

Corso di

Chimica delle Macromolecole I

Prof. R. URBANI

**Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche
a.a. 2021-2022**

**AFM : Atomic Force Microscopy
Microscopia a forza atomica**



Studi Morfologici e Topologici (SHAPE & SIZE)

La microscopia di forza atomica (AFM: Atomic Force Microscopy) è una delle numerose possibilità che offre la microscopia che utilizza sonde di prossimità a scansione.

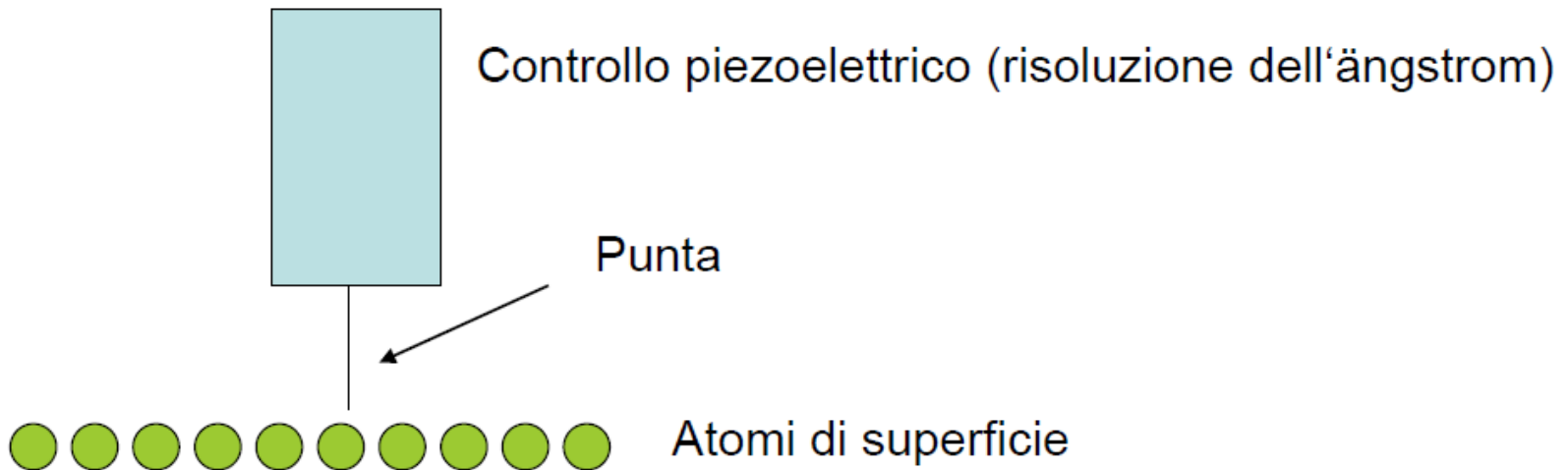
Tutte queste tecniche funzionano mediante la misura di proprietà locali (altezza, assorbimento di radiazione, magnetismo) attraverso una sonda o “punta” sistemata molto vicino al campione.

La piccola distanza che c'è tra campione e sonda (dell'ordine della risoluzione strumentale) rende possibile eseguire la misura su un'area molto piccola che viene sistematicamente esplorata dalla sonda contemporaneamente alla misura della proprietà fisica in studio.

Contrariamente ai microscopi tradizionali, i sistemi con sonde a scansione non utilizzano generalmente lenti e quindi la risoluzione è limitata più dalle dimensioni del campione che dagli effetti di diffrazione.

Attraverso l'AFM si può non solo ottenere un'immagine (o meglio una mappa delle proprietà in studio) della superficie a risoluzione atomica, ma anche misurare la forza tra superficie e sonda a livello di nano-newton.

Tecniche di scanning probe (SPM) (sonda a scansione)



Principio generale: Un sonda viene passata sul campione registrando un segnale (come la corrente)

La dimensione della porzione della sonda che si utilizza nella analisi (l'apice della punta) è di circa **10 nanometri**.

La distanza tipica tra punta e campione negli SPM è circa **0.1 – 10 nm**.

I diversi tipi di SPM sfruttano diversi tipi di interazione tra punta e campione. Per esempio l'STM si basa sul fenomeno della corrente di tunnel tra una punta metallica e un campione conduttore; e su diversi tipi di forza si basa il funzionamento dei microscopi a forza atomica, a forza magnetica e a forza elettrica.

Qui prendiamo in considerazione le caratteristiche comuni ai vari tipi di microscopi a scansione, supponendo che l'interazione punta campione sia descritta da un generico parametro P .

Se esiste una dipendenza univoca, e abbastanza ripida, $P = P(z)$ di tale parametro dalla distanza z tra punta e superficie del campione allora P può essere usato nel sistema di retroazione (FS) che controlla la distanza punta-campione. Un diagramma a blocchi del sistema di retroazione in un SPM è schematizzato in Fig. 1.

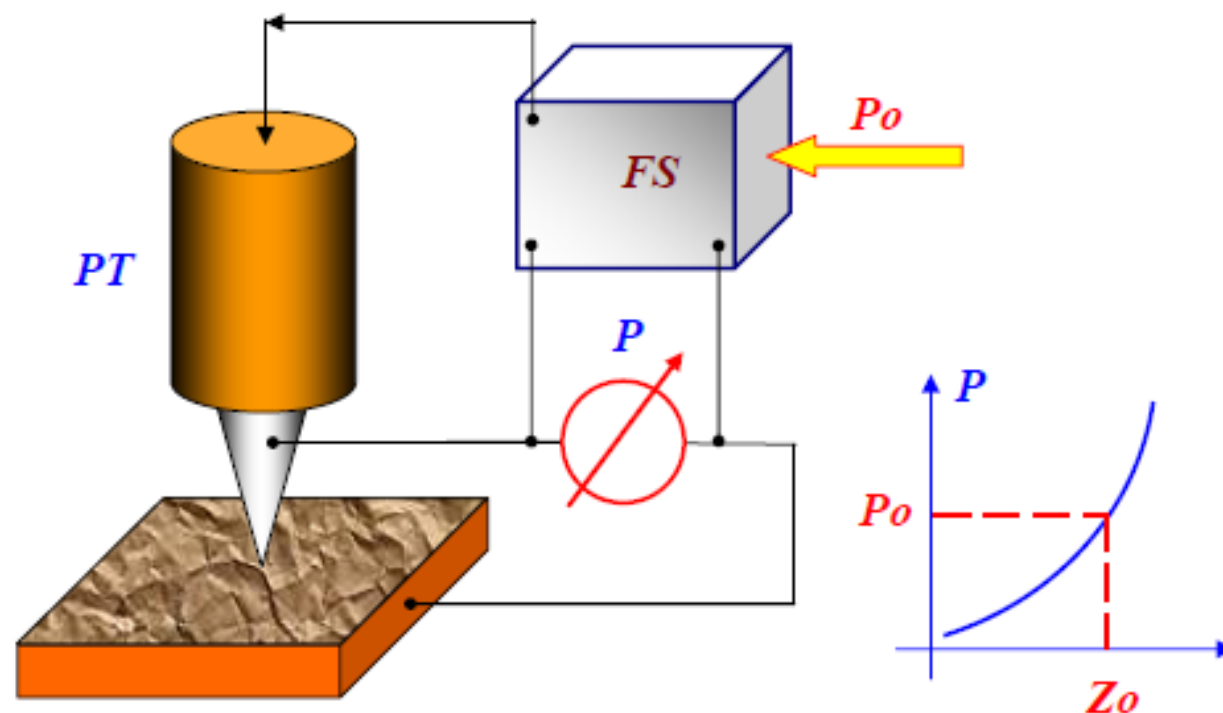


Fig. 1. Diagramma a blocchi del sistema di retroazione in un SPM

L'immagine topografica della superficie può essere ottenuta in due modi:

a corrente costante, illustrato in Fig. 42 (a), la punta si muove sopra la superficie mentre il sistema di retroazione (FS) mantiene costante la distanza punta-campione ed il segnale $Z=f(x,y)$ fornito all'elettrodo Z del piezoelettrico viene memorizzato, ed in seguito visualizzato come topografia.

ad altezza costante ($Z = \text{cost}$), risulta più efficace nell'analizzare superfici straordinariamente piatte. In questo caso la punta si muove sopra la superficie ad una distanza di alcuni Angstrom, e si memorizza il segnale di corrente $I=f(x,y)$ come immagine STM (Fig. 42 (b)).

Questa modalità di acquisizione permette altissime velocità di scansione consentendo di osservare cambiamenti della superficie praticamente in tempo reale.

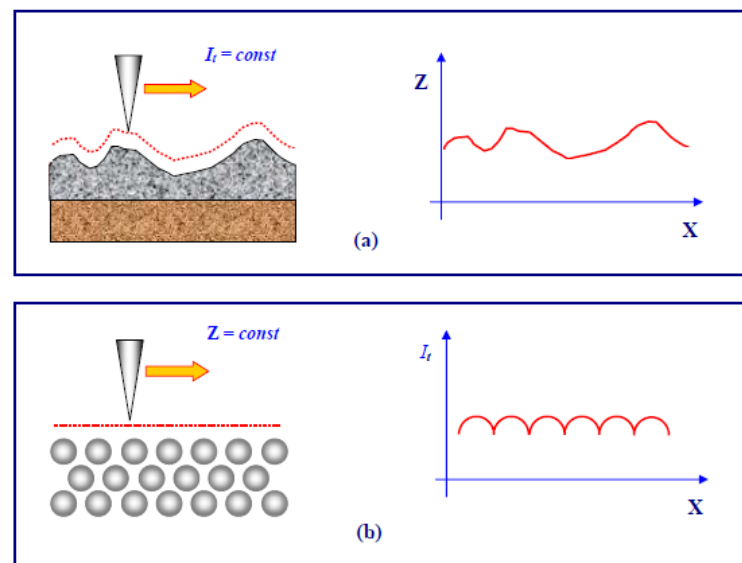


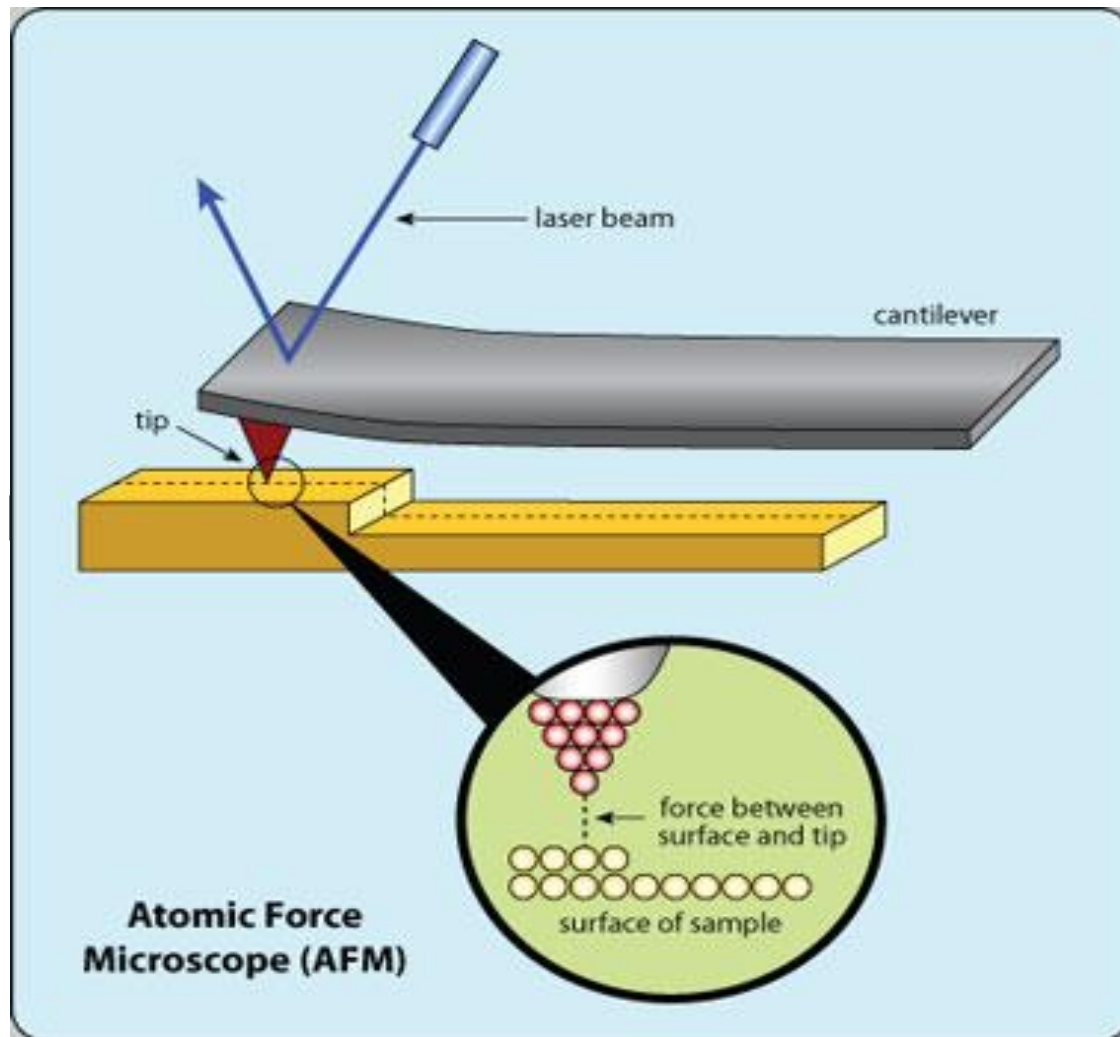
Fig. 42. Formazione delle immagini STM nel modo a corrente costante (a) e nel modo a distanza media costante (b)

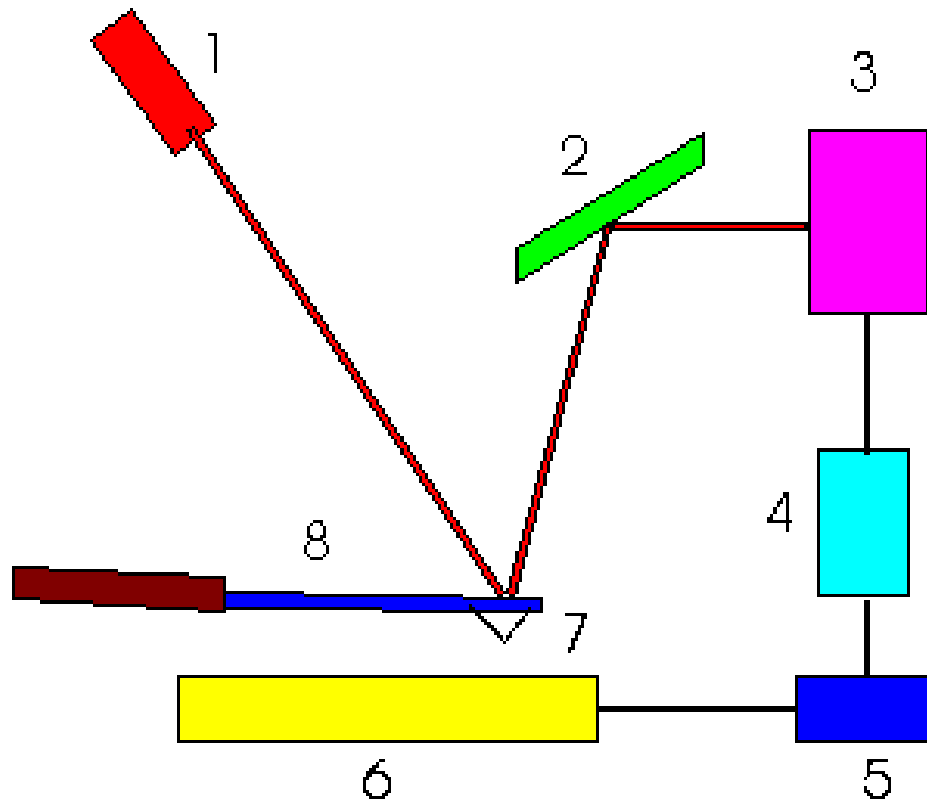
Tipi di tecniche di sonda a scansione (SPM)

- Microscopia tunnelling a scansione (STM)
- Microscopia a forza atomica (AFM)
- Microscopia di campo a scansione (SNOM)

