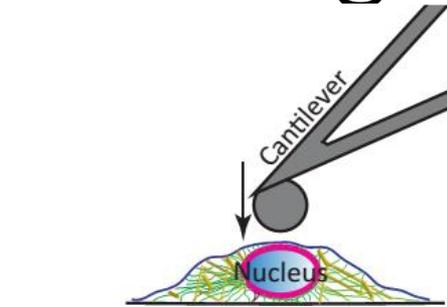
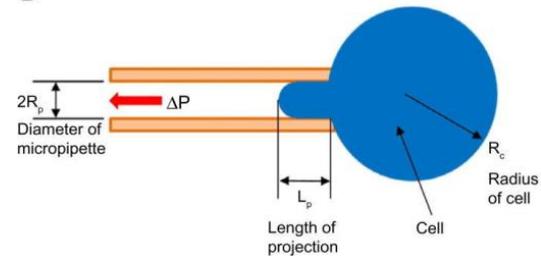


# Principali tecniche di indagine

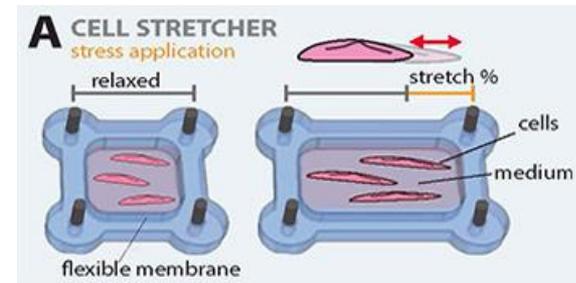
- Microscopio a forza atomica



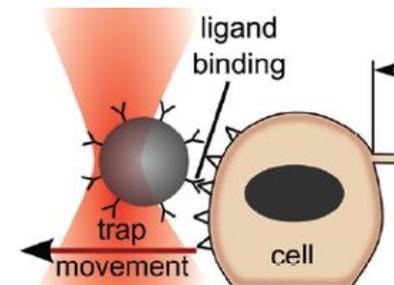
- Micropipette aspiration



- Membrane stretching



- Optical tweezers

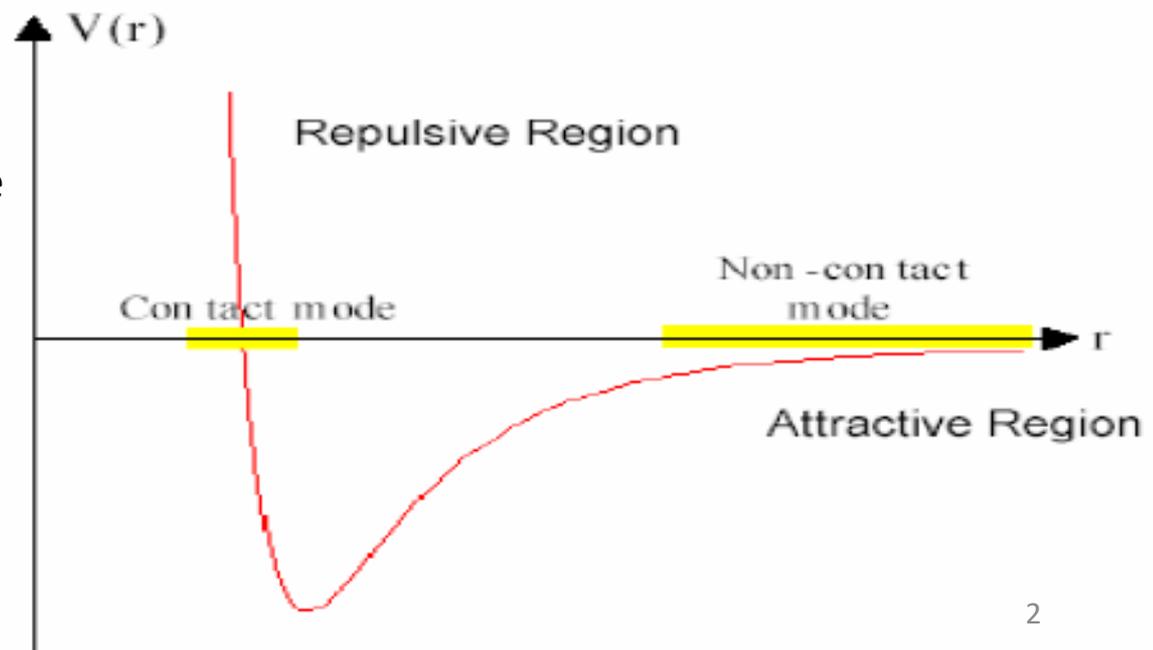


# Microscopio a forza atomica (AFM)

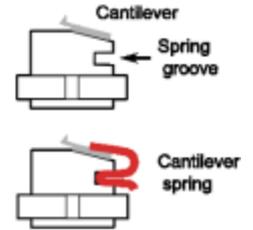
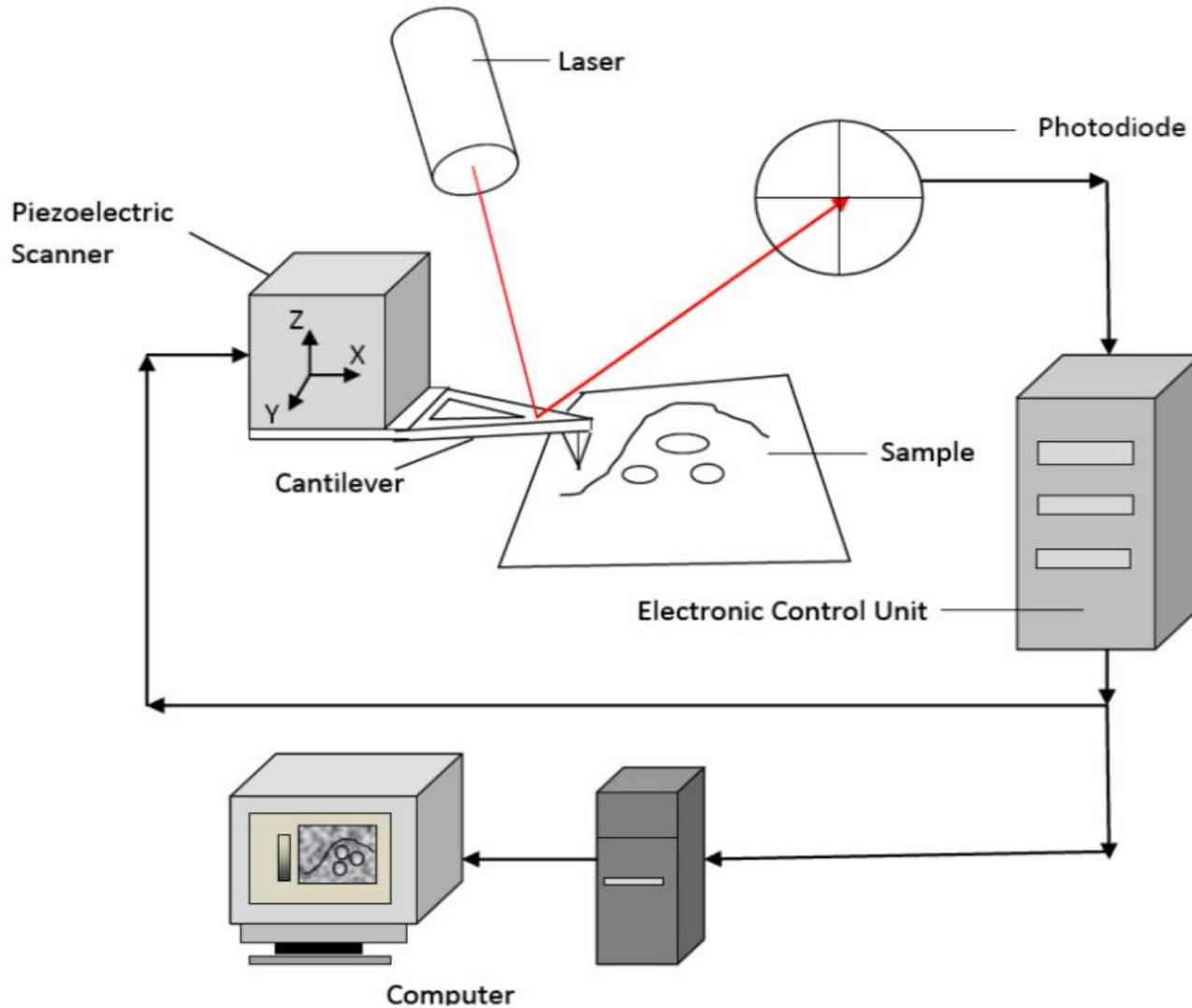
- È un tipo di microscopia a scansione di sonda, permette di caratterizzare il campione (morfologia, proprietà meccaniche) sfruttando l'interazione di una sonda con gli strati atomici superficiali del campione
- Le forze coinvolte nell'interazione punta-campione (dell'ordine di  $10^{-13}$ - $10^{-6}$  N) possono essere:

