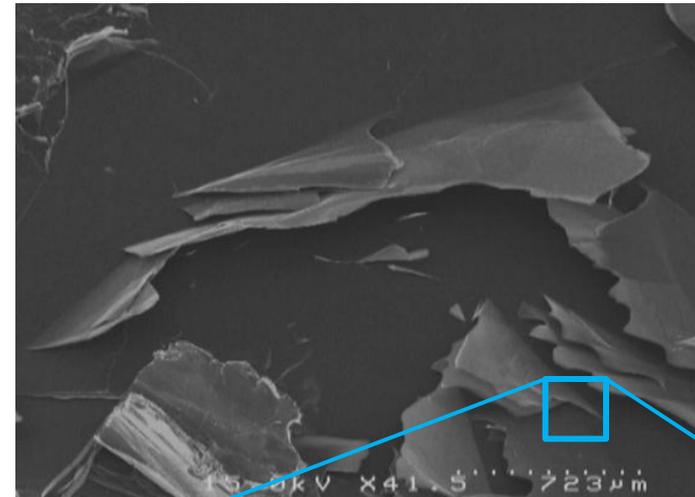
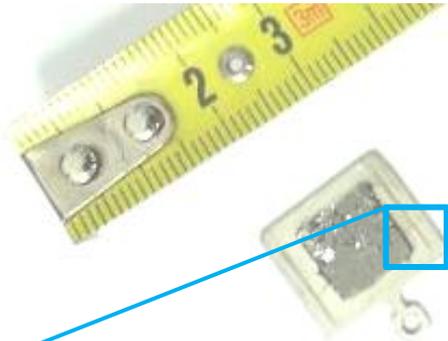
1. Catodo: metallo
2. Layer organico
3. Anodo: semiconduttore
4. substrato

Lo strato organico si comporta come un diodo consentendo il passaggio di corrente in una sola direzione ed emettendo luce propria.

SEM

Fra tutti i campioni che abbiamo osservato, la grafite è il materiale che più si presta a essere studiato con **tutti i tipi di microscopia disponibili**. Tuttavia la microscopia ottica, dato che può fornire informazioni della superficie del campione a livello bidimensionale, **non ci da molte informazioni** sulla struttura del materiale; inoltre, è certamente possibile vedere la grafite al microscopio ottico, tuttavia, essendo tale materiale molto riflettente, le immagini non sempre sono chiare. Per cui, per poter effettuare la nostra indagine, ci affidiamo per lo più alle altre microscopie.

Grafite



Sappiamo che la grafite presenta una struttura stratificata, formata da piani, o layer, dello spessore di un atomo. Gli atomi di un singolo piano sono legati fra loro da legami covalenti, che hanno la caratteristica di essere particolarmente forti, mentre i legami trasversali fra i diversi piani sono dovuti alle forze di Van der Waals, di natura molto più debole.

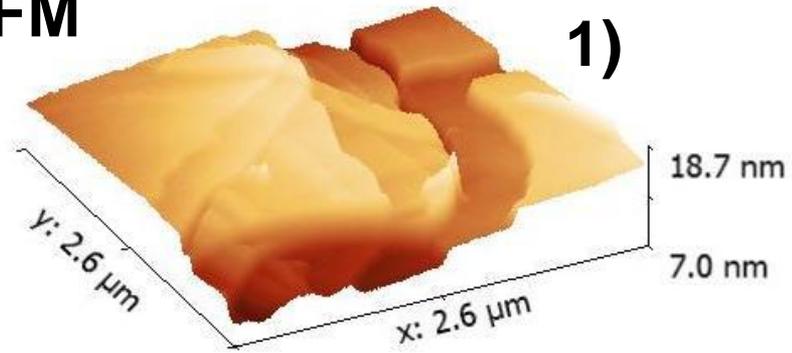
Ciò spiega la caratteristica tecnologica della grafite di essere ridotta in lamine sottili tagliandola lungo i cosiddetti piani di sfaldamento.

Le osservazioni all' AFM sono ancora più dettagliate. Grazie ad esso possiamo avere immagini tridimensionali di porzioni del campione dell'ordine di pochi nanometri. Le immagini mostrano ancora meglio la struttura a livelli della grafite: i piani di colore chiaro sono i layer che si trovano più in alto, mentre i piani più scuri sono i layer più in basso.

L' STM ci permette di vedere le immagini più interessanti e straordinarie; purtroppo è difficile ottenere immagini chiare a causa delle interferenze esterne che compromettono la misura (rumore elettrico, meccanico, etc.).