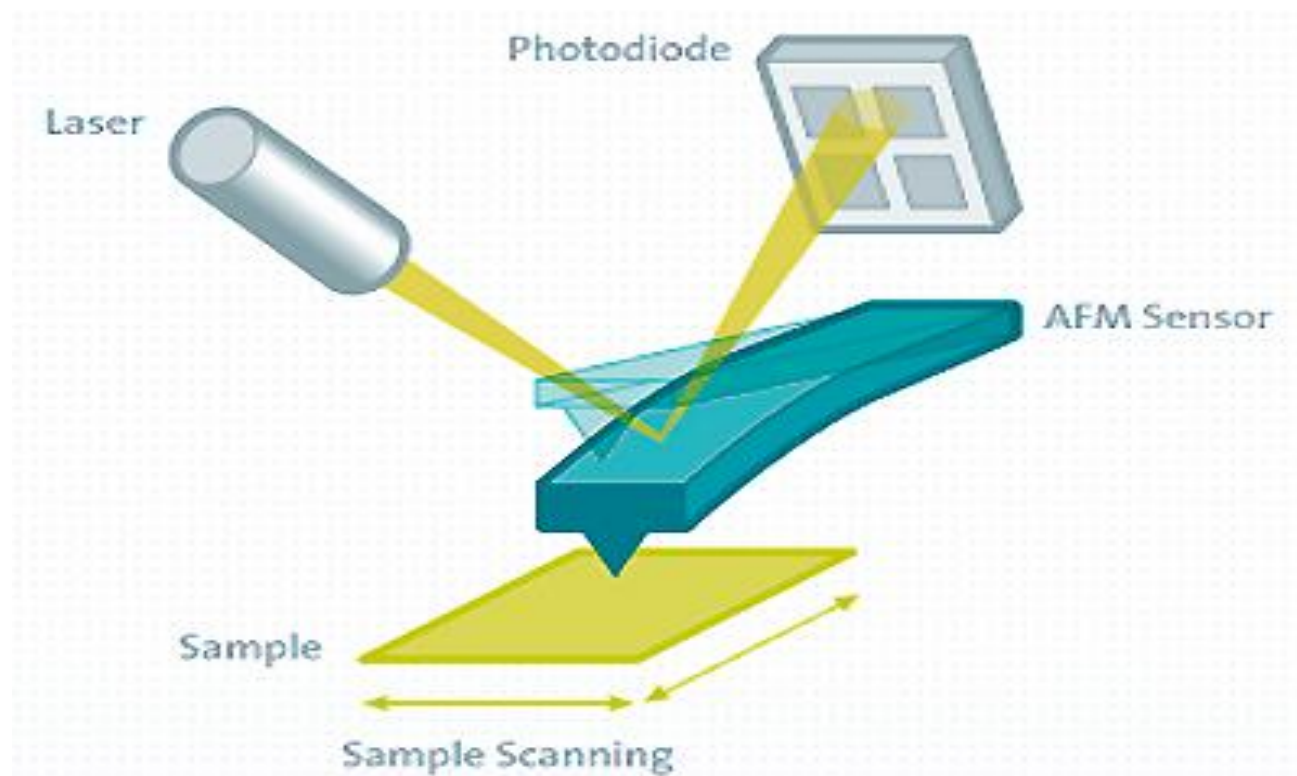
Atomic Force Microscopy (AFM)

Microscopio a Forza Atomica





1. Laser
2. Specchio
3. Fotorivelatore
4. Amplificatore
5. Registratore
6. Campione
7. Sonda
8. Micro-leva

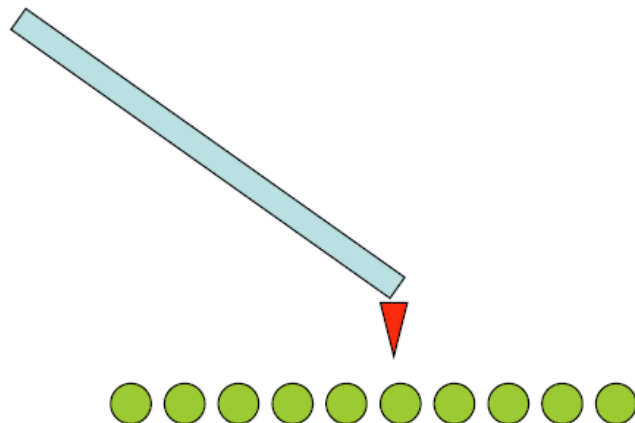


La posizione del cantilever viene rilevata con un laser il cui fascio è riflesso dal cantilever stesso e misurato da un rivelatore

Microscopia a forza atomica

L'effetto piezoelettrico=capacità di un materiale di fornire una differenza di potenziale quando sollecitato meccanicamente ovvero di deformarsi se sottoposto ad un campo elettrico

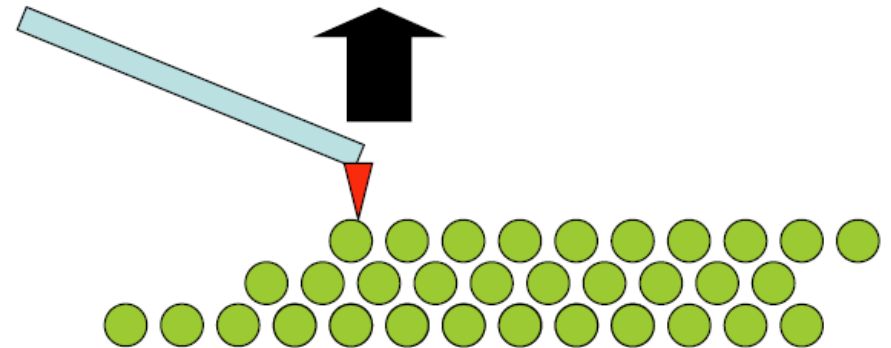
- La punta è posizionata da braccetti piezoelettrici
- Nessuna corrente passa dalla punta al campione
- Forze di superficie attraggono o allontanano la punta dal campione
- Il cantilever si piega
- Il piegamento del cantilever viene misurato (per esempio con un laser)
- La tecnica può funzionare in diversi modi



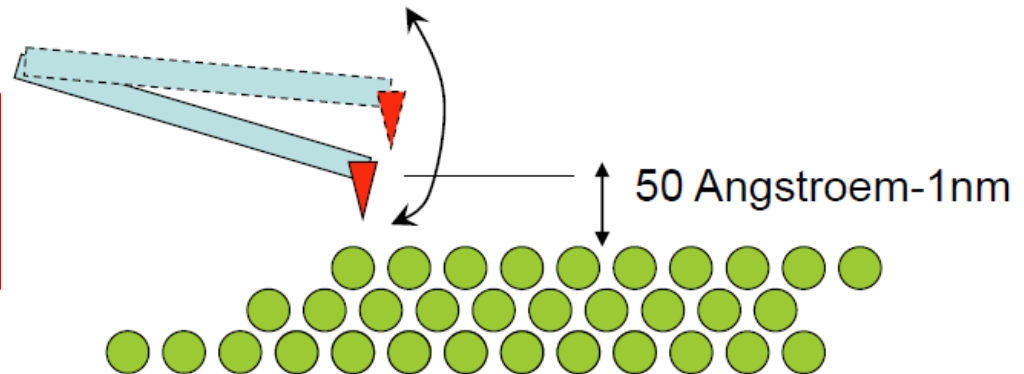
Microscopia a forza atomica

Modi di funzionamento:

Modo di contatto:

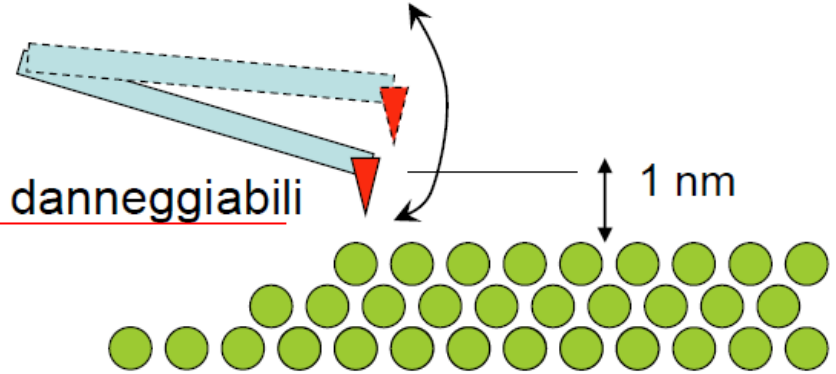


Modo di non-contatto:
Sensibile a strati di gas adsorbito
o altri tipi di strati



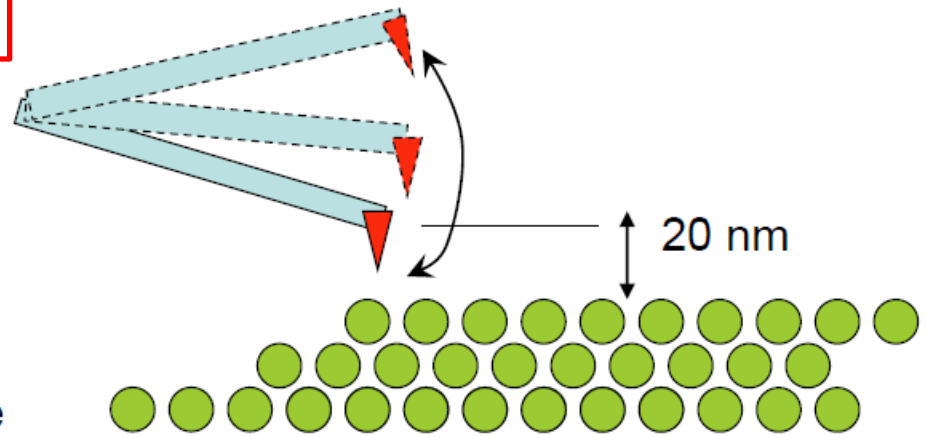
Modo di non-contatto

- Utile nel caso di superfici facilmente danneggiabili o contaminabili
- La sonda oscilla sulla superficie (fuori dalla frequenza di risonanza)
- La punta vibra e si registra la differenza della forza vicino o lontano dalla superficie
- La punta non tocca mai la superficie
- La superficie deve essere pulita e non contaminata



Tapping mode Modo contatto intermittente

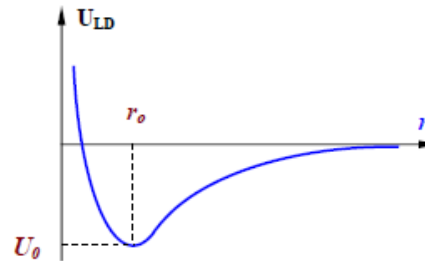
- Risoluzione laterale alta
- bassa sensibilità a strati adsorbiti
- bassa sensibilità a problemi di frizione
- buono per materiali facilmente danneggiabili
- funziona in liquido



Come funziona:

- Il cantilever oscilla alla frequenza di risonanza (50-500 KHz)
- L'ampiezza di oscillazione rimane costante
- La posizione in Z viene regolarmente aggiustata.

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



Il potenziale di Lennard-Jones consente di stimare la forza di interazione punta-campione [33], sommando su tutti gli atomi della punta e del campione (Fig. 61).

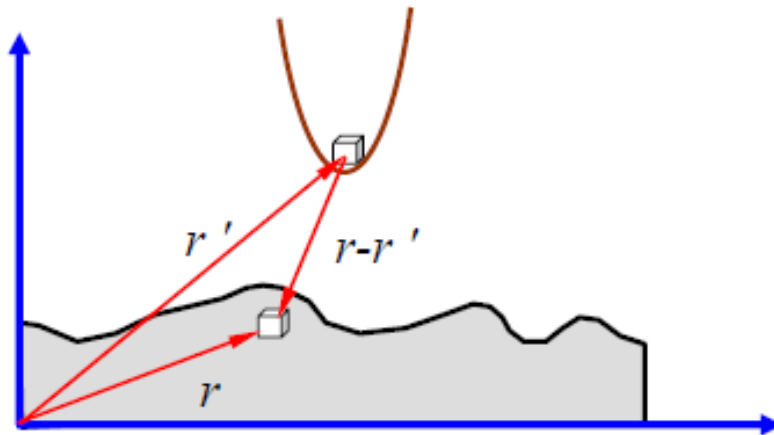


Fig. 61. How to calculate the energy of interaction between tip and sample atoms

L'energia di interazione punta-campione diventa:

$$W_{PS} = \iint_{V_P V_S} U_{LD}(r-r') n_P(r') n_S(r) dV dV',$$

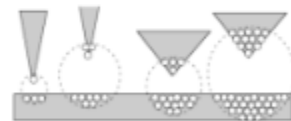
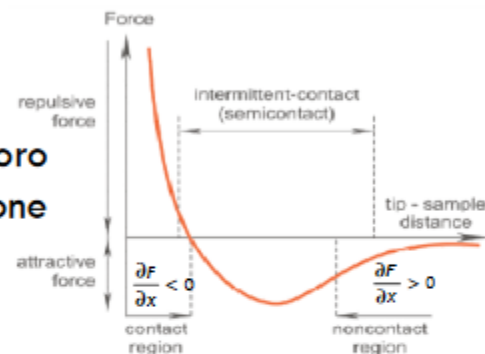
dove $n_S(r)$ e $n_P(r')$ sono le densità di atomi nel campione e nella punta. Il calcolo della forza si ottiene per derivazione spaziale:

la punta AFM viene attratta a grandi distanze e respinta a brevi distanze dal campione

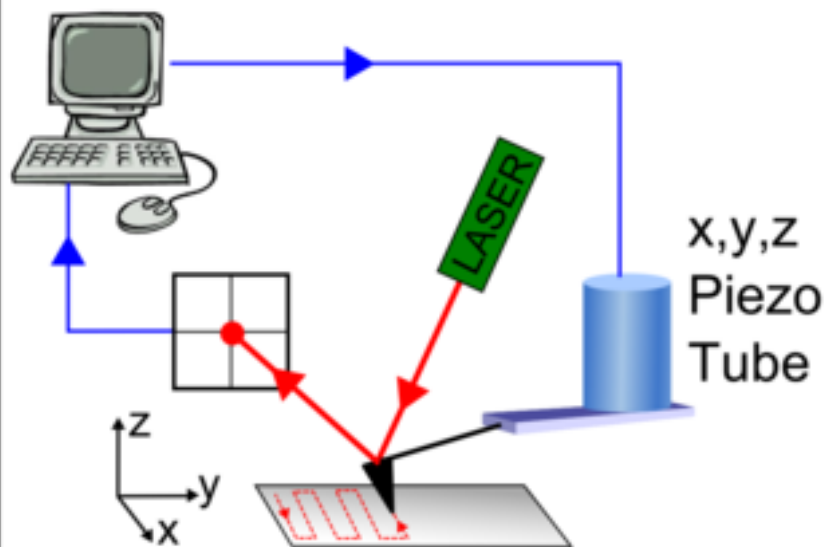
MODALITÀ DI FUNZIONAMENTO

Dal punto di vista dell'interazione punta-campione:

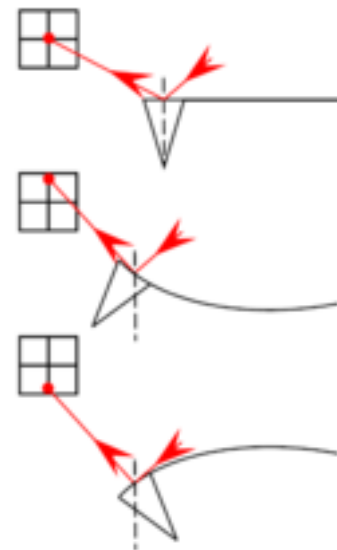
- **Contatto** – Sonda e campione sono a distanze di pochi Å; la loro reciproca distanza varia pochissimo rispetto alle forze di interazione repulsive ($10^{-7}\text{N} \div 10^{-6}\text{N}$).
 - ✓ Si hanno risoluzioni elevate.
 - ✗ I campioni devono avere una superficie regolare
 - ✗ L'azione della punta su campioni “molli” (polimeri, materiali biologici, film sottili, etc.) può produrre graffi e danneggiamenti.
- **Non contatto** – Durante la scansione non vi è contatto tra sonda e campione. Si trovano a distanze $\sim 10\text{Å} \div 100\text{Å}$ intervengono interazioni di tipo Van der Waals, elettrostatiche e di capillarità ($\sim 10^{-12}\text{N}$).
 - ✗ La maggiore distanza della punta dalla superficie impone l'uso di punte particolarmente sottili.
 - ✓ La forza d'interazione della punta con la superficie è sufficientemente piccola da consentire la rilevazione della topografia materiali “molli”.
- **Contatto intermittente** – Sonda e campione si trovano a distanze variabili da pochi a $\sim 10\text{Å}$.
 - ✓ La probabilità di danneggiamento delle superfici per effetto di forze laterali e di attrito è ridotta, per cui è possibile la rilevazione della topografia di materiali “molli” quali campioni biologici.