- Forze di Van der Waals (di dispersione)
- Repulsione ionica
- Forze di attrito
- Forze di adesione
- Forze elettrostatiche
- Forze magnetostatiche

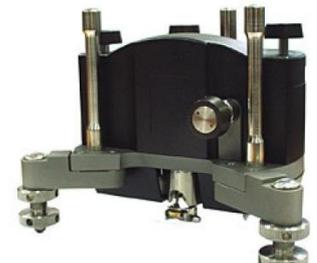
$$U_{LD}(r) = U_0 \left\{ -2 \left( \frac{r_0}{r} \right)^6 + \left( \frac{r_0}{r} \right)^{12} \right\}.$$



# Schema di funzionamento



Quarzo (chip holder)



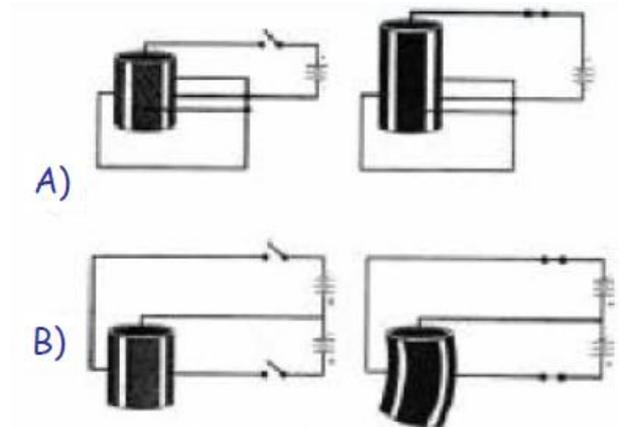
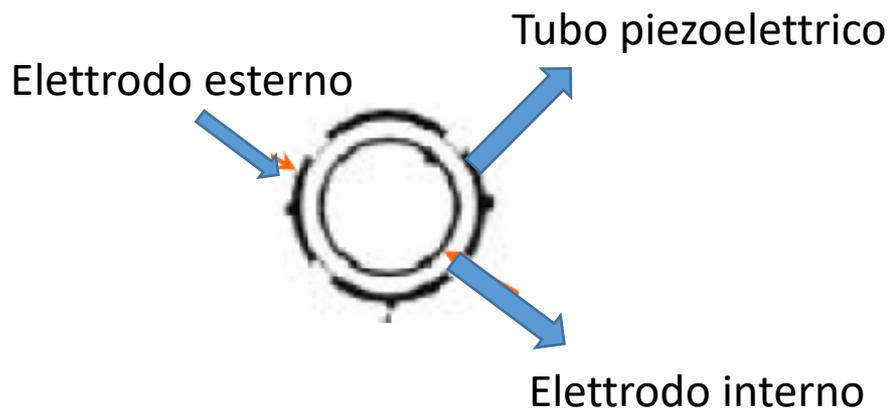
Testa di misura



Base portacampione

# Ceramiche piezoelettriche

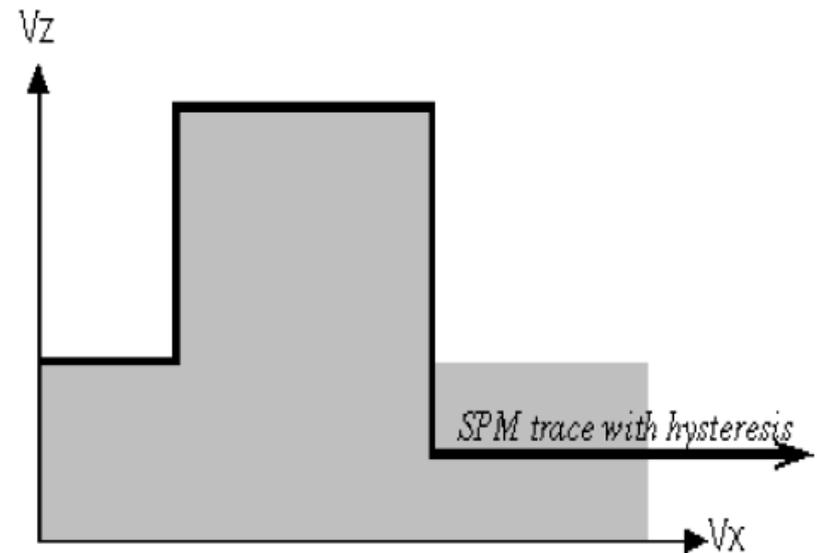
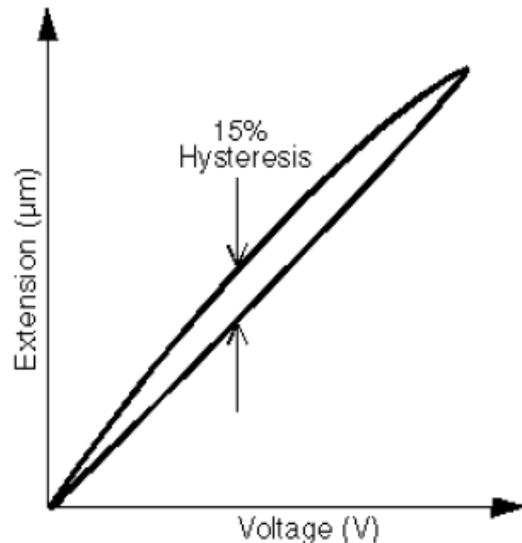
- Le ceramiche piezoelettriche sono una classe di materiali che si espandono o si contraggono in presenza di un gradiente di voltaggio tra un capo e l'altro. Viceversa se subiscono una contrazione o un'espansione generano un gradiente di voltaggio
- Quattro elettrodi sono attaccati alle pareti del tubo piezoelettrico ceramico, applicando un voltaggio ad uno degli elettrodi si stira o allunga il tubo piezoelettrico.
- La testa (o il portacampione, a seconda dei modelli di AFM) è montata sul tubo piezoelettrico per effettuare scansioni nelle 3 dimensioni (area  $\approx 100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ , altezza  $\approx 15 \mu\text{m}$ )



- A) Potenziale applicato tra i quattro elettrodi esterni e quello interno  
B) Potenziale applicato tra due elettrodi esterni e quello interno