E' visibile la struttura atomica della superficie della grafite o, più precisamente, le nubi elettroniche degli atomi di carbonio. La colorazione chiaro-scuro, come nell'AFM, è solo una rappresentazione delle altezze dei vari punti dell'immagine: l'immagine ci permette di notare che tra i singoli atomi.

AFM



2)

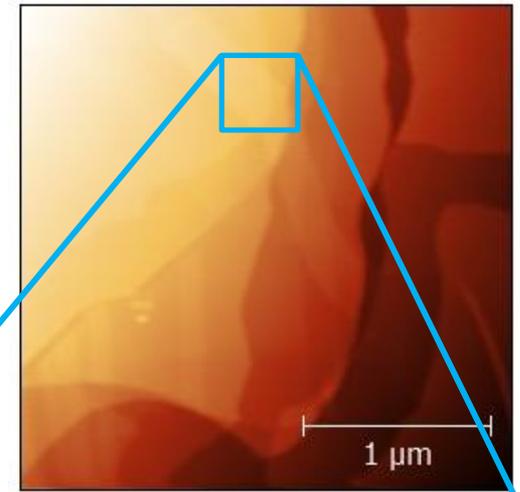
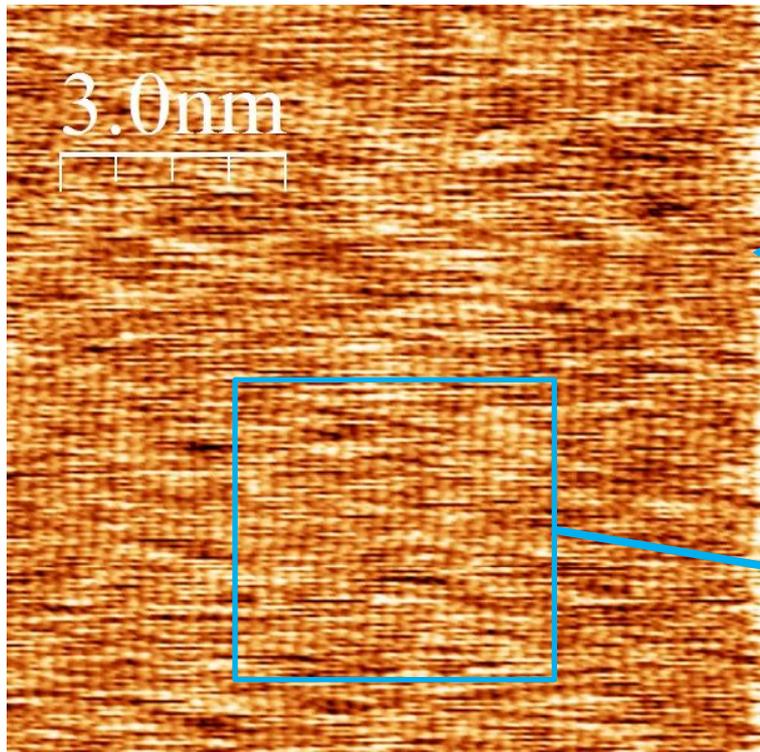


Figura 1 e 2: immagini della grafite all'AFM.



STM

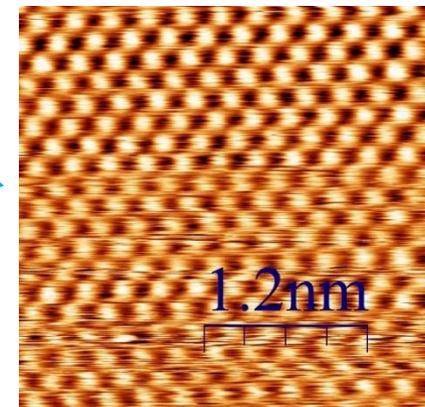
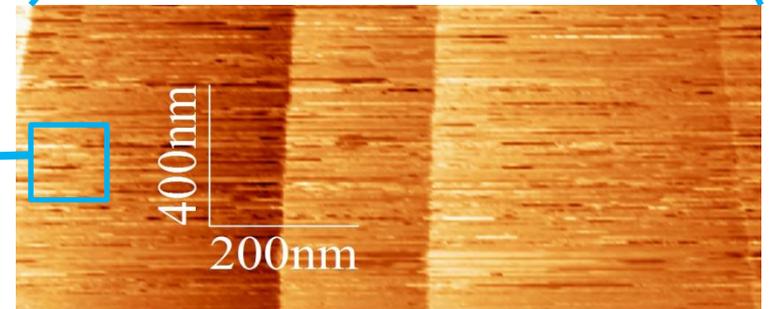


Figure 3, 4, 5: immagini della grafite all'STM con visualizzazione della struttura atomica.