



UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

FACOLTÀ DI INGEGNERIA
Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione
Corso di Laurea Triennale in Ingegneria Biomedica

*Sviluppo e ottimizzazione del Microscopio a Scansione Microonde invertito
per applicazioni in campo biologico*

*Development and optimization of inverted Scanning Microwave Microscope for
biological application*

TESI DI LAUREA

Relatore:
Prof. Ing. Marco Farina

Tesi di Laurea di:
Elisa Simonelli

Correlatore:
Eleonora Pavoni

Anno Accademico 2018/2019

Ai miei nonni e ai miei genitori, che mi hanno insegnato a non arrendermi mai.

A zio Massimo, che è stato e sempre sarà il mio “fratello maggiore”.

A Cristina, il mio grillo parlante e il suo terrorismo psicologico.

A me, che non ho mai mollato e continuerò a lottare in ciò in cui credo.

ABSTRACT TESI

La microscopia “a scansione di sonda” comprende e descrive una classe di microscopi in cui una sonda, muovendosi vicino ad una superficie, rileva morfologia e proprietà dei campioni in esame. Le interazioni rilevate sono specifiche per ogni singola tecnica, ad esempio esistono microscopi a forza atomica (AFM) e ad effetto tunnel (STM). La tecnica a scansione di sonda può essere immaginata, semplificando, come una puntina di un giradischi che riproduce le corrugazioni e la topografia della superficie su cui striscia, in un certo senso “tastandola”. Con tali microscopi sono stati ottenuti risultati scientificamente rilevanti, immagini di molecole e di singoli filamenti di DNA ne sono un esempio. Inoltre, diversamente dal noto microscopio elettronico, essi sono in grado di effettuare immagini di cellule vive, nel loro ambiente fisiologico, con minima invasività.

A partire dagli SPM è stato sviluppato un nuovo tipo di microscopio, chiamato microscopio a microonde (SMM), in cui un segnale radio ad alta frequenza è introdotto attraverso la sonda; tale segnale è sensibile ad alcune proprietà fisiche (*e.g.* costante dielettrica e conducibilità), a loro volta legate alla composizione chimica del campione. Un’ulteriore peculiarità del microscopio a microonde è la capacità di “vedere” oltre lo strato superficiale, grazie alla capacità di penetrazione delle onde elettromagnetiche, potenzialità che ne rende interessante l’applicazione in campo biologico. Nonostante la biocompatibilità e l’esclusività delle analisi SMM, non esistono ad oggi risultati di rilievo in campo biologico a causa dei problemi che il microscopio riscontra nel lavorare in ambienti liquidi e salini, come i buffer necessari per tenere in vita le cellule. Alcuni mesi fa, presso il laboratorio di Microscopia del Dipartimento di Ingegneria dell’Informazione è stato sviluppato un nuovo microscopio SMM, chiamato SMM invertito (iSMM), che risolve per la prima volta i problemi di compatibilità con l’ambiente fisiologico e può essere utilizzato in qualsiasi laboratorio fornito di microscopio a scansione di sonda. Obiettivi di questo progetto di tesi sono l’implementazione e il successivo impiego di iSMM che, essendo ancora nella fase embrionale, ha enormi potenzialità. Questa tesi tratta dello studio del rapporto segnale rumore (SNR) e della sensibilità del segnale microonde lungo la slot line impiegata nel nuovo iSMM.

ABSTRACT

The term scanning probe microscopy (SPM) describes a series of techniques in which a probe traces a surface to detect the morphology and other properties of a sample. The most well-known examples are the atomic force (AFM) and the scanning tunneling (STM) microscopy that make use different physical/chemical parameters to create the images. The SPM techniques can be compared to a gramophone whose tip is able to reproduce the corrugations of the underlying surface. Scanning probe microscopes can reach atomic resolution allowing the imaging of single molecules. Moreover, SPM has been used to probe live cells in their physiological environment and in a non-invasive way, contrary to electron microscopes.

Recently, a new type of scanning microscopy, called scanning microwave microscopy (SMM), was developed. SMM uses a high frequency signal to study the physical properties of samples; this technique allows the evaluation of parameters related to the chemical/physical characteristics of the samples, *e.g.* dielectric constant and conductivity. The uniqueness of SMM is also linked to the ability of the electromagnetic waves to penetrate, to some extent, under the material surface, allowing the subsurface “imaging”. The above described peculiarities make the SMM an ideal instrument for biological applications; however, to date, there are no significant results in this field mainly due to its incompatibility with physiological environments. A few months ago, the Microscopy Laboratory at the Department of Information Engineering introduced a new SMM microscope, called inverted-SMM (i-SMM), which is able to overcome the barrier of biological solutions. Aims of the thesis project are the implementation and subsequent use of iSMM which, being still in the embryonic stage, has enormous potential. This thesis deals with the study of the signal-to-noise ratio (SNR) and the sensitivity of the microwave signal along the slot line used in the new iSMM.

Sommario

Introduzione	7
CAPITOLO 1: MICROSCOPIA A SCANSIONE DI SONDA	8
1.1: CARATTERISTICHE GENERALI DELLE TECNICHE SPM.....	8
1.2: MICROSCOPIA A SCANSIONE DI TUNNEL (STM).....	14
1.3: MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA (AFM)	17
2: MICROSCOPIA A SCANSIONE DI MICROONDE	21
2.1: CARATTERISTICHE GENERALI SMM.....	21
2.2: SMM CONVENZIONALE	23
2.1: SMM INVERTITO	27
CAPITOLO 3: RISULTATI	29
3.1: STRUMENTAZIONE E ANALISI SENSIBILITA' LUNGO LA LINEA.....	29
3.2: SCANSIONE AFM/iSMM.....	33
CONCLUSIONI.....	34
BIBLIOGRAFIA	35

Introduzione

Il presente lavoro è il risultato dell'esperienza di tirocinio sperimentale avvenuta presso il Laboratorio di Microscopia del Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione dell'Università Politecnica delle Marche.