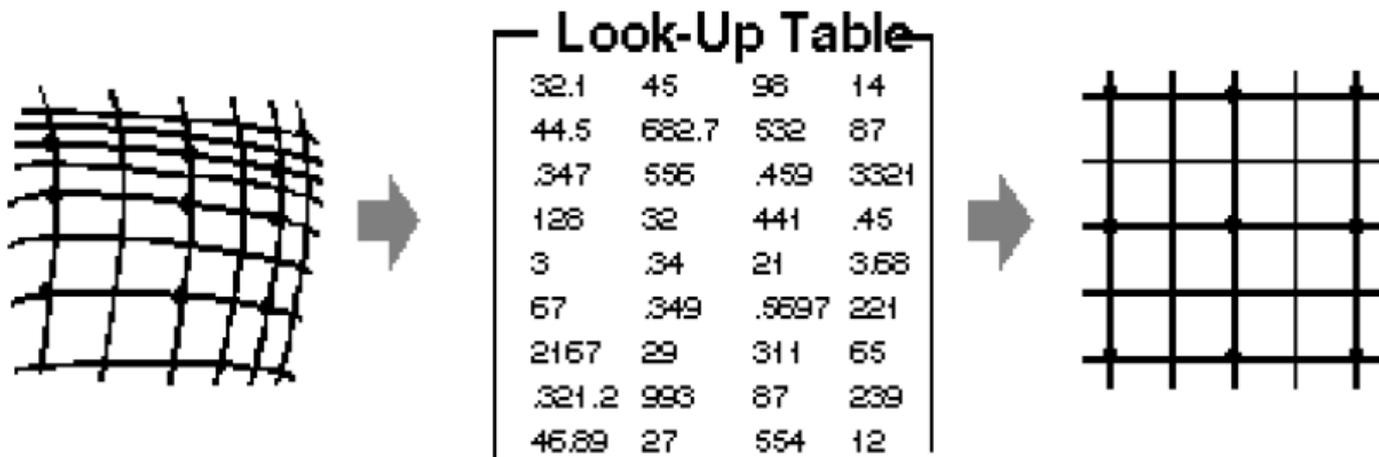
# Isteresi del piezo

- Isteresi può raggiungere il 20 %, in x-y può essere osservata guardando due direzioni opposte di scan
- Sulla z, se l' estensione ha bisogno di più voltaggio  $\Rightarrow$  step errato.



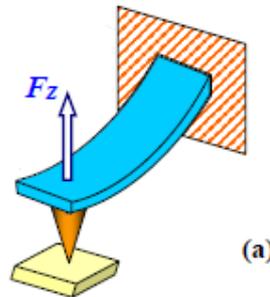
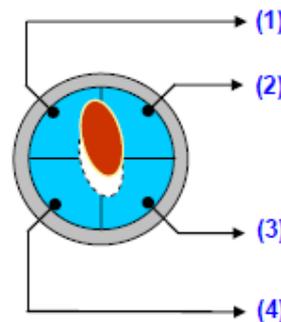
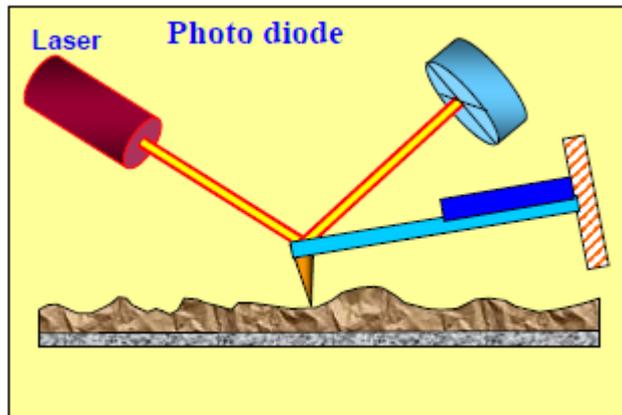
# Calibrazione del piezo

- Attraverso un reticolo di calibrazione si possono correggere i voltaggi; le correzioni sono accurate solo se la scansione è simile a quella di calibrazione. (~10% deviazione)

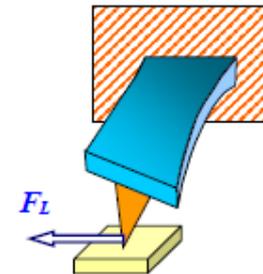
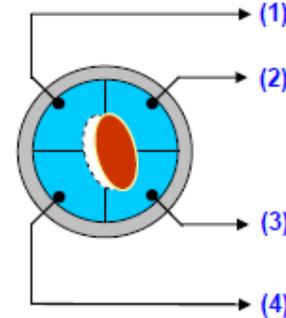


# Fotodiodo a 4 quadranti

- Un laser viene focalizzato sulla leva (cantilever) e da qui riflesso su un fotodiodo a 4 quadranti, che converte in un segnale elettrico la deflessione del cantilever dovuta all'interazione con la superficie
- Il segnale generato è elaborato dall'unità di controllo, che regola la posizione relativa cantilever-campione (a seconda del modo di utilizzo)



(a)



(b)

Deflessione verticale

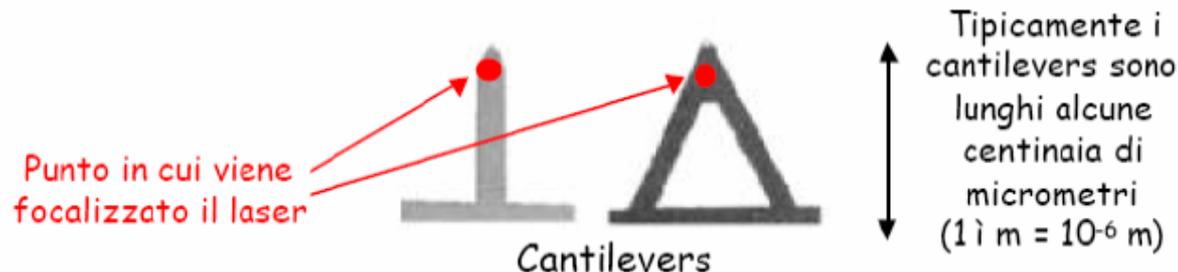
$$\Delta I_z = (\Delta I_1 + \Delta I_2) - (\Delta I_3 + \Delta I_4)$$

Deflessione laterale

$$\Delta I_L = (\Delta I_1 + \Delta I_4) - (\Delta I_2 + \Delta I_3)$$

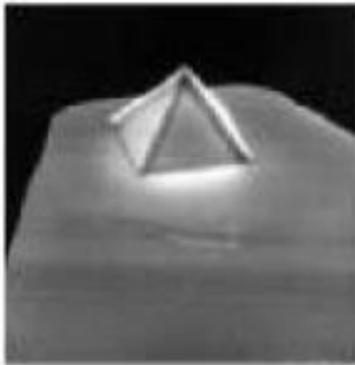
# Cantilevers

- Sono utilizzati come molle,  $F = -k\Delta x$
- Sono solitamente fatti di silicio o di suoi derivati (nitruro, ossido di silicio), ottenuti tramite microfabbricazione con tecniche litografiche e di etching.
- Generalmente hanno forma triangolare o rettangolare
- Possono avere un coating metallico (es. Au) per aumentare la riflessione del laser e/o per permettere la funzionalizzazione del cantilever
- La costante elastica (necessaria per quantificare la forza applicata sul campione) dipende da forma, dimensioni e materiale del cantilever
  - Cantilevers più spessi e corti sono più rigidi ed hanno frequenze di risonanza più alte (range 1-100 kHz)

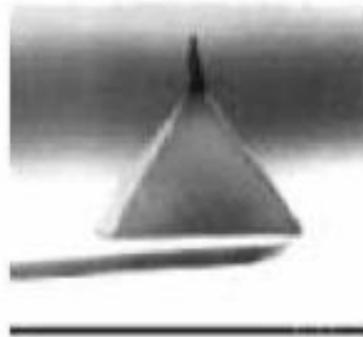


# Punta del cantilever (*probe* o *tip*)

- Rappresenta la parte che effettivamente interagisce con il campione
- Il raggio di curvatura della punta influenza la risoluzione spaziale
- A seconda dell'applicazione, esistono punte di forma e materiale diverso:



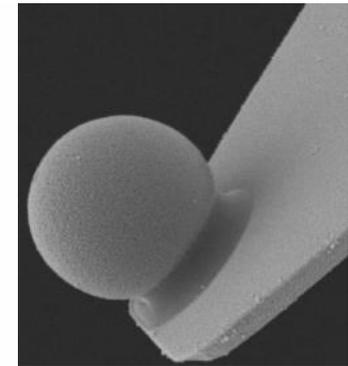
(A)



(B)



(C)



(D)

- A) punta normale, costituita da una piramide schiacciata o un paraboloide, con un raggio di curvatura di circa 30 nm e alte 3-15  $\mu\text{m}$
- B) punta sharp, prodotta mediante bombardamento elettronico di una punta normale. La superpunta è più lunga e sottile di una punta normale ed ha anche un migliore raggio di curvatura
- C) punta ultrasharp: ancora più sottili e lunghe (100  $\mu\text{m}$ ) delle superpunte e possono avere raggi di curvatura fino a  $\sim 10$  nm
- D) punta colloidale: è ottenuta incollando una sfera di dimensioni micrometriche (da 1 fino a 50  $\mu\text{m}$  di diametro) all'apice del cantilever. Le sfere usate comunemente sono d'oro, ossido di silicio o polistirene

# Modi di utilizzo (morfologia)

- Contatto

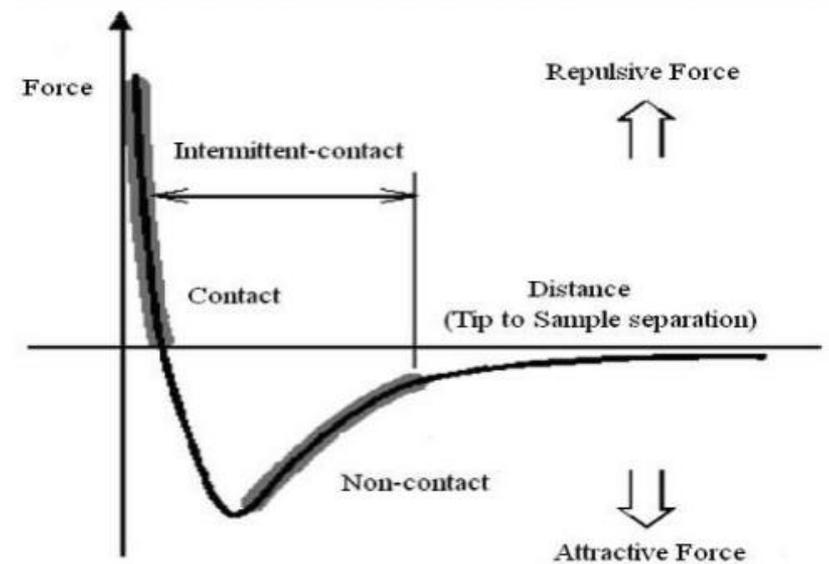
- la punta è mantenuta a distanza inferiore a pochi angstrom dalla superficie del campione e la forza di interazione è di tipo repulsivo.

- Non contatto

- Il cantilever oscilla intorno alla frequenza di risonanza e la punta è mantenuta a distanza (tra 1 e 10 nm) dal campione, risente delle forze di attrazione del campione stesso

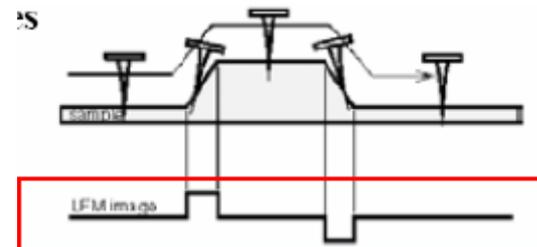
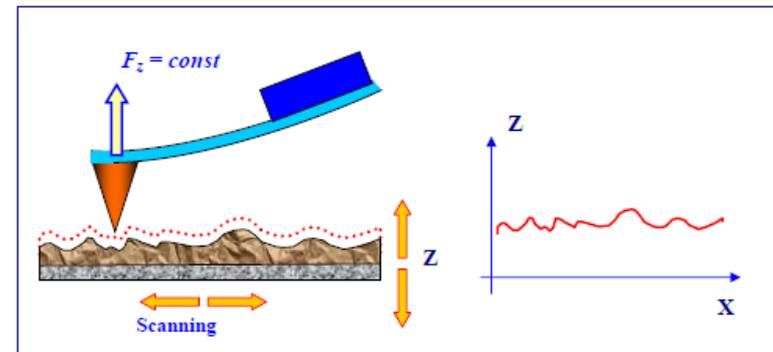
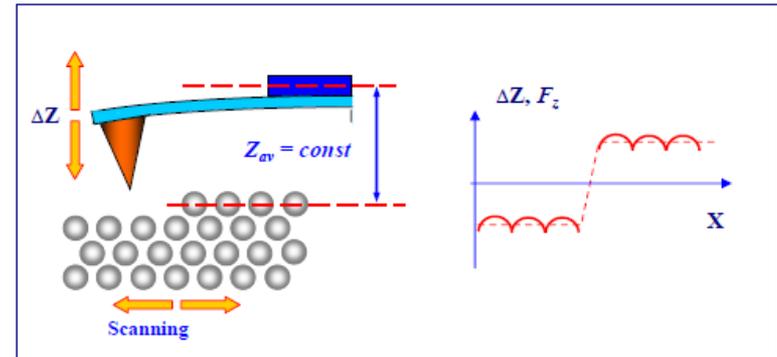
- Contatto intermittente (tapping-mode)

- la leva è fatta oscillare vicino alla frequenza di risonanza e la punta ha contatto transiente con la superficie del campione



# Contact mode

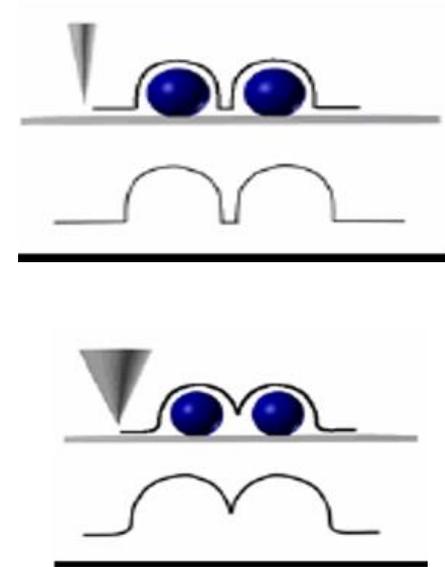
- Esistono 3 modi principali:
  - Altezza costante: è misurata la deflessione della sonda nell'interazione con il campione, mentre la leva si muove ad altezza costante. Utilizzabile con campioni a bassa rugosità (alta probabilità di danneggiamento della punta)
  - Forza costante: è misurata l'altezza necessaria per mantenere costante la deflessione della leva, ossia la forza applicata sul campione
  - Forza laterale (LFM): è determinata dalle forze laterali di attrito che provocano la torsione della punta



# Contact mode

- Vantaggi:

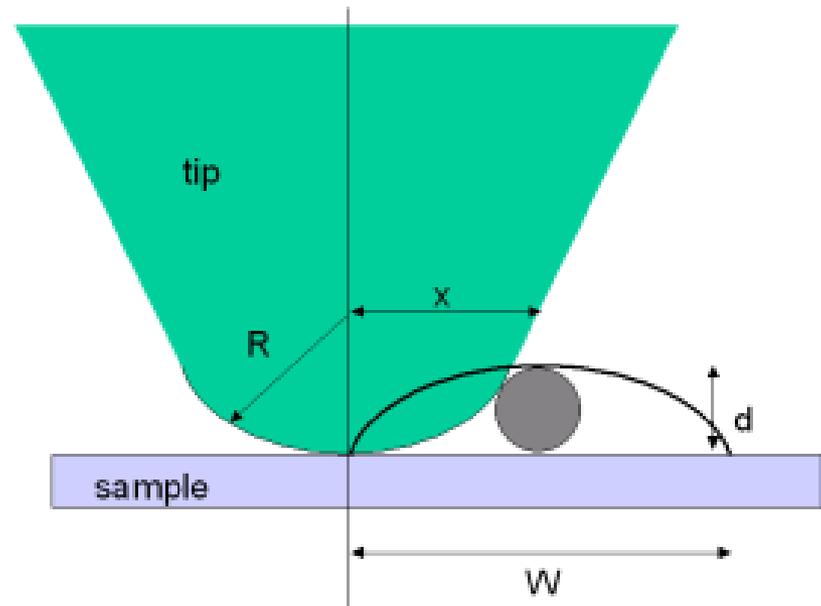
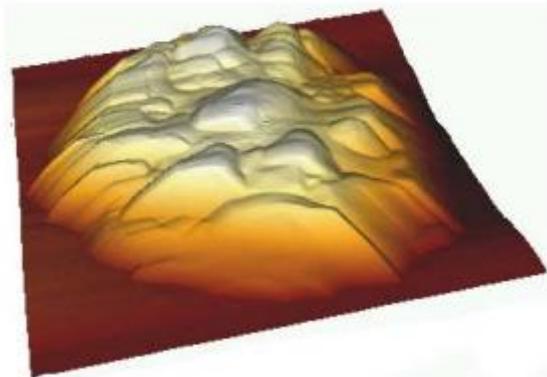
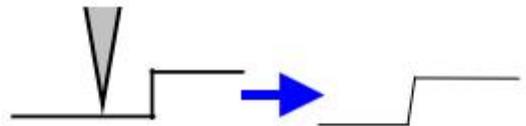
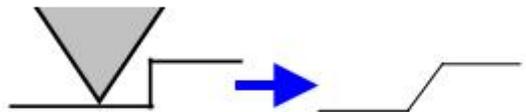
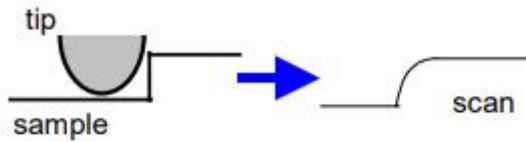
- Alta velocità di scansione
- “risoluzione atomica” (dipendente dal raggio di curvatura della punta)
- facilità di scansione di campioni con molti cambiamenti nella topografia verticale (forza costante)
- può essere applicata in liquido



- Svantaggi:

- Forze laterali possono distorcere l'immagine
- Forze capillari dovute ad uno strato fluido possono causare notevoli impedimenti alla interazione sonda-campione
- La combinazione di queste forze riduce la risoluzione spaziale e può causare danno di campioni più “morbidi” (ad esempio cellule)

# Risoluzione topografica



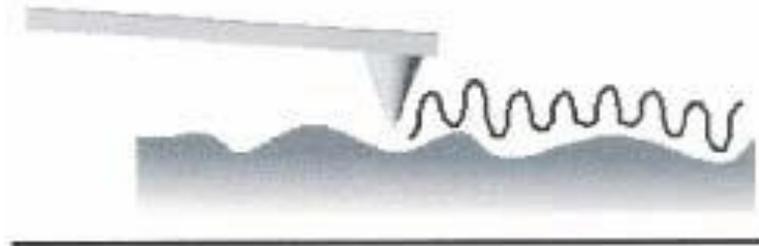
$$x^2 = R^2 - (R - d)^2$$

For  $R \gg d$ ,  $W = \sqrt{8dR}$  and  $d = \frac{W^2}{8R}$

For  $R = 10$  nm and  $d = 5$  nm, the observed width would be  $W = 20$  nm

# Non-contact mode

- Al cantilever viene applicata una piccola oscillazione (1 nm) vicina alla sua frequenza di risonanza
- La distanza punta-campione è di 10-100 Å
- Forze misurate più deboli di quelle misurate in modalità contact
- L'oscillazione del cantilever dipende dalla frequenza e dalla forza di attuazione, dalla costante elastica e dalle forze di interazione con il campione
- Le informazioni topografiche sono ottenute dai cambiamenti in ampiezza e/o fase delle oscillazioni della punta.
- Viene quindi fissato un valore di ampiezza di oscillazione  $A$  e il sistema di controllo agisce sulla distanza dal campione per mantenere  $A = \text{cost}$

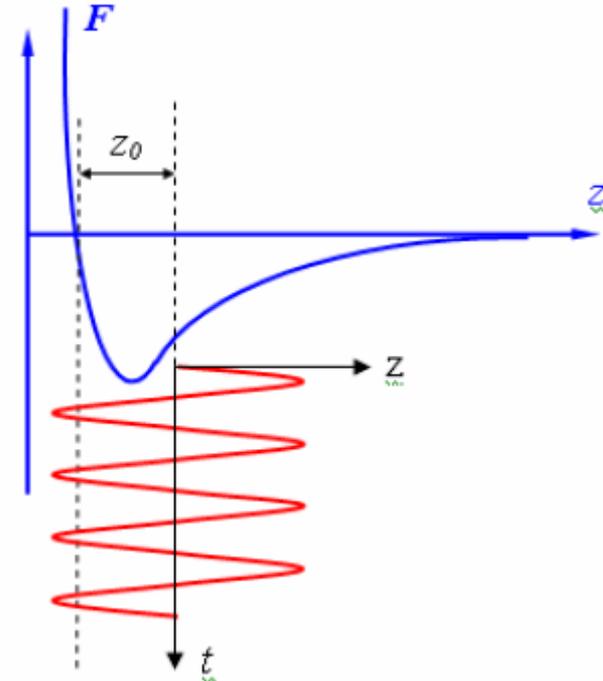


# Non-contact mode

- Vantaggi:
  - Sulla superficie del campione è esercitata una debole forza e non è recato danno ai campioni più “morbidi”
  - Ideale per lo studio di materiali rigidi
  - Vengono eliminate le forze di attrito
- Svantaggi:
  - Bassa risoluzione laterale, limitata dalla separazione punta-campione
  - Velocità di scansione più bassa per ridurre l'effetto dello strato fluido presente sul campione
  - Solitamente applicabile a campioni estremamente idrofobici, ricoperti da un minimo strato fluido
  - Difficilmente applicabile in liquido

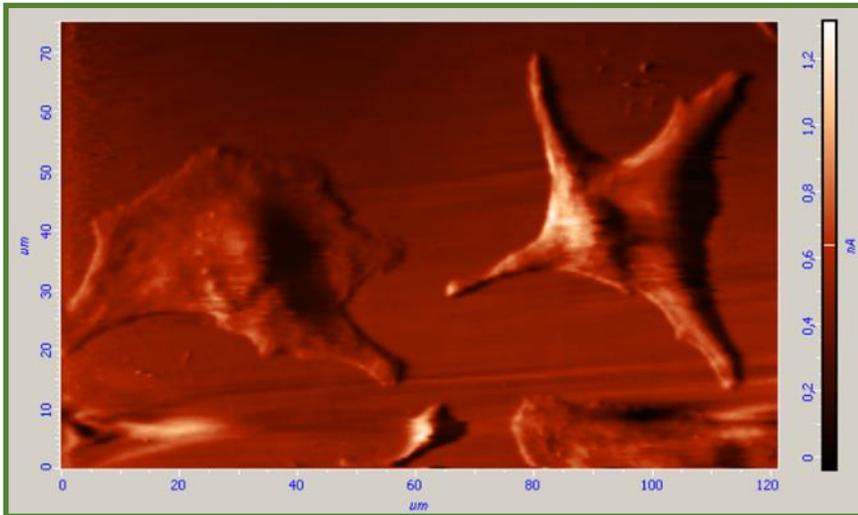
# Tapping mode

- Modalità complementare fra Contact AFM e Non-Contact AFM
- La punta oscilla entrando anche in contatto con la superficie del campione
- L'interazione con il campione (forza di attrazione/repulsione + forza di contatto) determina la variazione di ampiezza/fase dell'oscillazione
- Come per il non-contact, viene regolata la distanza dal campione per mantenere  $A = \text{cost.}$
- Vantaggi:
  - Elevata risoluzione laterale (1 nm to 5 nm).
  - Bassa forza di interazione e minore danno a campioni "morbidi" in aria.
  - Assenza di forze laterali
- Svantaggi:
  - Velocità di scansione più bassa rispetto al contact mode
  - Difficile da operare in liquido