Atomic Force Microscopy (AFM)



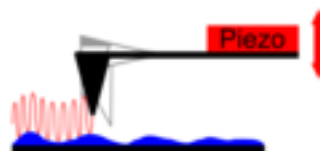
Cantilever Deflection



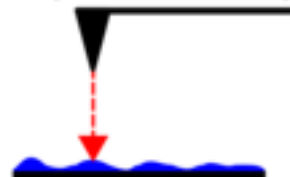
Operation Modes Contact

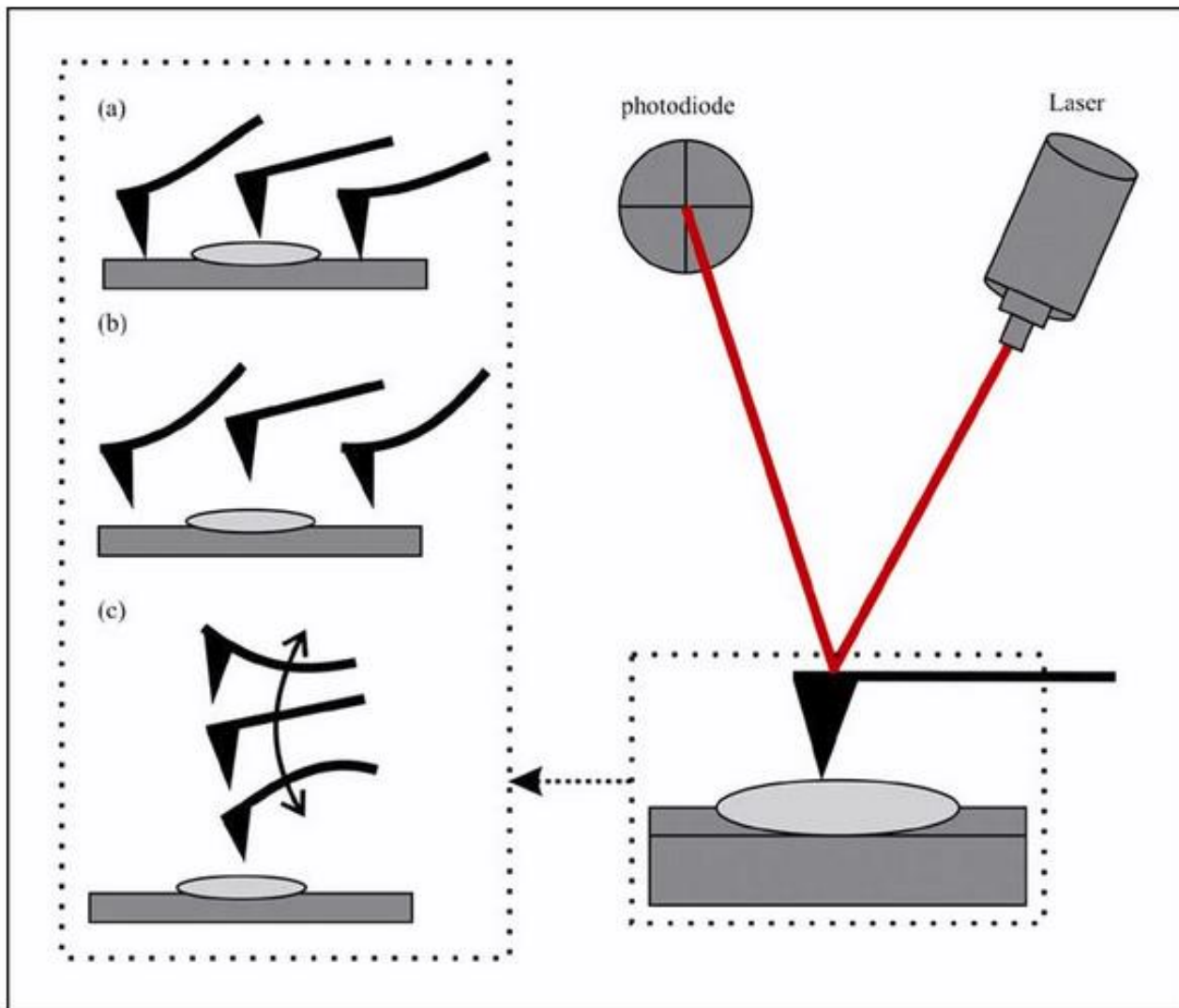


Intermittent contact



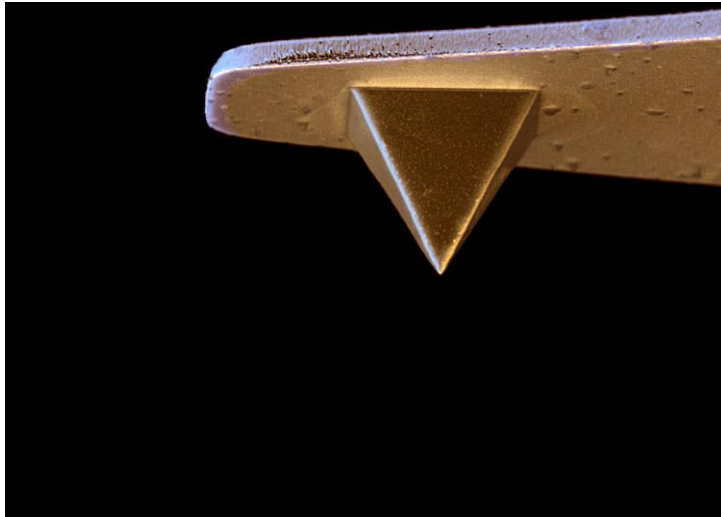
Force Spectroscopy



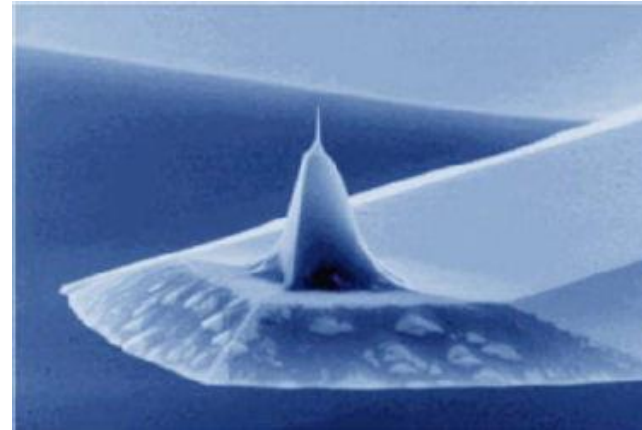


Varietà delle punte

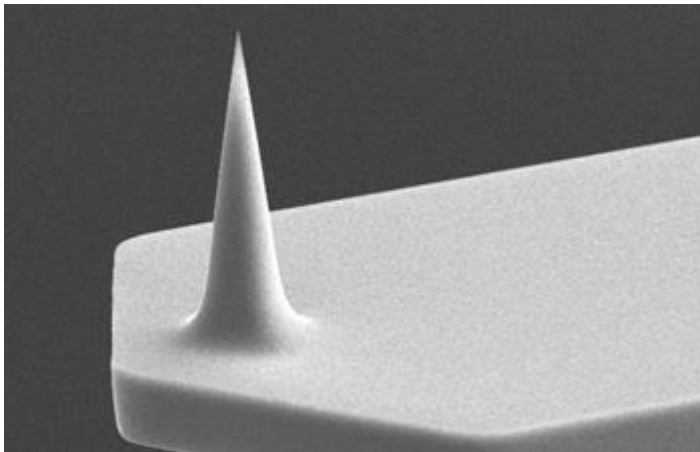
Le punte sono generalmente fatte con Si_3N_4 or Si



3 μm altezza
30 nm di raggio in punta



3 μm altezza
10 nm di raggio in punta

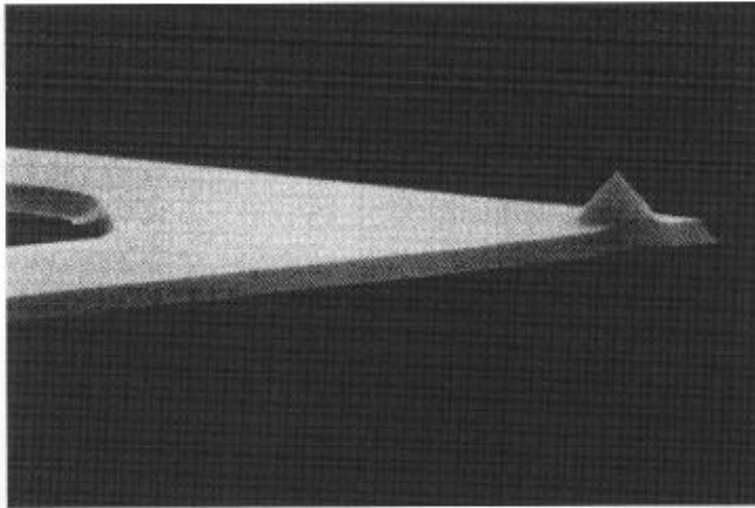
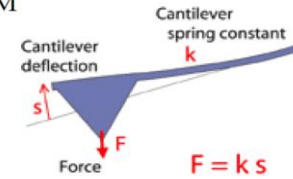


3 μm altezza
10 nm di raggio in punta

AFM: il cantilever

$$\text{frequenza di risonanza} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{M}}$$

$$F = -k \cdot s.$$



40 μm

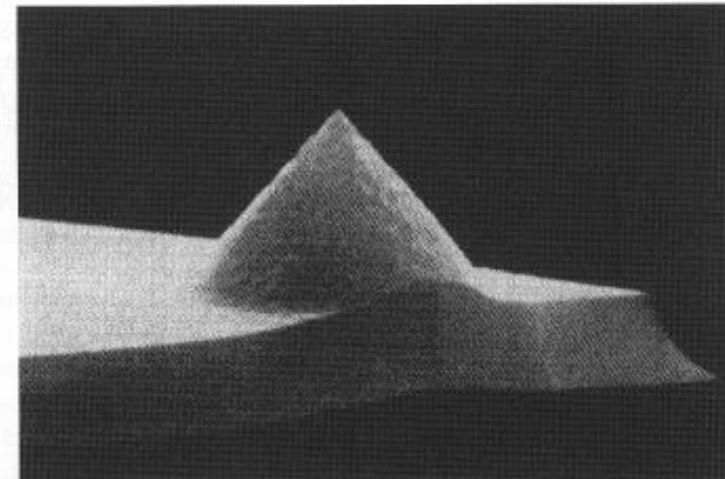
k : tra 0.01N/m e 1N/m - contatto
 $k > 1\text{N/m}$ - tapping.

Lunghezza: da 100 a 200μm

Larghezza: da 10 a 40μm

Spessore: da 0,3 a 2μm.

Il cantilever deve essere "soft" →
minimizzare k (a parità di forza, lo
spostamento è maggiore).

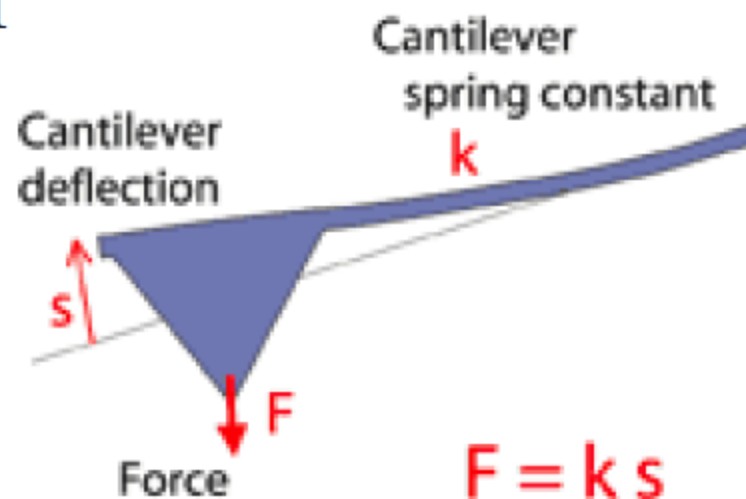


5 μm

I parametri meccanici del cantilever hanno un ruolo importante nella determinazione della sensibilità e della risoluzione. Essi sono:
la costante elastica k
la sua frequenza di risonanza ν
le sue dimensioni fisiche

$$\text{frequenza di risonanza} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{M}}$$

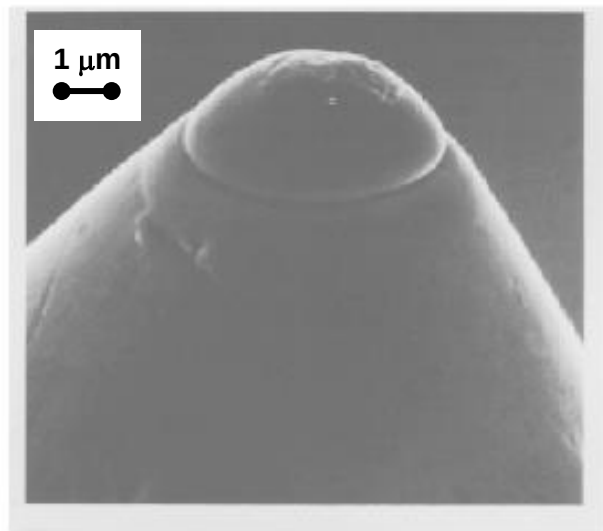
$$F = -k * s.$$



La costante elastica dei diversi cantilever possono variare di quattro ordini di grandezza tra 0.005N/m e 40 N/m.

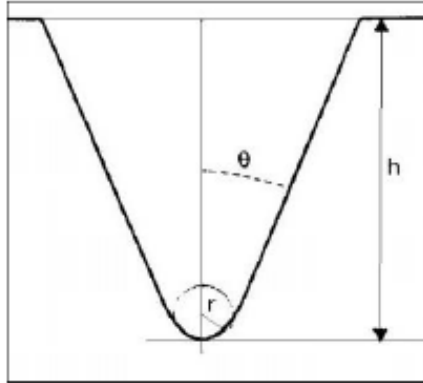
Più il cantilever è spesso e corto e più tende ad essere rigido e con più alte frequenze di risonanza.

Una visione ravvicinata delle punte mostra che esse sono arrotondate e la forma della punta generalmente limita la risoluzione della tecnica AFM per cui c'è una continua ricerca nel modo di produrre punte con una riproducibilità alta ed anche maggiormente affilate



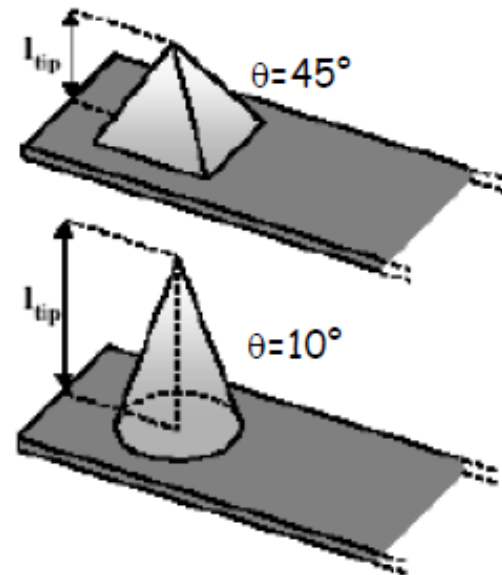
Microfotografia di una punta per microscopia AFM. La barra delle dimensioni indica la lunghezza di un micrometro

AFM: il cantilever

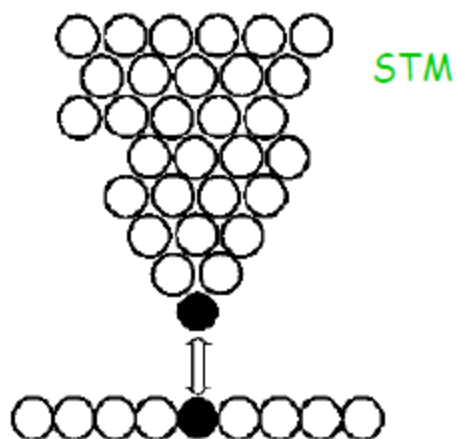


La punta deve essere aguzza per rilevare le irregolarità della superficie da esaminare con un'ottima risoluzione e deve essere resistente al contatto con la superficie.

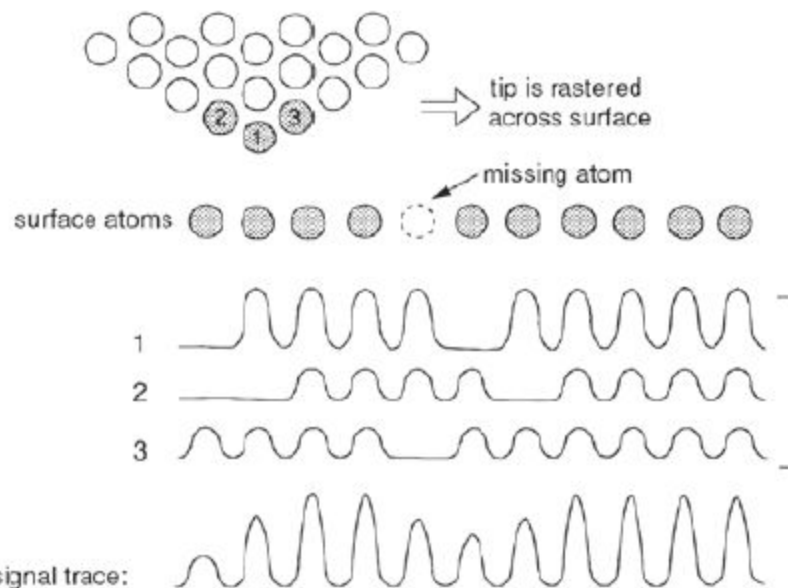
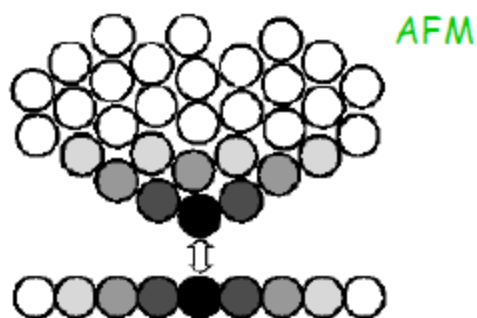
- Il raggio di curvatura r determina la risoluzione laterale su una superficie liscia. Le tecnologie più recenti hanno permesso di fabbricare punte con $r \approx 5\text{nm}$.
- Il semiangolo θ rappresenta il maggiore angolo di inclinazione di una parete che una punta riconosce (capacità di vedere i gradini). Tipicamente $10^\circ < \theta < 45^\circ$.
- L'altezza h determina la capacità di sondare strutture profonde. Tuttavia la massima estensione verticale dello scanner solitamente non supera i $10\mu\text{m}$.