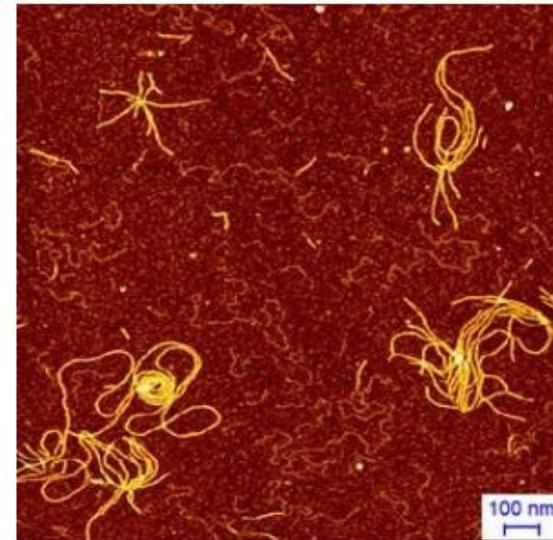


# Alcuni esempi di topografia con AFM

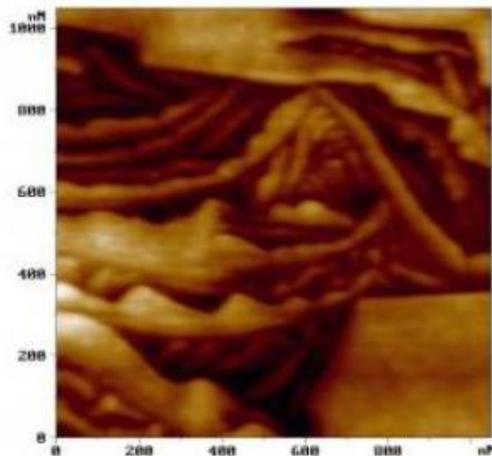
Cardiomiociti (in contatto in liquido)



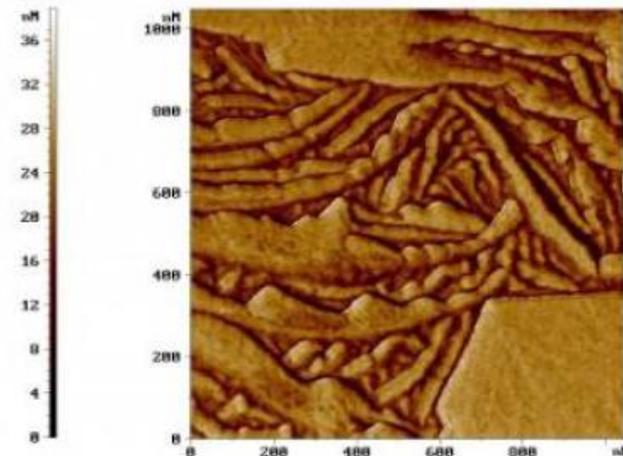
Fibrille proteiche (non contatto in aria)



Film di polietilene in tapping mode, topografia (a) vs contrasto di fase (b)



(a)



(b)

# Come scegliere il cantilever?

## HOW TO CHOOSE BY



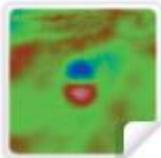
### AFM TECHNIQUE

Tapping Mode  
Contact Mode  
Noncontact Mode  
Lift Mode



### TYPE OF SAMPLE

Robust  
Soft or Fragile



### AFM EXPERIMENT

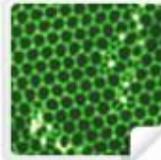
Topography  
Composition  
Mechanical  
Electric  
Magnetic



### RESOLUTION

High Resolution  
General Purpose  
Long Scanning

## APPLICATIONS



### LIFE SCIENCE

Bacteria Cell  
Potato-X Virus  
Fibrin Strand  
DNA



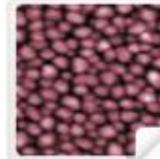
### CHEMISTRY

Molecular Wires  
Latex



### POLYMERS

Single Molecules  
Molecular Brushes  
Polyethylene Crystal  
Liquid Crystalline



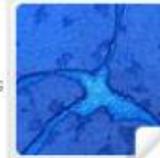
### METROLOGY

Roughness of Si Wafer  
Critical Dimension



### HETEROGENEOUS SYSTEMS

Impact Modified Plastics  
Technical Rubber  
PS-b-PMMA Copolymer



### SURFACE SCIENCE

Nanolithography on Ti  
Langmuir Monolayer  
Self-Assemblies



### MATERIALS RESEARCH

Au (111)  
BaTiO3 Piezoceramics  
Alkanes



### DATA STORAGE

Hard Disk  
3.5" Zip Disk  
Optical Disk

# Come scegliere il cantilever?

- Cantilever:
  - Per le misure in contatto, cantilever con bassa  $k$  (0.06-0.3 N/m) per non danneggiare il campione (soprattutto se morbido)
  - Per non contatto o per tapping mode di materiali rigidi, alta frequenza di risonanza ( $\approx 300$  kHz) e alta  $k$  ( $\approx 40-45$  N/m)
  - Per tapping mode di materiali soffici,  $f_r \approx 100$  kHz,  $k = 2-7$  N/m
- Sonde:
  - Punte sharp/ultrasharp: ottima risoluzione topografica, misure meccaniche di comparti subcellulari; estremamente delicate (sporco, elettrostaticità...)
  - Punte smussate/sferiche: minore risoluzione, misure meccaniche «mediate»

# Spettroscopia di forza

- La punta viene utilizzata per indentare il campione, registrando la curva di andata (approach, forward) e di ritorno (withdraw, backward) a velocità controllata (1-10  $\mu\text{m/s}$ ).
- È utilizzata per la caratterizzazione meccanica del campione
- Indentando il campione in più punti (mapping) è possibile avere informazioni sia morfologiche che meccaniche dell'area
- Il segnale elettrico registrato dal fotodiodo è convertito in forza mediante calibrazione del sistema ottico (cantilever+laser+fotodiodo) e della costante elastica del cantilever

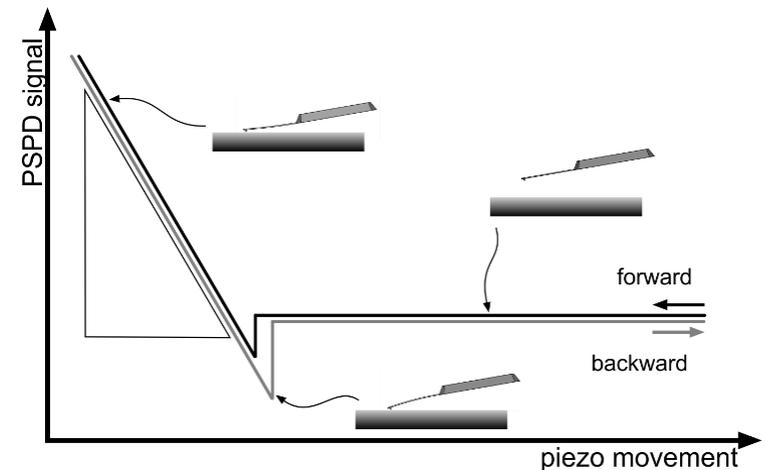
$$F = k \cdot s \cdot \Delta V$$

F = forza misurata [N]

k = costante elastica del cantilever [N/m]

s = sensibilità del sistema ottico, misurata su un substrato rigido (es. vetro) [m/V]