STM vs AFM: interazione punta-campione

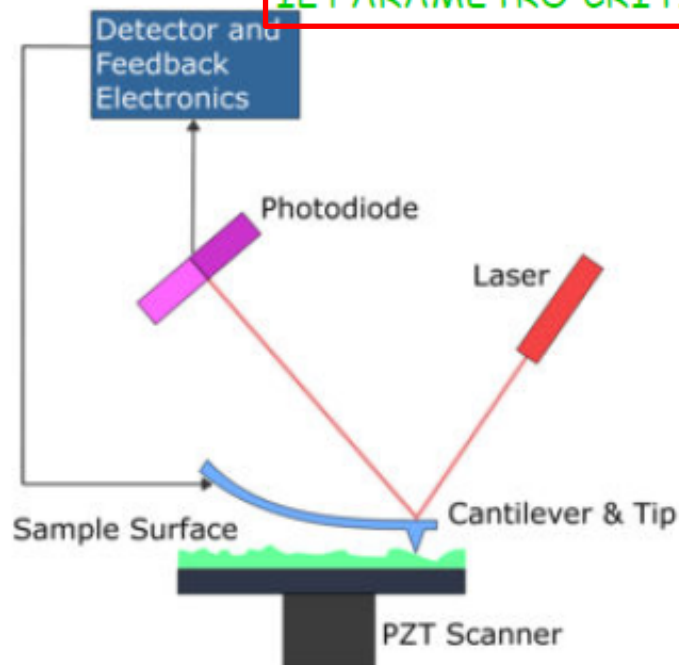


Nell'AFM più atomi contribuiscono all'immagine. Poiché essi sono posizionati in punti diversi, il segnale complessivo è la somma di più contributi "shiftati".



Atomic Force Microscopy

IL PARAMETRO CRITICO E' LA FORZA TRA PUNTA E CAMPIONE



Spring: compliance $0.1 - 10 \text{ N/m}$

Repulsive forces (AFM) $10^{-6} - 10^{-8} \text{ N}$

Note: typical pair binding force (covalent, ionic) $10^{-8} - 10^{-9} \text{ N}$

Van der Waals forces

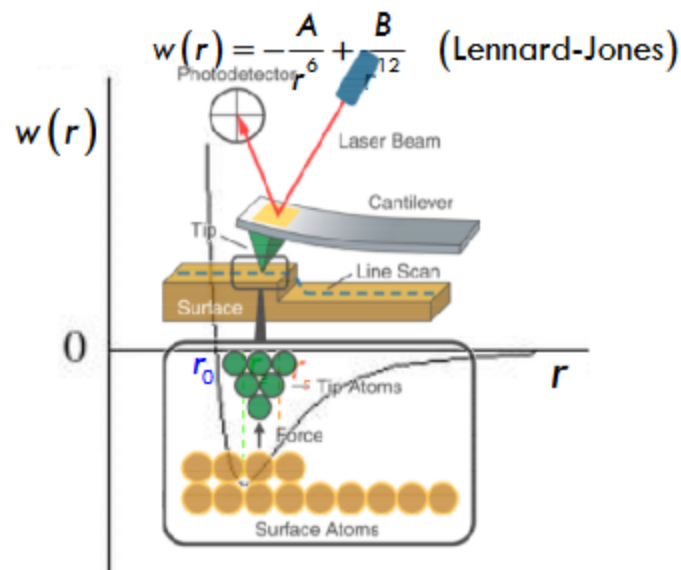
Atomic scale $10^{-10} - 10^{-11} \text{ N}$
 Bulk tip, $R_T \cong 40 \text{ nm}$ 10^{-8} N
 Range: short, several nm

Coulomb forces

Bulk tip, 10 V $10^{-8} - 10^{-9} \text{ N}$
 Range: long $\geq R_T$

Magnetic forces

$1 \mu\text{m}$ wide magnetic bit $\sim 10^{-10} \text{ N}$
 Range: short for domain walls;
 long for domain itself



Il minimo è associato alla condizione di equilibrio tra il termine repulsivo e quello attrattivo e si ottiene per

$$F = -\frac{dw}{dr} = 0$$

$$6\frac{A}{r^7} - 12\frac{B}{r^{13}} = 0$$

$$6\frac{r^6 A - 2B}{r^{13}} = 0$$

$$r_e = \sqrt[6]{2\frac{B}{A}} \quad \frac{1}{r_e^6} = \frac{A}{2B}$$

Per due atomi

$$A = 10^{-77} \text{ J m}^6$$

$$B = 10^{-134} \text{ J m}^{12}$$

$$r_e = \sqrt[6]{\frac{2B}{A}} = 0.3550 \text{ nm}$$

$$w(r_e) = -\frac{A}{r_e^6} + \frac{A}{2r_e^6} = -\frac{A}{2r_e^6} = -\frac{A^2}{4B}$$

$$\frac{w_{\min}(r_e)}{w_{\text{VanDerWaals}}(r_e)} = -\frac{2r_e^6}{\frac{A}{r_e^6}} = \frac{1}{2}$$

Il potenziale è nullo per $w(r_0) = 0$

$$\frac{-Ar^6 + B}{r^{12}} = 0 \quad r_0 = \left(\frac{B}{A}\right)^{\frac{1}{6}} = 0.3162 \text{ nm}$$

$$\frac{r_e}{r_0} = -\frac{\sqrt[6]{\frac{2B}{A}}}{\sqrt[6]{\frac{B}{A}}} = \sqrt[6]{2} = 1.12$$

La forza di adesione è massima per $\frac{d^2 w}{dr^2} = 0$

$$-42\frac{A}{r^8} - 12 \cdot 13\frac{B}{r^{14}} = 0 \quad 6\frac{-7Ar^6 + 26B}{r^{14}} = 0 \quad r_s = \sqrt[6]{\frac{26B}{7A}} = 0.3935 \text{ nm}$$

$$F_{\text{MAX}} = \left(-\frac{dw}{dr}\right)_{r=r_s} = \left(-6\frac{A}{r^7} + 12\frac{B}{r^{13}}\right)_{r=r_s} = -\frac{126A^2}{\sqrt[6]{\frac{26B}{7A}}} = -1.89 \cdot 10^{-11} \text{ N}$$

ELASTICITÀ DELLE MICROLEVE

Per rispondere con flessioni apprezzabili a forze $10^{-11}\text{N} \div 10^{-8}\text{N}$ occorrono microleve con $k \approx 0.01\text{N/m} \div 50\text{N/m}$.

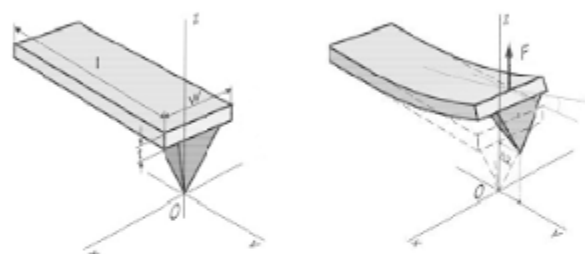
Per una microleva in silicio di una barra rettangolare si ha:

$$k = \frac{3EI}{l^3}$$

E = modulo di Young
 I = momento di inerzia
 l = lunghezza della microleva

$$I = \frac{t^3 w}{12}$$

t = spessore
 w = larghezza



$$k = \frac{3Et^3 w}{4l^3}$$

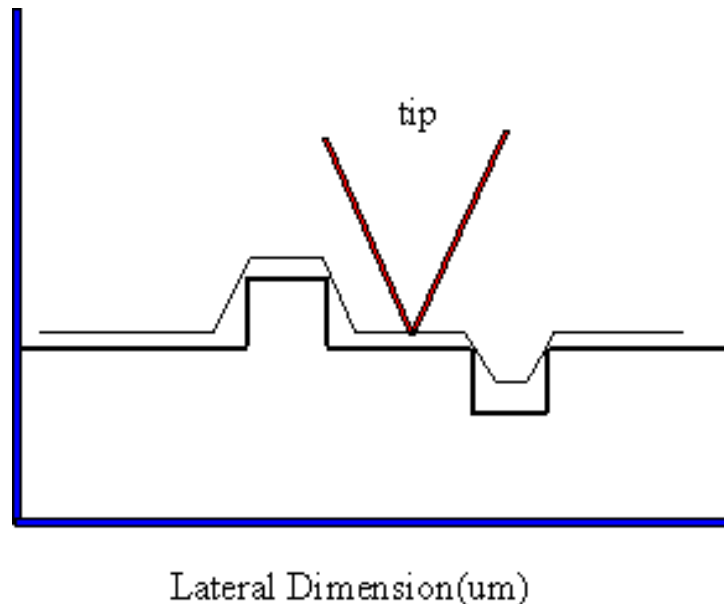
Una microleva di Si o Si_3N_4 ($E \approx 10^{11} \text{ N/m}^2$) spessa $1\mu\text{m}$, lunga $10\mu\text{m}$ e larga $20\mu\text{m}$ ha costante elastica $k \approx 0.5 \text{ N/m}$.

Le microleve possono essere tarate (determinando k) tramite metodi diretti o per confronto con microleve ad elasticità nota (metodi statici) o attraverso metodi dinamici portando la microleva in oscillazione (metodi dinamici) e studiando la variazione della frequenza di risonanza al variare della sua massa, di stimolazioni termiche o considerazioni di natura fluidodinamica.

RISOLUZIONE DEGLI ESPERIMENTI AFM

La risoluzione laterale è generalmente definita dall'abilità di distinguere due punti separati su un'immagine. La risoluzione è determinata dalla geometria apicale della punta e dalla geometria del campione.

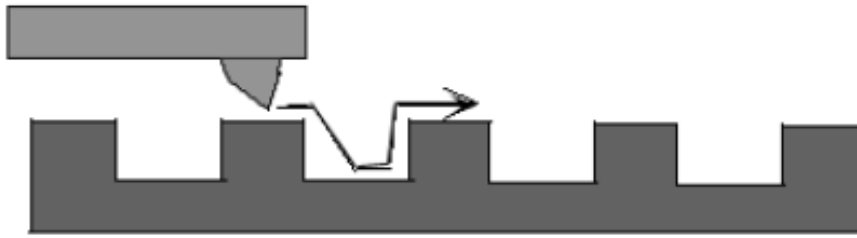
Generalmente la larghezza di una doppia elica di DNA viene utilizzata per valutare la risoluzione poiché il suo diametro è noto essere pari a **2,0 nm nella forma B**.



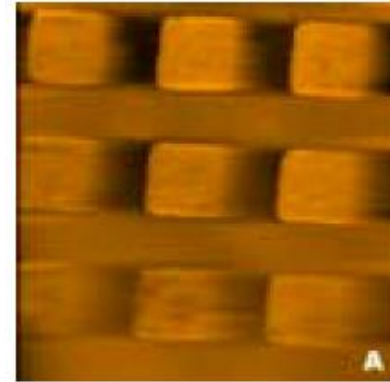
Paragone di diverse tecniche microscopiche.

	conventional optical microscopy	scanning electron microscopy (SEM)	atomic force microscopy (AFM)
microscopic environment	ambient liquid vacuum	vacuum	ambient liquid vacuum
field depth	small	high	medium
focus depth	medium	small	small
Resolution			
x,y	100 nm	5 nm	0,1 - 1,0 nm
z	n/a	n/a	0,01 nm
magnification	$1\times - 2 \times 10^3\times$	$10\times - 10^6\times$	$5 \times 10^2\times - 10^8\times$
necessary sample preparation	low	critical point drying or freeze-drying, coating	low
necessary sample properties	samples do not have to be completely transparent for visible light	samples should not be charged and have to be vacuum compatible	samples should do not have excessive changes in height compared to tip geometry

AFM imaging artifacts



This "chipped" AFM probe follows the geometry of the sample surface and creates an image with a substantial artifact.



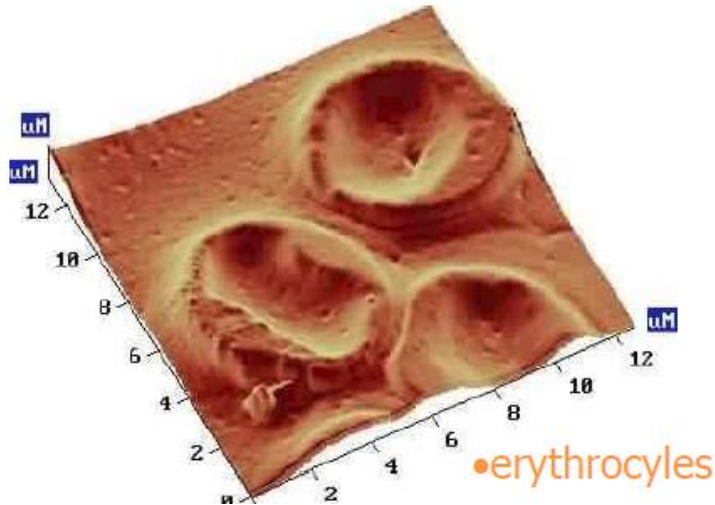
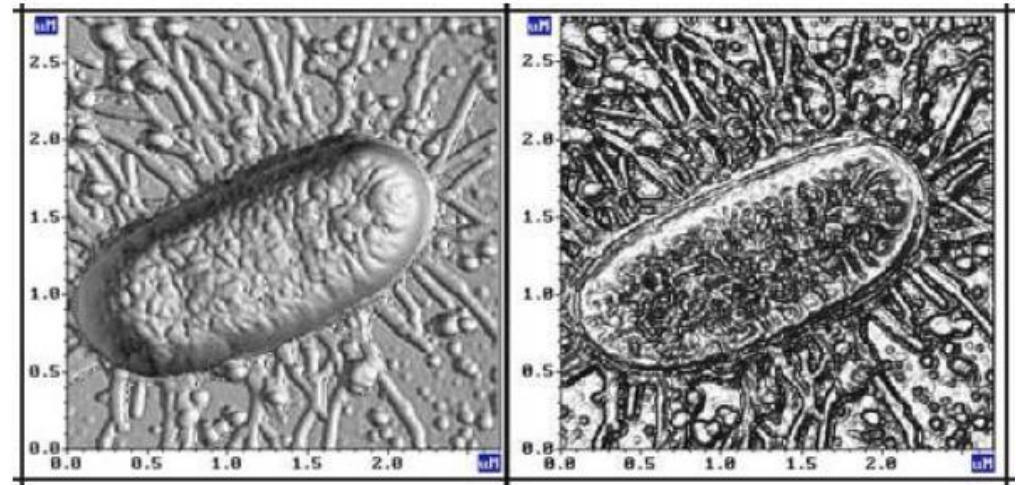
In this example the probe is much sharper than the feature it is scanning across and should give a correct image. However, because of the extreme probe sample angle, the line profile will show an artifact at the left edge of the feature.