$\Delta V$  = segnale dal fotodiodo (es. voltaggio) [V]



# Determinazione della k

- Metodo termico:

- Si basa sul teorema dell'equipartizione, che lega la costante elastica con l'energia termica del cantilever (vibrazioni termiche a temperatura ambiente)

$$\frac{1}{2}k\langle z^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T$$

k : spring constant

$k_B$  : Boltzmann constant

T : absolute temperature

$\langle z^2 \rangle$ : mean square displacement

- La relazione è corretta con un fattore dipendente dalla geometria e dal modo di vibrazione del cantilever. Ad esempio, per cantilever rettangolari nel primo modo di oscillazione

$$k = 0.971k_B T / \langle z^2 \rangle$$

- Questo metodo ha un errore di circa l'11%, ma con opportune calibrazioni con campioni normati, l'errore può scendere al 2%

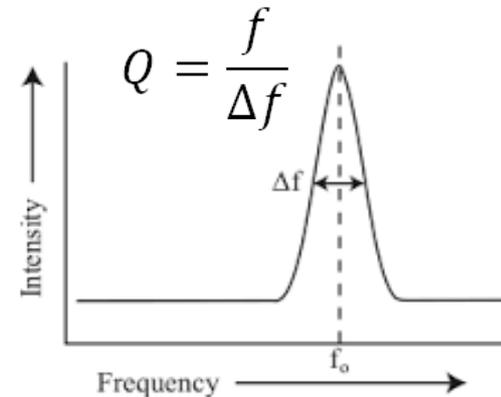
# Determinazione della k

- Metodo di Sader:

- Si basa sulla geometria del cantilever, sulla sua frequenza di risonanza e sul fattore di qualità Q
- È valida nelle seguenti ipotesi:
  - Lunghezza  $\gg$  larghezza  $\gg$  spessore
  - $Q \gg 1$  (valida in aria o in vuoto)
- Ad esempio, per un cantilever rettangolare:

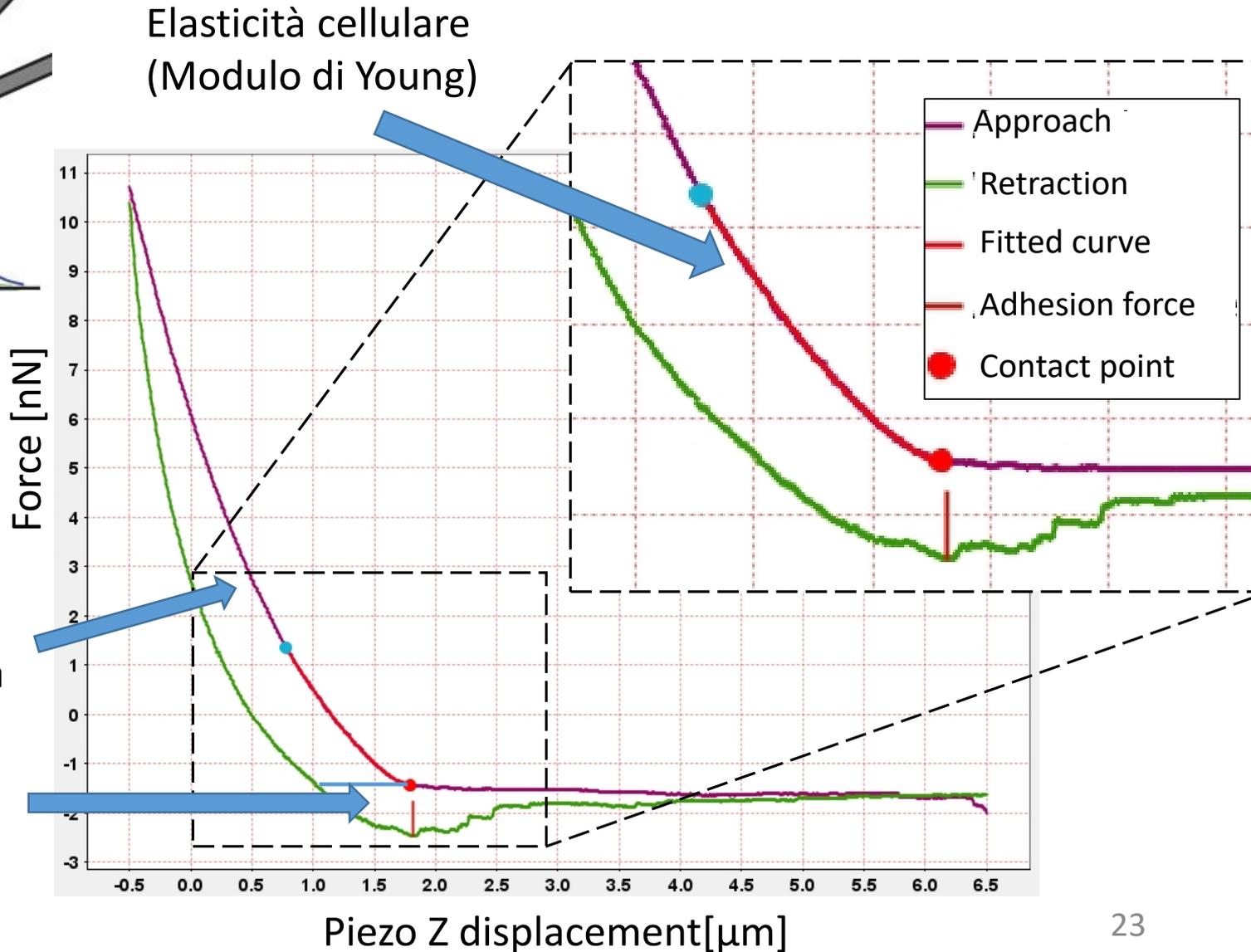
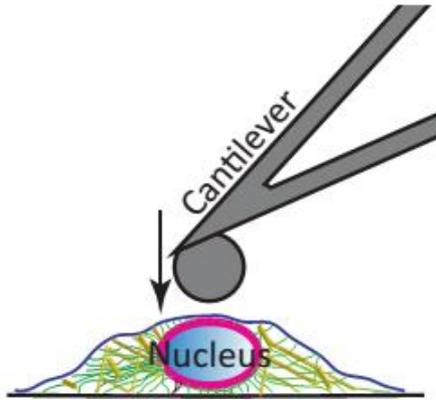
$$k_z = 0.1906 \rho b^2 L Q_f \omega_f^2 \Gamma_i^f(\omega_f)$$

- Permette analogamente di calcolare la k torsionale (determinazione della forza laterale)
- L'errore nella stima della k è  $\approx 25\%$



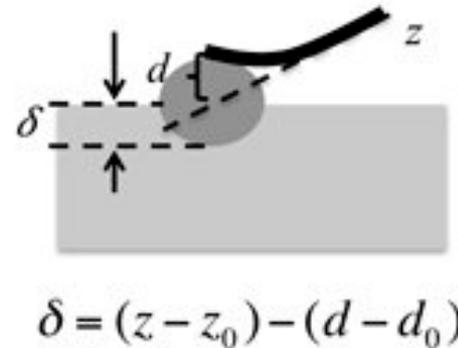
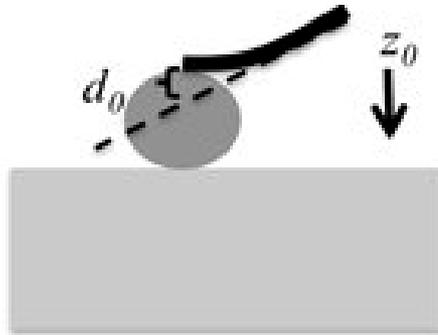
$\rho$  = densità del fluido  
 $b$  = larghezza del cantilever  
 $L$  = lunghezza del cantilever  
 $Q$  = fattore di qualità  
 $\omega$  = frequenza di risonanza  
 $\Gamma$  = funzione idrodinamica, **anch'essa dipendente dalla geometria**