Vantaggi della Microscopia a Forza Atomica

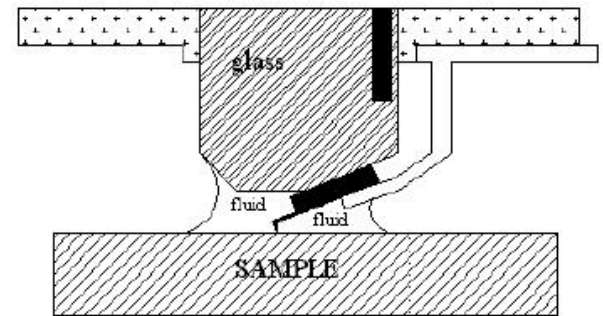
- Gli ambienti di lavoro possono essere indifferentemente:
 - **vuoto** (per campioni che necessitano del minore numero di impurità)
 - **aria**
 - **liquidi** (particolarmente interessante per osservazioni in-vivo)
- Non si necessita di particolare preparazione dei campioni:
 - il campione deve essere depositato su una superficie piana (spesso si usano sfoglie di mica) (Fillosilicati $\text{KAl}_2(\text{Si}_3\text{Al})\text{O}_{10}(\text{OH},\text{F})_2$)
- La risoluzione è paragonabile a quella di un microscopio elettronico
- Possibilità di elaborare le immagini al computer (immagini 3D)

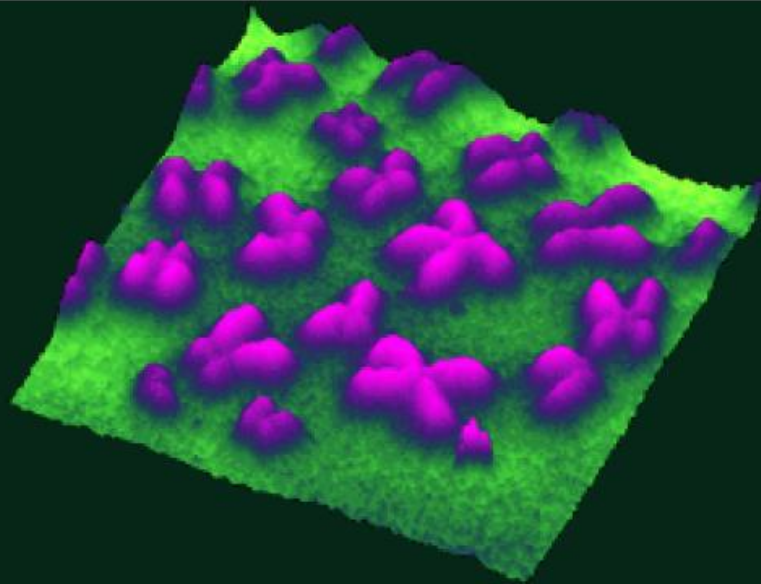
Tapping Mode AFM in Biology

•E-coli

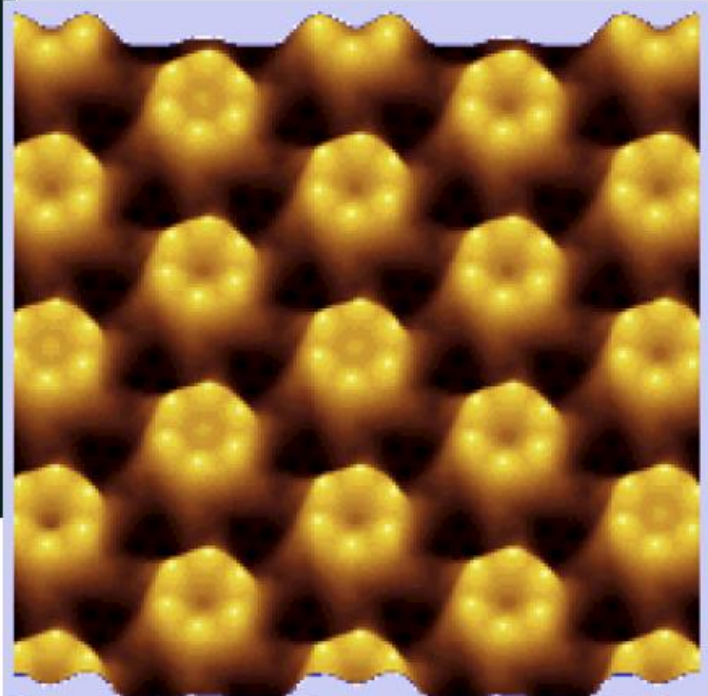


•erythrocytes





Human Chromosomes. Thanks to Digital Instruments for the picture.



Protein surface layer of D. Radiodurans. Courtesy of Digital Instruments.

Preparazione dei campioni

Non c'è praticamente necessità di preparazione dei campioni.

Molto spesso tutto si riduce a mettere la soluzione con la sostanza da studiare su uno strato di mica (che adsorbe il liquido) o su vetro.

Fenomeni e reazioni delle forze tra il substrato adsorbitore e la soluzione.

Il substrato (che può essere di vario tipo oltre a mica e vetro) deve essere opportunamente trattato precedentemente in modo da non contaminare il campione.

Fissaggio: in alcuni casi (in cui il materiale biologico è troppo morbido) si può fissare il materiale come nel caso del microscopio elettronico. In alcuni casi si può anche raffreddare il campione.

N. Matsko, M. Müller, Journal of Structural Biology 146 (2004) 334-343

CURVE DI FORZA

Misura delle curve di forza

Il dispositivo AFM può anche registrare la quantità di forza sentita dalla leva quando la punta viene posta in vicinanza del campione – o anche tocca il campione – e poi viene allontanata.

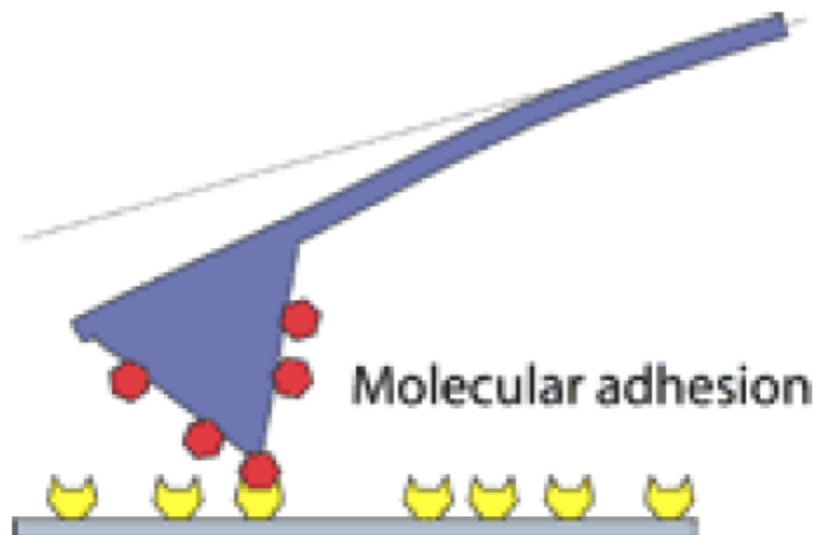
Questa tecnica può essere utilizzata per misurare la forza attrattiva o repulsiva a lunga distanza tra la punta ed il campione; in questo modo si ottengono informazioni su proprietà chimiche e meccaniche locali del campione come per esempio l'adesione e l'elasticità oppure anche le dimensioni dello strato di molecole assorbite o la lunghezza di rottura di un legame.

Misure di questo tipo possono essere eseguite anche in modo oscillante sia in misura di ampiezza che in misura di fase che aggiungono ulteriori informazioni circa le proprietà dei campioni come dettagli circa le proprietà elettriche e magnetiche sulla superficie e le sue proprietà viscoelastiche.

Al contrario della cristallografia a raggi X e della microscopia elettronica (TEM/SEM), l'AFM permette non solo di ottenere immagini dei campioni in condizioni fisiologiche, ma anche di “vedere” processi biologici mentre si svolgono.

Inoltre, in virtù del rapporto segnale-rumore (S/N) alto le informazioni che possono essere ottenute non sono ristrette ai soli campioni cristallini. Quindi, singole (macro)molecole anche non simmetriche possono essere visualizzate direttamente nel loro ambiente nativo.

Adesione Molecolare



- Si può misurare l'adesione tra le molecole attaccate alla punta ed al campione.
- Possono essere anticorpi e antigeni o altre coppie recettore-legante.
- Le forze adesive possono essere misurate e mappate lungo la superficie e si possono ricavare informazioni sull'energia e sulla cinetica del legame.

Modo Immagine

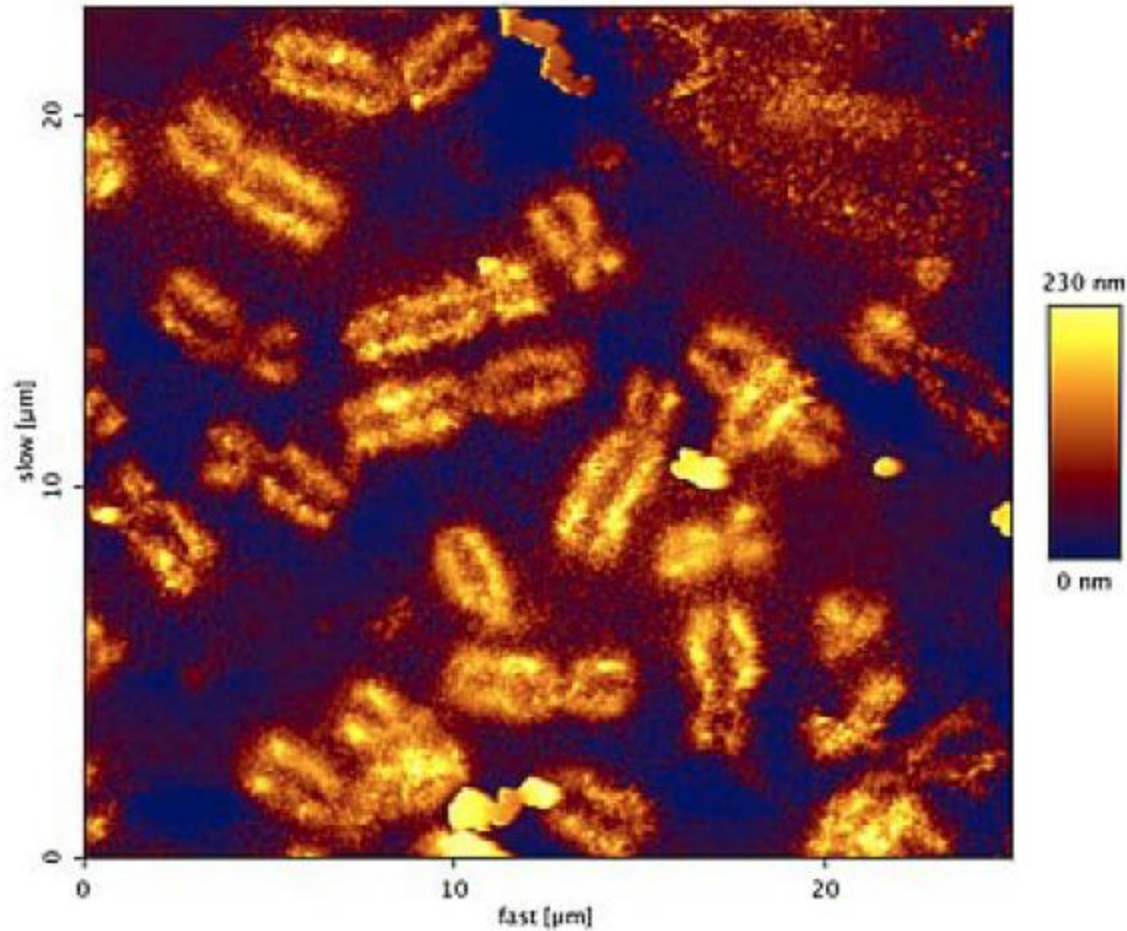
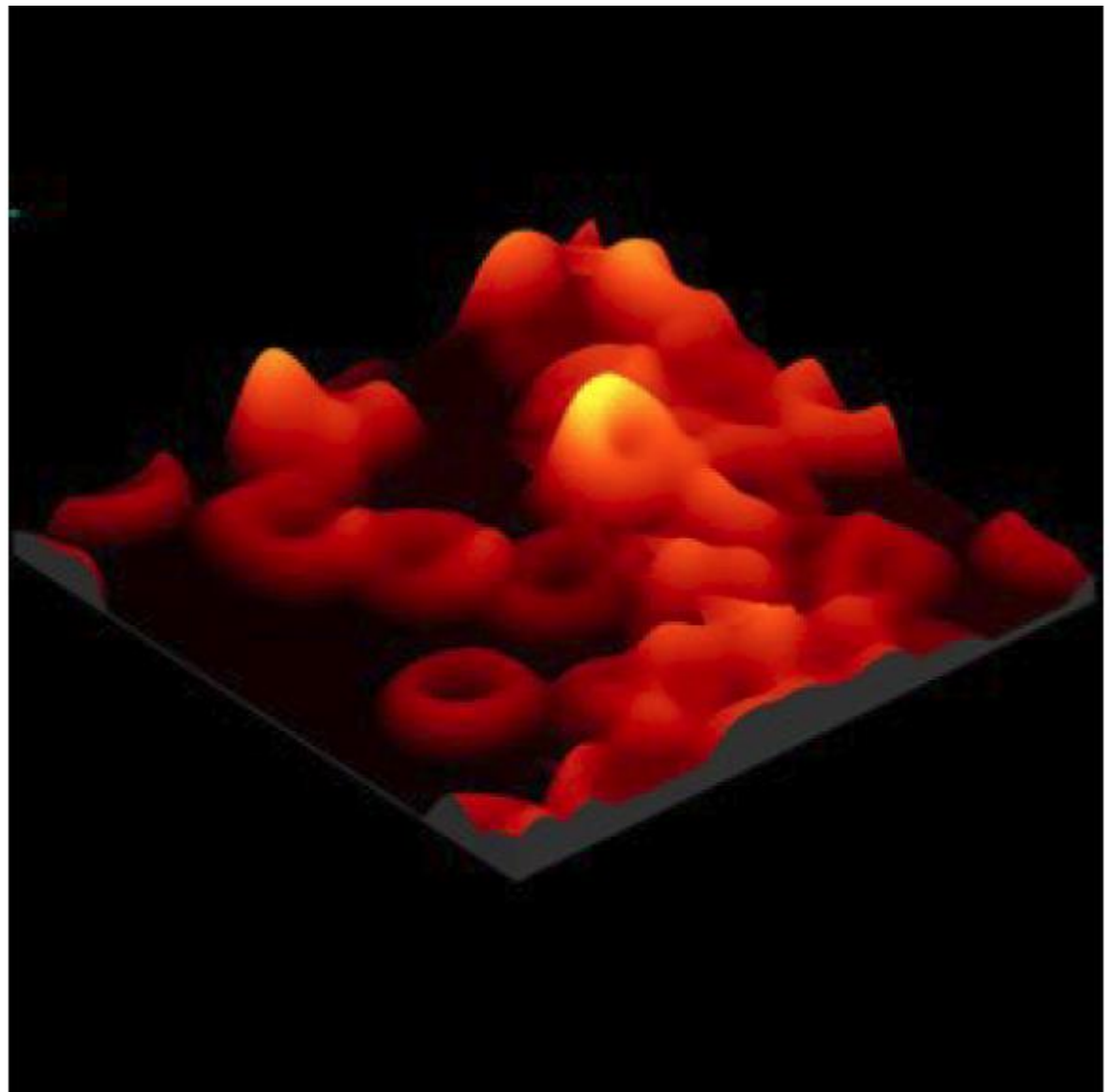


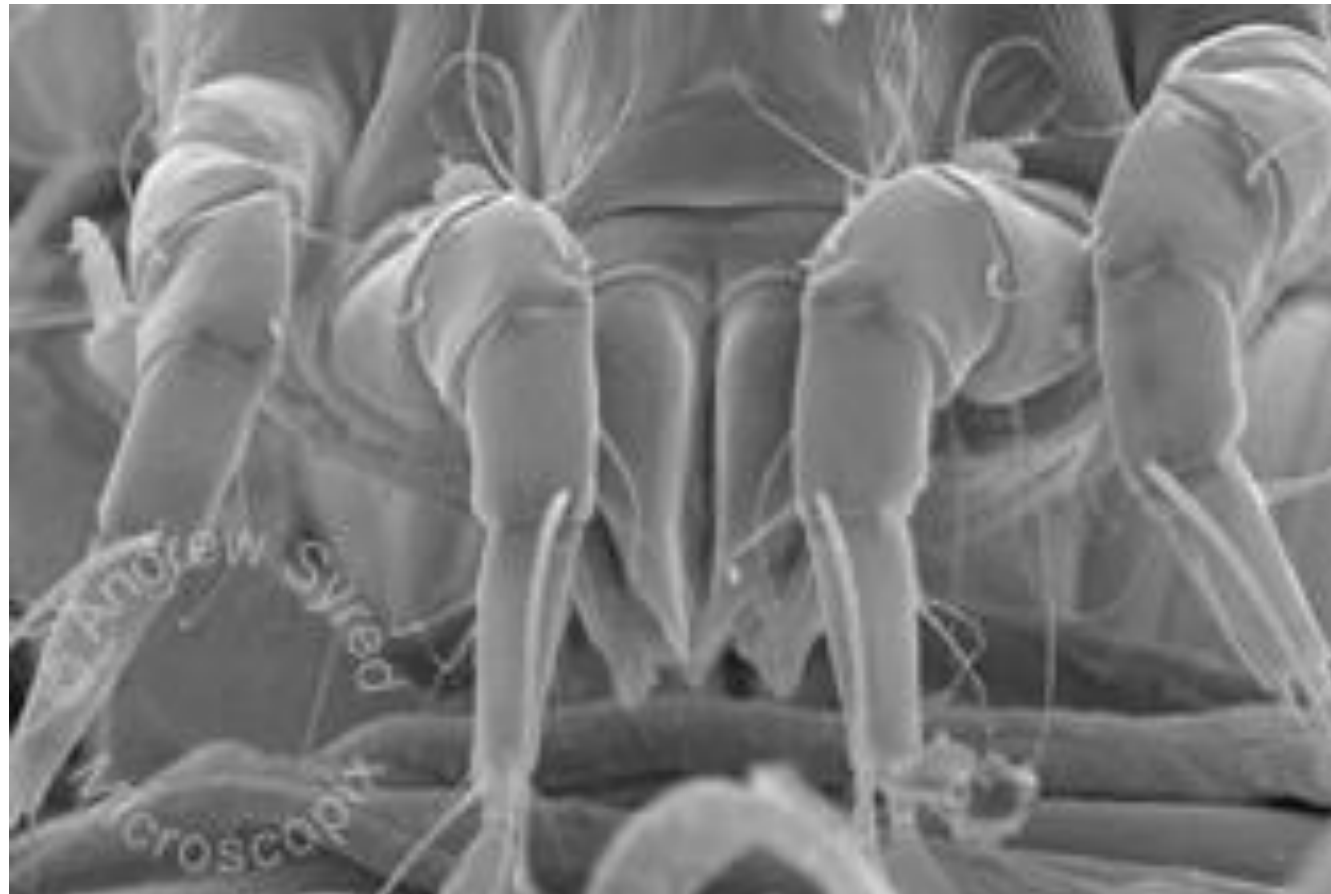
Immagine in altezza(sinistra) dei cromosomi umani di metafase del linfocita

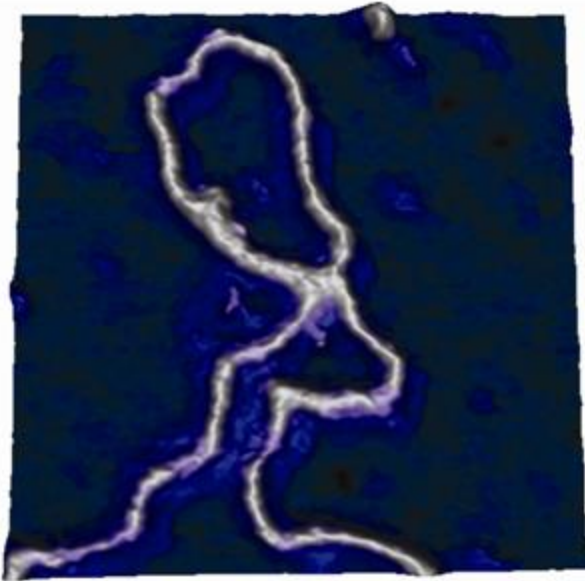
intermittent contact mode

Modo Immagine 3D



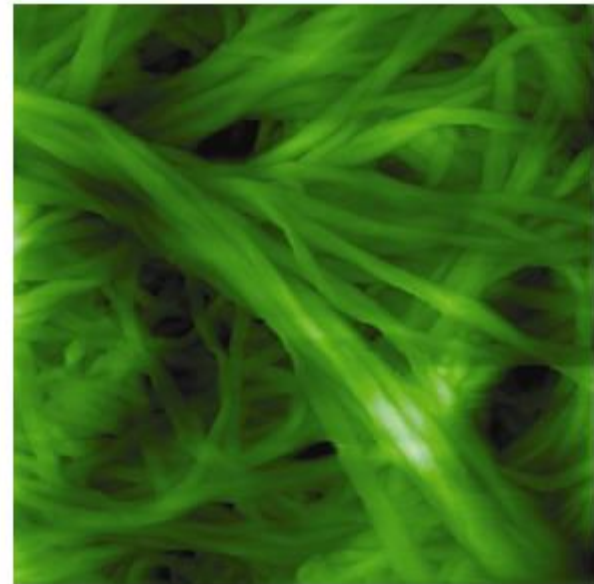
height image of eritrociti
contact modescan field $40\text{ }\mu\text{m} * 40\text{ }\mu\text{m}$
z-range $2.1\text{ }\mu\text{m}$

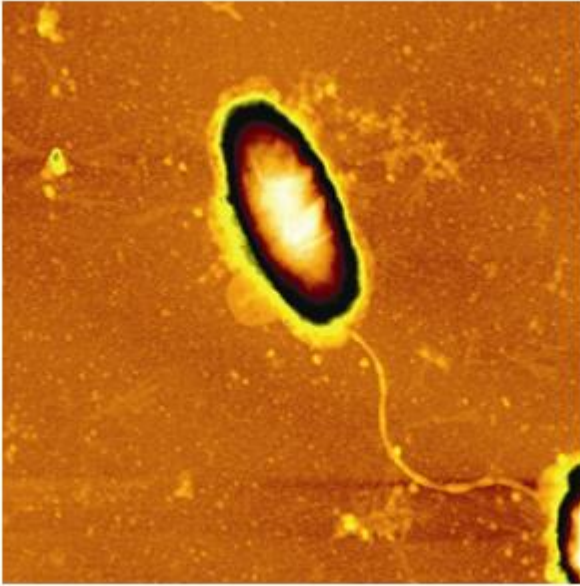




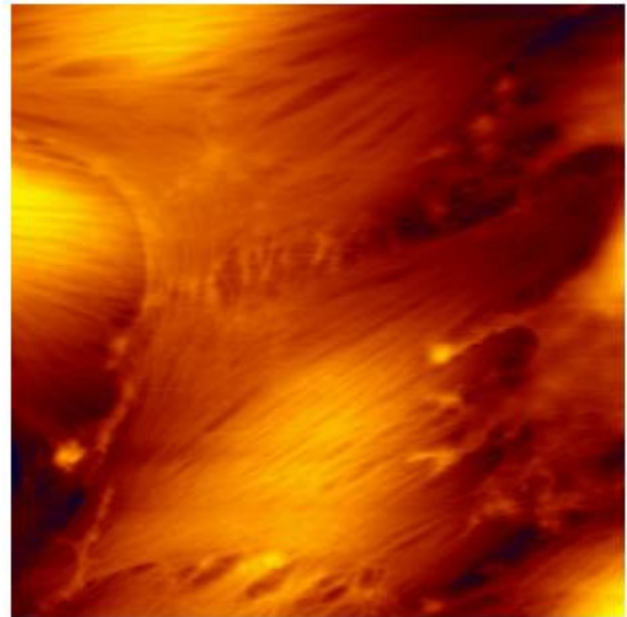
DNA in buffer (200nm x 200nm)

Bacterial cellulose (2.0 μ m x 2.0 μ m)



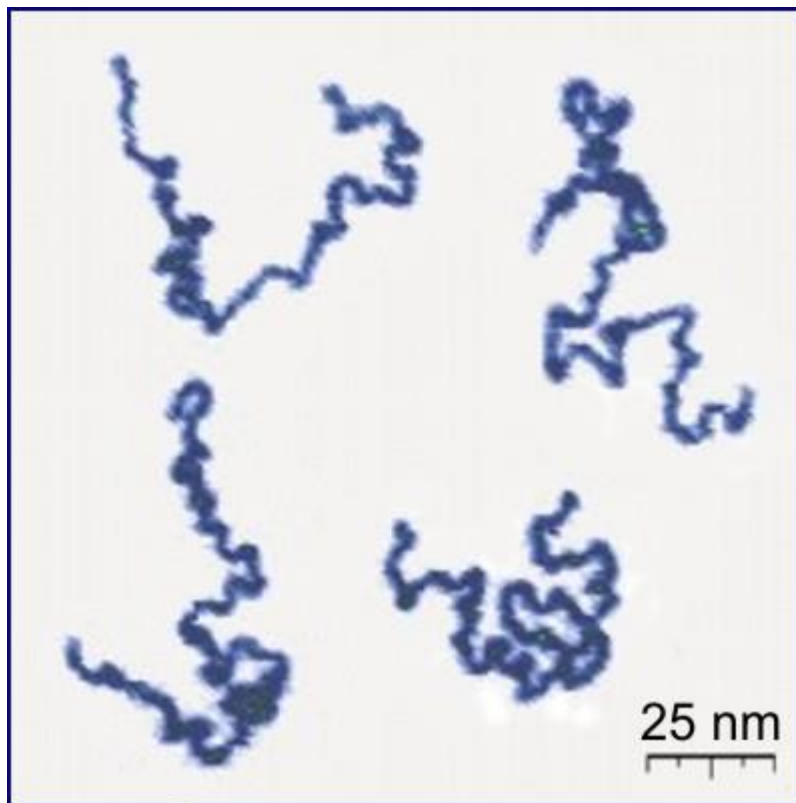


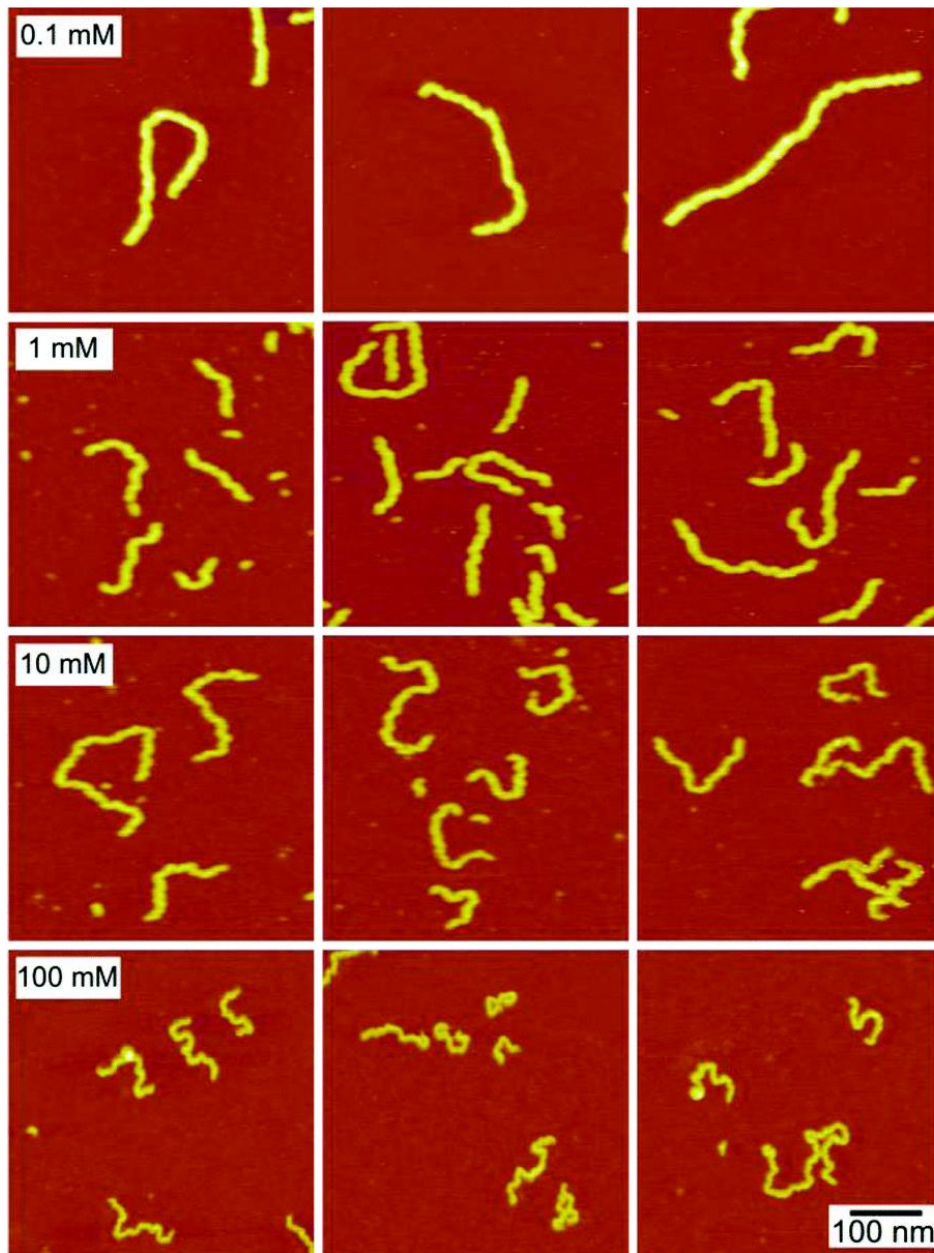
Bacterial cell (*H. pylori*) (5.5 μ m x 5.5 μ m)



Living fibroblast cells in PBS (60 μ m x 60 μ m)

polivinilpiridina





Amino-functionalized
polymethacrylate

—
Increasing Ionic Strength
↓

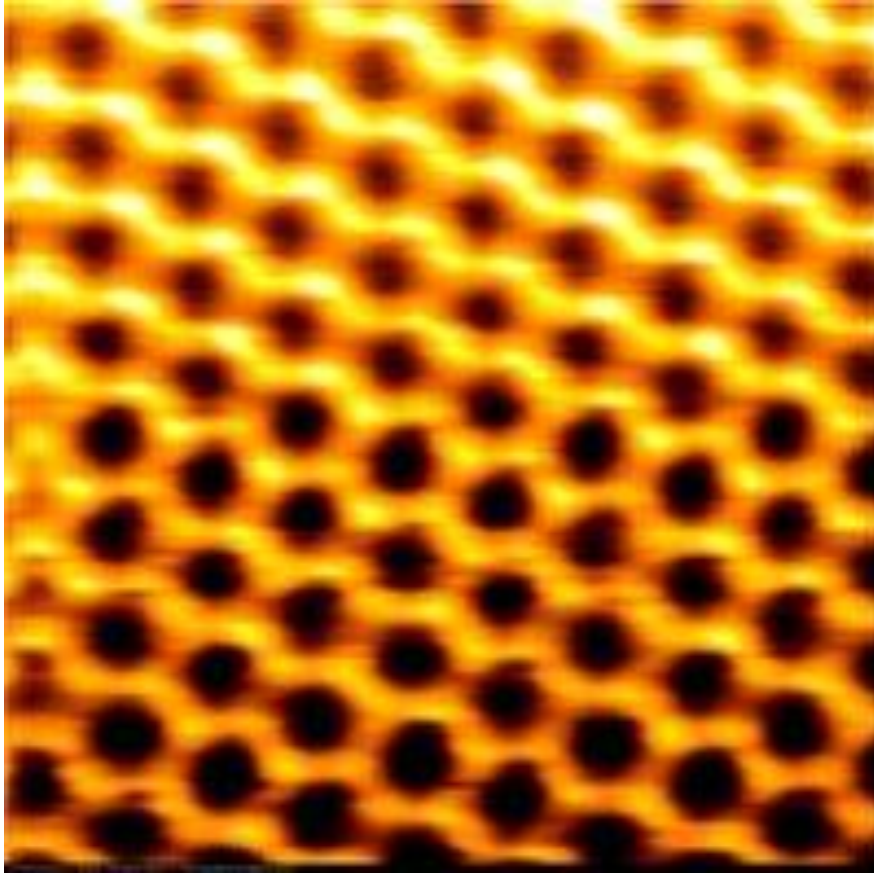
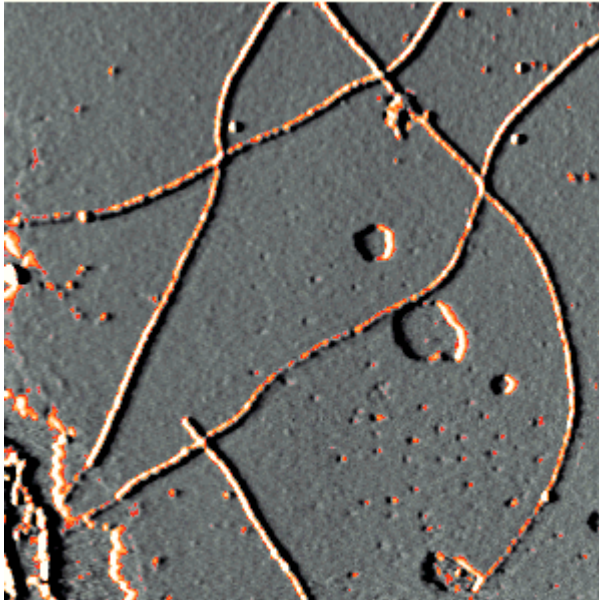


Immagine della grafite mediante AFM. L'alta risoluzione permette di vedere la disposizione esagonale degli atomi nella cella unitaria.

Dimensioni dell'immagine 2×2 nm².

Studi sulla morfologia di polimeri biologici

Fibre di actina visualizzate in modo contatto AFM



L'**actina** è una proteina globulare con peso molecolare di 43 kDa. Ha un diametro di 5,46nm e determina la possibilità di movimenti cellulari. E' presente in tutte le cellule del corpo e specialmente nelle cellule muscolari. La quantità di actina nelle cellule può raggiungere il 10% di quella proteica totale.