# Single cell force spectroscopy (SCFS)



# Determinazione dell'elasticità cellulare

- La curva di forza-spostamento in Z del piezo ( $\Delta z$ ) viene convertita in forza-posizione (verticale) della punta, ottenuta sottraendo a  $\Delta z$  la deflessione della punta dovuta alla forza esercitata sul campione:



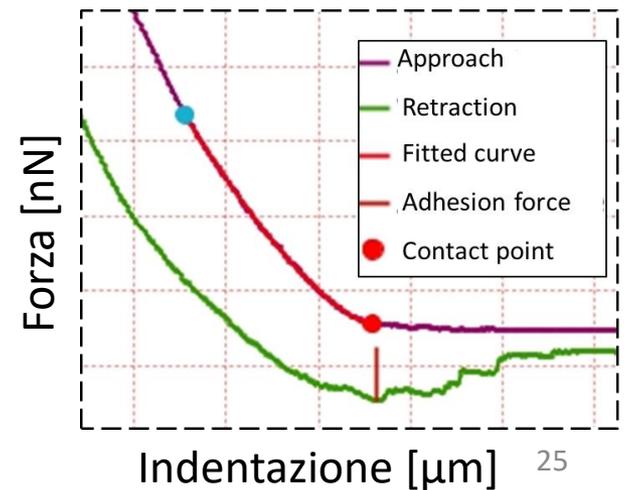
$$\text{tip position} = (z - z_0) - (d - d_0)$$

$z$  = posizione effettiva del piezo  
 $z_0$  = posizione iniziale del piezo  
 $d$  = deflessione effettiva del cantilever  
 $d_0$  = deflessione del cantilever a  $z_0$

- A partire dal punto di contatto, la posizione della tip determina l'**indentazione** del campione,  $\delta$

# Determinazione dell'elasticità cellulare

- Un fitting tra la curva forza-deformazione ed uno specifico modello dipendente dalla forma della tip permette di ricavare il modulo di Young (E) che descrive l'elasticità della cellula
- Tali modelli si basano sull'approssimazione che il campione abbia un comportamento **elastico lineare** (riconosciuta come valida fino al 10% di indentazione), sia omogeneo e di spessore infinito (...)
- Esistono software che determinano il punto di contatto e il modulo di Young, minimizzando una funzione di errore tra curva sperimentale e:
  - il modello scelto per  $\delta > 0$
  - una funzione lineare o polinomiale per  $\delta < 0$



# Esempi di modelli per il calcolo di E

- **Punte sferiche:**

- Modello di Hertz: è accurato quando il raggio di contatto tra punta e campione è  $\ll$  del raggio della sfera, ossia  $\sqrt{R\delta} \ll R$ :

$$P = \frac{4E}{3(1-\nu^2)} \sqrt{R} \delta^{\frac{3}{2}}$$

- Modello di Hertz-Sneddon: è una modifica del modello precedente, valido anch'esso per punte sferiche, ma non richiede la condizione  $\sqrt{R\delta} \ll R$ :

$$P = \frac{E}{(1-\nu^2)} \left( \frac{R^2 + a^2}{2} \text{Log} \left( \frac{R+a}{R-a} \right) - aR \right)$$

$$\delta = \frac{a}{2} \text{Log} \left( \frac{R+a}{R-a} \right)$$

- **Punta conica (Harding-Sneddon):**

$$P = \frac{2E \text{Tan}[\theta]}{\pi(1-\nu^2)} \delta^2$$

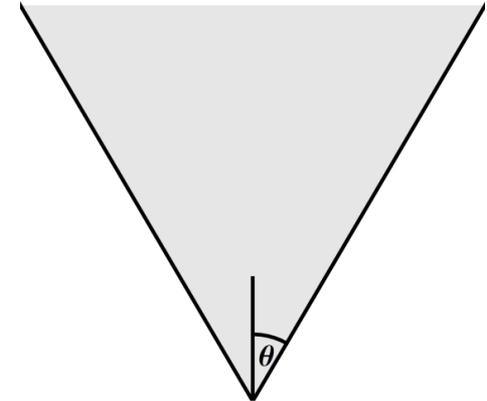
- **Punta piramidale (Bilodeau):**

$$P = \frac{1.4906 E \text{Tan}[\theta]}{2(1-\nu^2)} \delta^2$$

# Esempi di modelli per il calcolo di E

nelle formule precedenti:

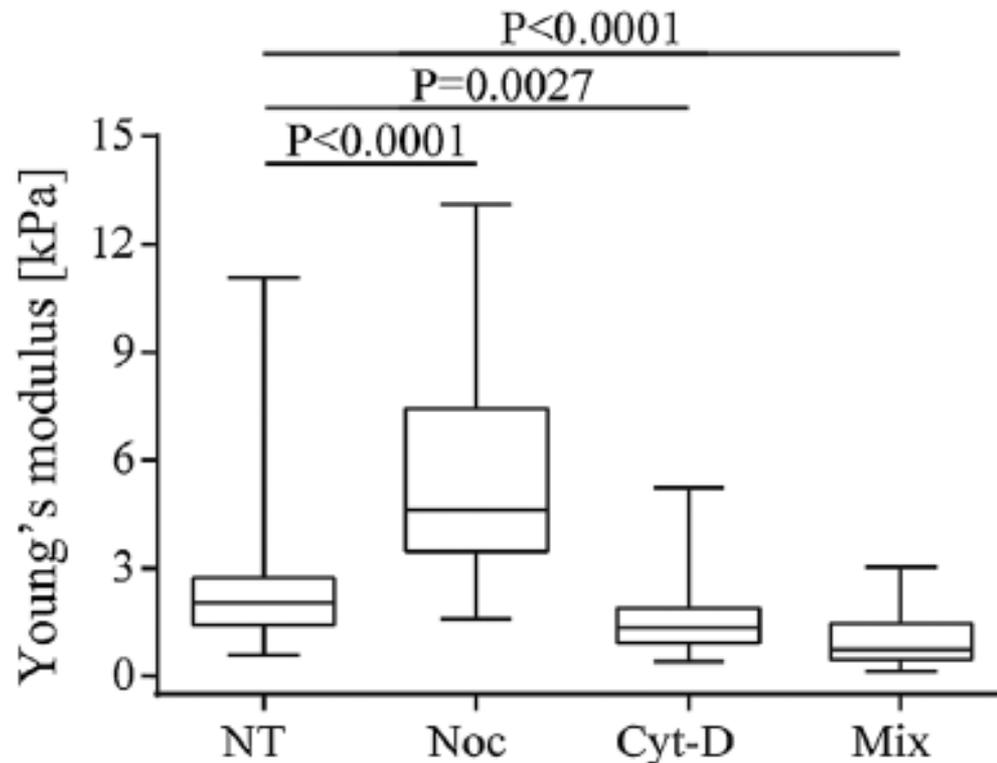
- $P$  = forza misurata
- $R$  = raggio della punta (sfera)
- $a$  = raggio di contatto sfera-campione
- $\theta$  = semi-angolo di apertura (cono o piramide)
- $\delta$  = indentazione
- $E$  = modulo di Young
- $\nu$  = coefficiente di Poisson



- Il coefficiente di Poisson è comunemente preso = 0.5, trattando la cellula come «incomprimibile»
- Diversi studi hanno stimato il valore di  $\nu$  per le cellule, ma esso è valido a rigore solo per la linea cellulare considerata

# Esempio di misure di elasticità

- Effetto del trattamento di depolimerizzazione chimica di microfilamenti di actina (con citocalasina-D) e/o di microtubuli (con nocodazolo) su cellule HeLa



Box plots relative to cell stiffness of HeLa cells after different chemical treatments: NT = Not Treated, Noc = Nocodazole (10  $\mu$ M), Cyt-D = Cytochalasin-D (5  $\mu$ M), Mix = Mixture 1:1 of nocodazole and cytochalasin-D.