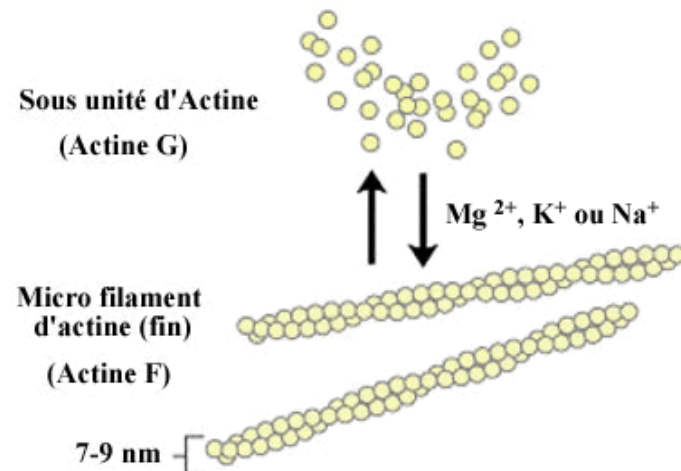


Immagine AFM di segmenti di DNA doppia elica depositato su mica. La dimensione laterale della doppia elica di DNA è 2 nm (anche utilizzata come standard di calibrazione).

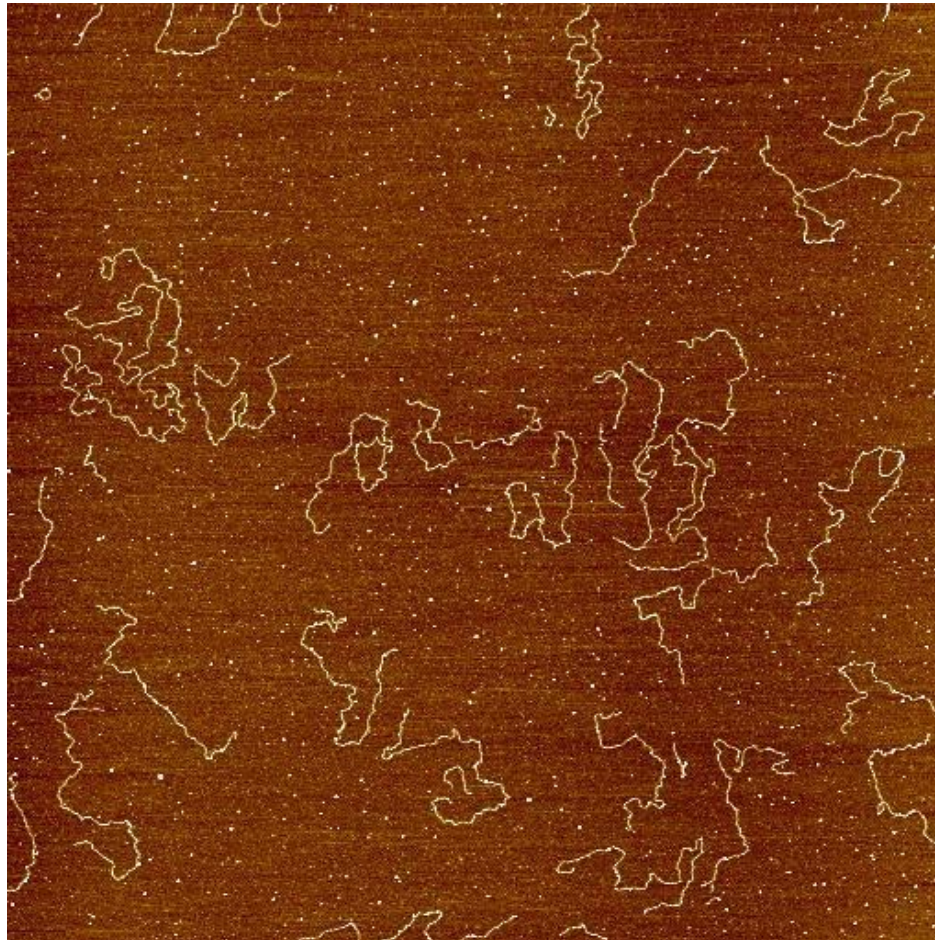
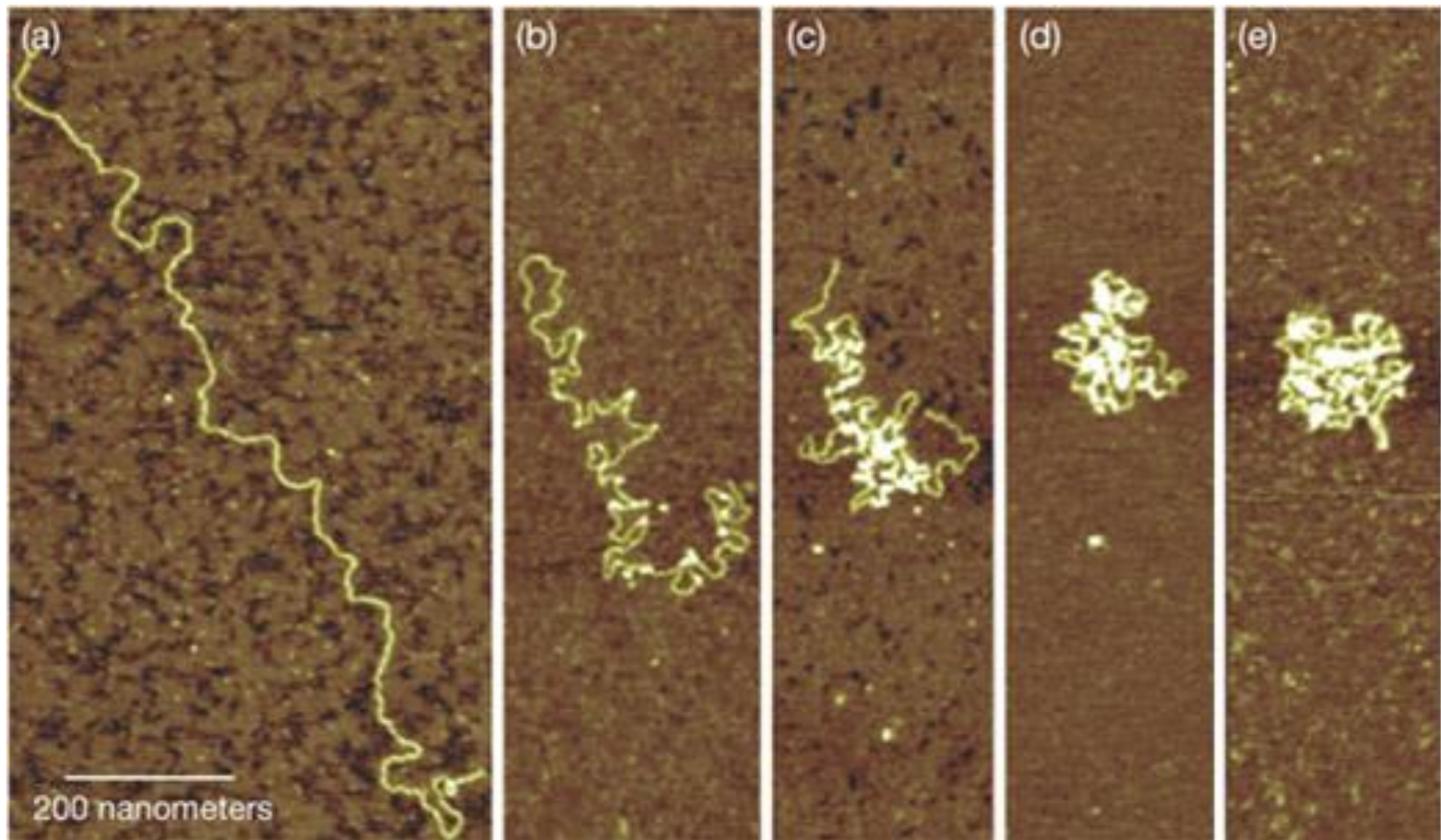


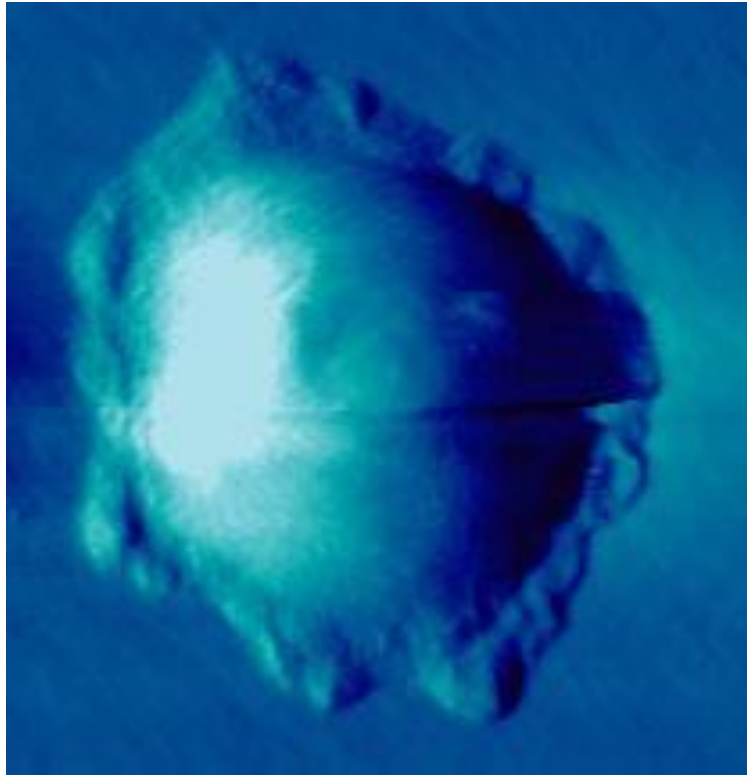
Immagine prodotta dal Dr. Andy Baker.



diverse morfologie che il DNA assume in seguito al compattamento dovuto all'aggiunta di una proteina chiamata AbF2.

Questa serie di immagini visualizza in modo molto accurato la capacità di ripiegamento del DNA similmente a quanto avviene nei nucleosomi che costituiscono la base della struttura dei cromosomi.

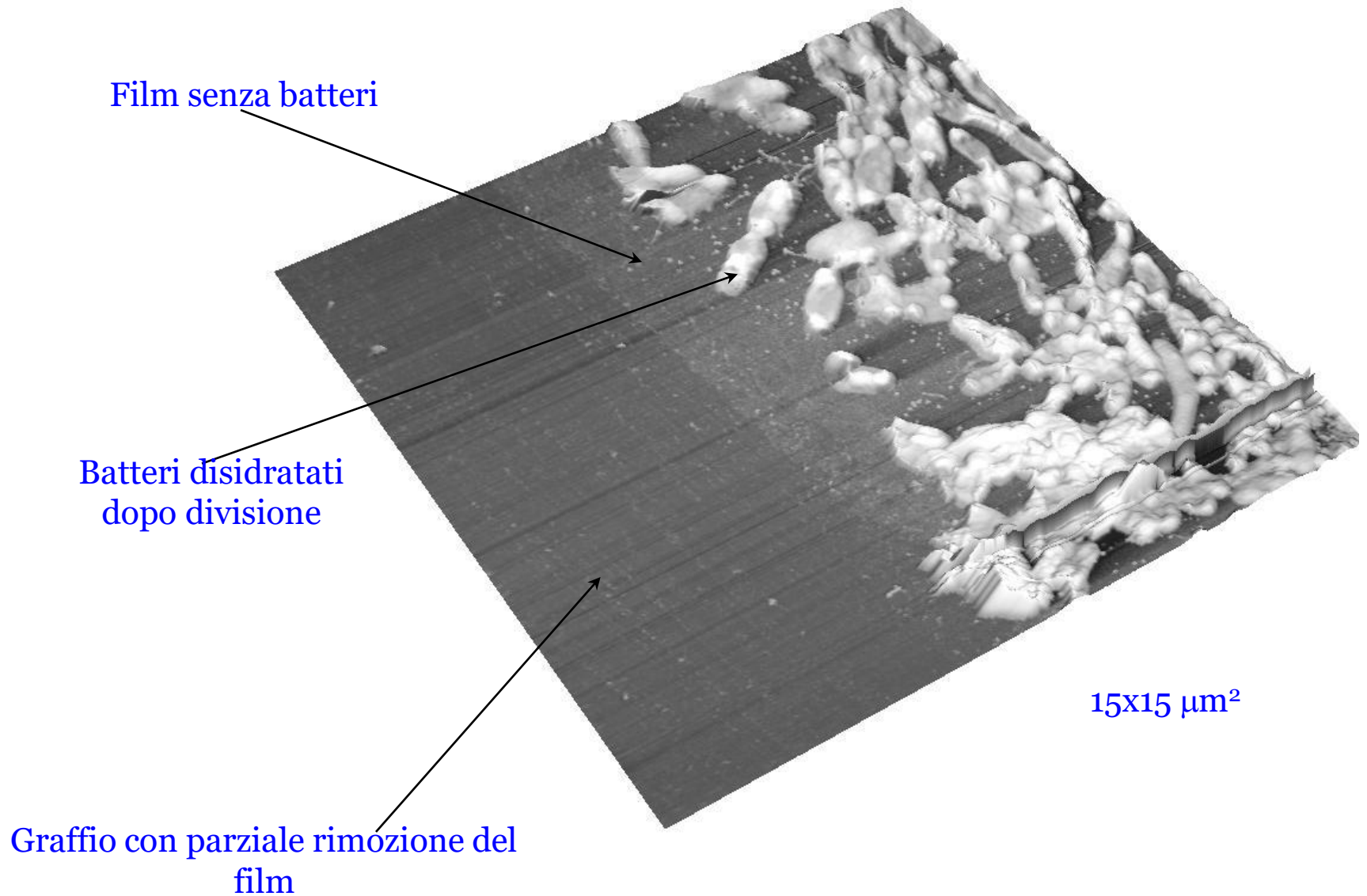
L'AFM può anche essere utilizzata per visualizzare oggetti più grandi come cellule



Cellula alveolare di topo.
Immagine ottenuta in modo
contatto.

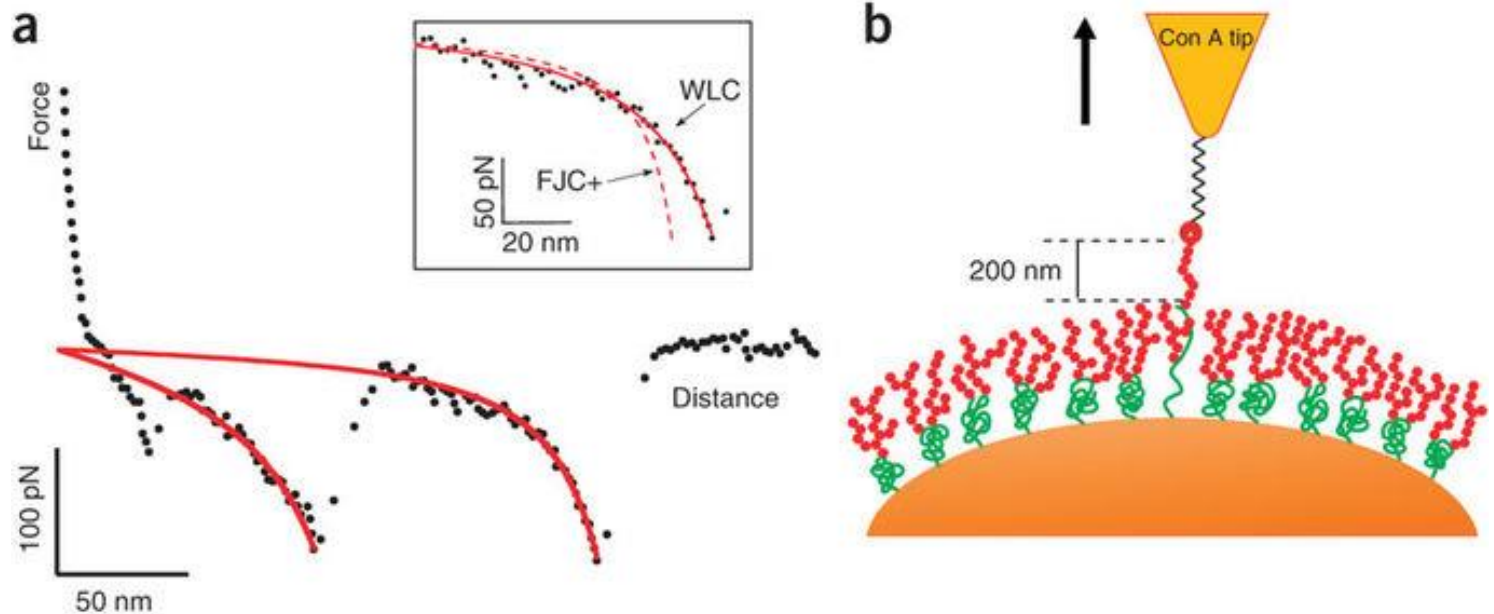
pneumociti di tipo I, definiti anche piccole cellule alveolari, ricoprono circa il 90% della superficie alveolare totale. Sono cellule piccole, sottili le quali si sviluppano come un sottile film che ricopre la superficie dell' alveolo.

Immagine 3D di un Biofilm batterico



Stretching polysaccharides on live cells using single molecule force spectroscopy

Nature Protocols **volume 4**, pages 939–946 (2009) 28 May 2009



Imaging of Individual Biopolymers and Supramolecular Assemblies Using Noncontact Atomic Force Microscopy

Table I Measured Vertical Heights of Standard Specimens

Specimen	Expected Diameter, d (nm)	Measured Height, h (nm)	Standard Deviation, σ_h (nm)
Collagen	1.5	1.19	0.36
Colloidal gold	8.44	7.82	0.59
Tobacco mosaic virus	18.0	17.6	1.4
Polystyrene spheres	64	54.4	4.3
Polystyrene spheres	105	102.1	4.4

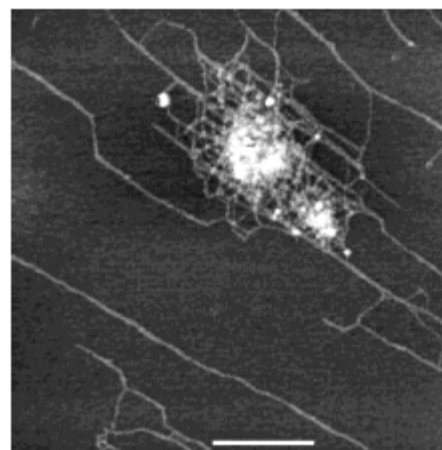
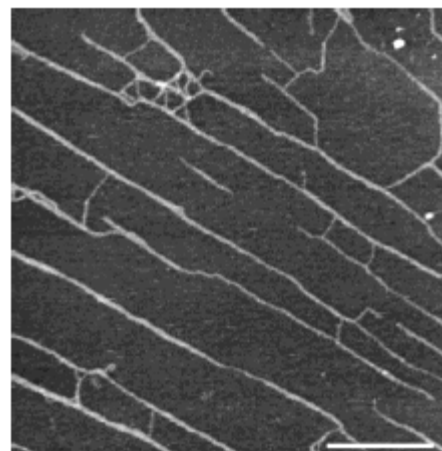
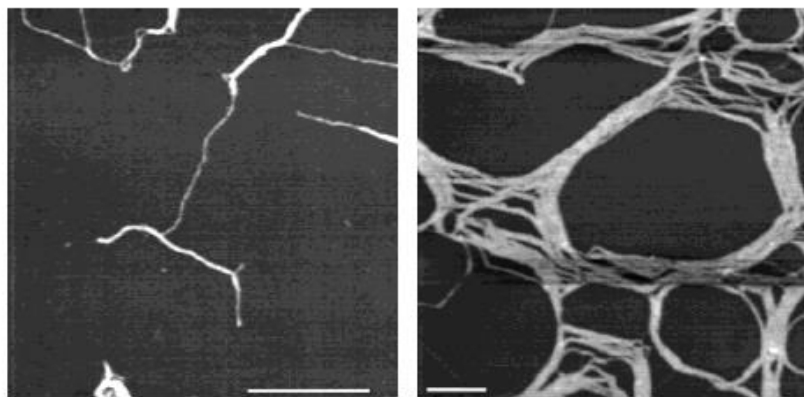


FIGURE 3 (top) NCAFM image of unsolicited schizophyllan in the native, triple-helical form. Sample prepared by drop deposition. Scale bar = 500 nm. (bottom) Another image of the same sample shown in (top) showing a larger aggregate. Scale bar = 500 nm.

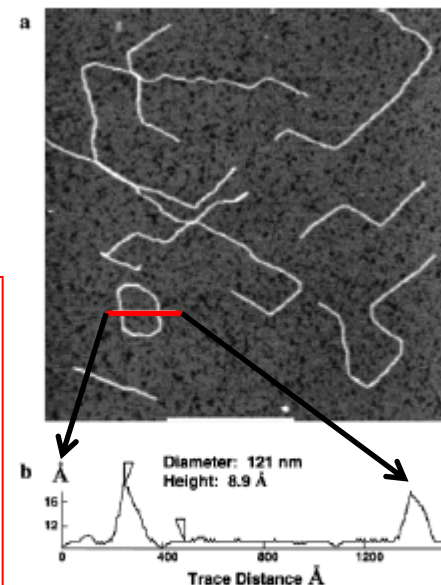
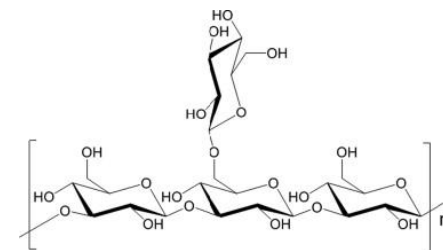


FIGURE 1 (a) NCAFM image of unsolicited scleroglucan in the native, triple-helical form. Sample prepared by aerosol spray deposition. Scale bar = 400 nm. (b) A trace through one cyclic scleroglucan molecule (indicated by white line) showing vertical height and diameter of circle.



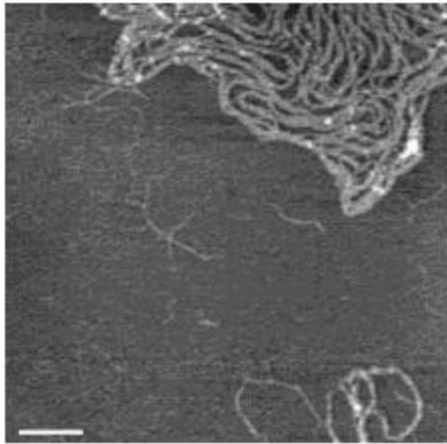


FIGURE 9 NCAFM image of purified collagen diluted in water at room temperature and prepared by aerosol spray deposition. Scale bar = 200 nm

Conclusions....

it provides a fast, reliable, and reproducible method for assessing the size and shape distributions of individual macromolecules and macromolecular assemblies in solution with a minimum of time and effort devoted to sample preparation.

SUPRAMOLECULAR STRUCTURE OF MARINE GEL NETWORK STUDIED BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY AND DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY

Tea Mišić^a, Vesna Svetličić^{a*}, Vera Žutić^a, Ranieri Urbani^b, Beate Boulgaropoulos^c

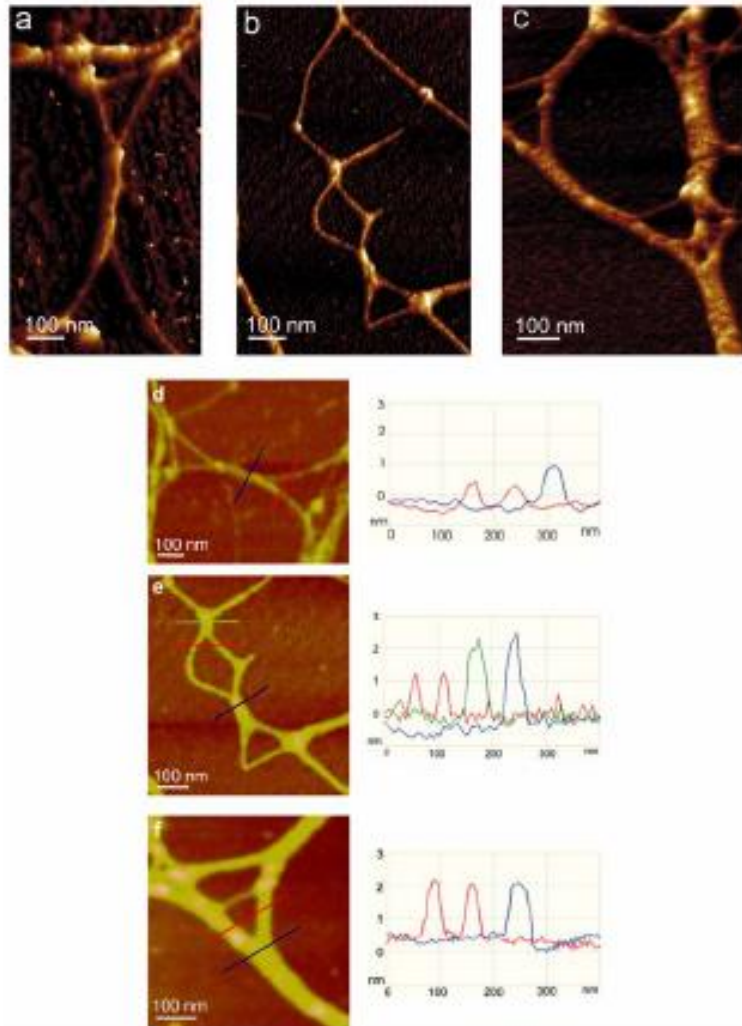


Figure 7

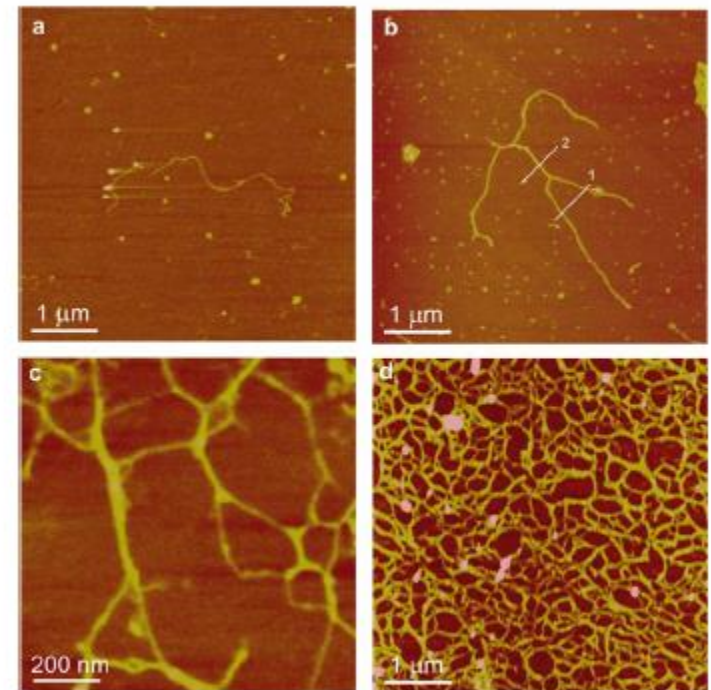


Figure 11

Campioni di aggregati marini

Figure 4. Evolution of polymer networks in the macroscopic gel phase from (a) to (c): early stage of gel phase formation (a) to condensed gel network of older macroaggregate (c). AFM images are acquired in contact mode and presented as height data, scan size $4\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m}$.

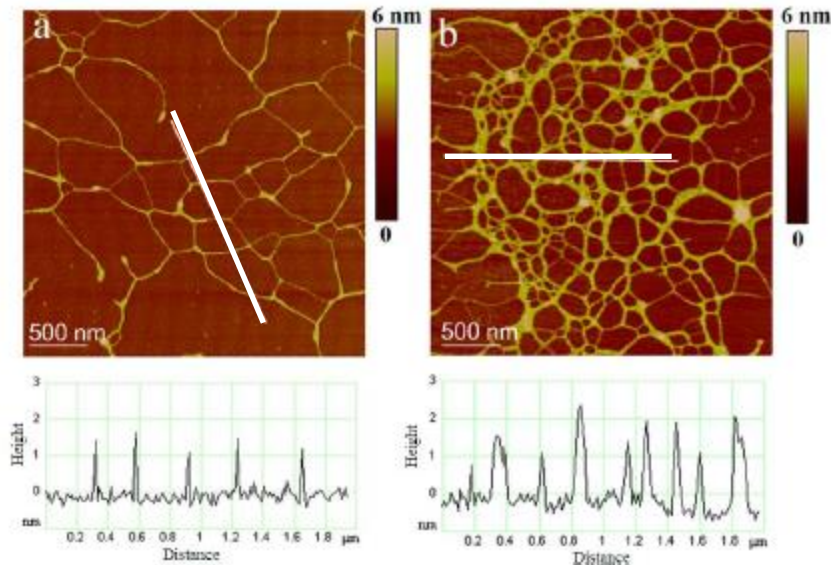
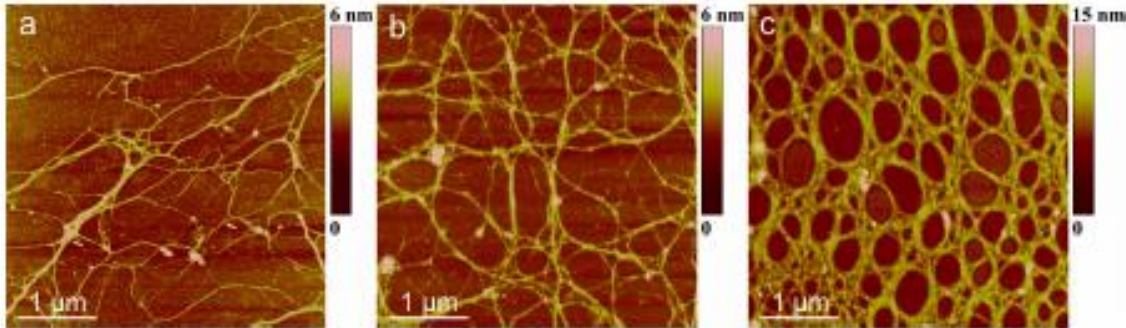
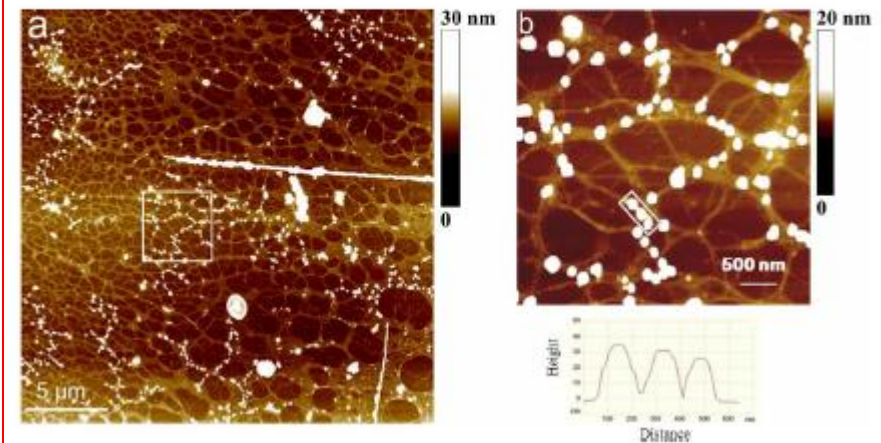


Figure 5. The pattern of nanoparticles distribution in gel network of macroaggregate sample: (a) scan size $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$ and (b) indicated area imaged at higher resolution (scan size $4\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m}$) together with the height profile of particles. AFM images are acquired in contact mode and presented as height data.



2.4.1 Confronto tra microscopia a forza atomica e microscopie elettroniche a scansione e a trasmissione

Il microscopio a forza atomica completa gli studi di microscopia elettronica che normalmente vengono condotti sui polimeri per studiarne la morfologia. Tuttavia, il microscopio a forza atomica presenta diversi vantaggi rispetto al microscopio elettronico a scansione (SEM) e quello a trasmissione (TEM). Ad esempio, l'AFM produce un reale profilo tridimensionale della superficie, ma soprattutto diversamente dal SEM e dal TEM, i campioni analizzati da un AFM non richiedono nessun trattamento speciale (metallizzazione, grafitizzazione, trattamento con agenti di contrasto), che potrebbe modificare o distruggere irrimediabilmente la superficie del campione. Inoltre, mentre il funzionamento corretto del microscopio elettronico necessita di un costoso ambiente sottovuoto, la maggior parte delle modalità operative del microscopio a forza atomica funzionano perfettamente in ambiente normale o perfino in un ambiente liquido. Ciò lo rende un ottimo strumento per lo studio di macromolecole biologiche e di organismi viventi.

Il principale svantaggio del microscopio a forza atomica rispetto al microscopio elettronico a scansione consiste nelle dimensioni dell'immagine. Il SEM è in grado di mostrare un'area dell'ordine del millimetro quadrato ed una profondità di campo dell'ordine del millimetro. Il microscopio a forza atomica può, invece, riprodurre solo una profondità dell'ordine del micrometro ed un'area massima di circa 100 per 100 micrometri. Inoltre, l'elevata risoluzione e la qualità delle immagini AFM sono limitate dal raggio di curvatura della sonda; pertanto, una scelta errata della sonda può portare anche alla formazione di artefatti. D'altra parte l'AFM non è in grado di analizzare le immagini altrettanto velocemente di un SEM; per effettuare la scansione di un'area sono necessari diversi minuti, mentre un SEM, una volta effettuato il vuoto nella colonna, è in grado di esplorarla quasi in tempo reale.