L'obiettivo macroscopico è stato quello di ottimizzare il microscopio invertito a microonde, poiché sviluppato recentemente presso il laboratorio dal Professor Farina. In questo periodo di tirocinio si è cercato di potenziare il microscopio invertito a microonde per ottenere, in futuro, analisi ed immagini di campioni biologici importanti per le ripercussioni in ambiti quali le nanotecnologie e la fisiologia.

L'obiettivo specifico di questo lavoro riguarda lo sviluppo e l'ottimizzazione del microscopio invertito a microonde in condizioni ambientali standard mediante accoppiamento con tecniche di microscopia a scansione di sonda (SPM), in particolare con la microscopia a forza atomica (AFM), particolarmente interessante nel campo biologico.

Nel capitolo 1 si ripercorreranno le principali tappe dello sviluppo della microscopia a scansione di sonda focalizzando le tecniche STM e AFM.

Nel capitolo 2 si introducono le principali motivazioni che hanno portato allo sviluppo del microscopio invertito a microonde e le proprie caratteristiche principali confrontandolo con il microscopio a microonde convenzionale.

Nel capitolo 3 si evidenziano le prime analisi effettuate sul microscopio a microonde invertito con particolare attenzione alla sensibilità del nuovo dispositivo.

CAPITOLO 1: MICROSCOPIA A SCANSIONE DI SONDA

1.1: CARATTERISTICHE GENERALI DELLE TECNICHE SPM

La microscopia a scansione di sonda (SPM) è una delle potenti tecniche di ricerca che permettono di studiare la morfologia e le proprietà locali dei corpi solidi con alta risoluzione spaziale. Attualmente, quasi ogni ricerca in fisica delle superfici e nella tecnologia dei film sottili fa uso delle tecnologie SPM. Il microscopio a scansione ad effetto tunnel (STM) è stato il primo nella famiglia degli SPM e fu inventato nel 1981 dagli scienziati svizzeri Gerd Binnig e Heinrich Rohrer [1, 2]; il microscopio STM è uno strumento semplice ed efficace per investigare superfici ed è caratterizzato da risoluzione spaziale che può raggiungere dimensioni atomiche. In seguito, sono stati sviluppati altri microscopi SPM, ad esempio il microscopio a forza atomica (AFM) e molti altri dispositivi con principi di funzionamento analoghi.

In un microscopio a scansione di sonda, l'analisi di microstrutture superficiale e delle proprietà locali avviene in un microscopio a scansione di sonda utilizzando speciali sonde appuntite a forma di ago. 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 nanometri.

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 applicando una opportuna differenza di potenziale; su diversi tipi di forza si basa il funzionamento dei microscopi a forza atomica, a forza magnetica e a forza elettrica. Prendendo in considerazione le caratteristiche comuni ai vari tipi di microscopi a scansione si può descrivere con un generico parametro P l'interazione che si instaura tra punta e campione. 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.

[3]

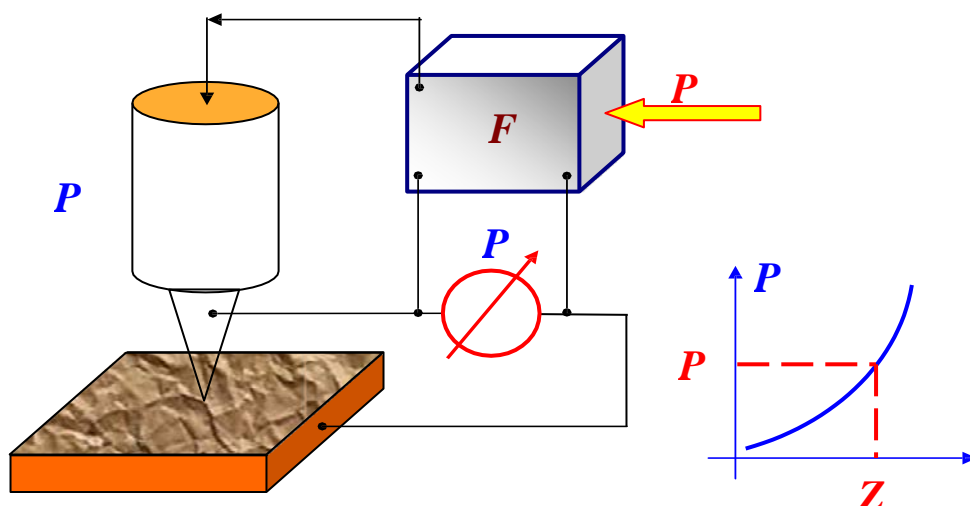


Figura 1. Diagramma a blocchi del sistema di retroazione SPM

Il sistema di retroazione mantiene costante il valore del parametro P ed in particolare uguale al valore P_0 (set-point) impostato dall'operatore. Se la distanza punta-campione cambia, cambia il parametro P . Nel sistema di retroazione il segnale differenziale ($\Delta P = P - P_0$) viene amplificato ed inviato ad un trasduttore piezoelettrico (PT) che controlla la distanza punta-campione. Il trasduttore usa il segnale ΔP per cambiare la distanza e riportarla verso il valore iniziale P_0 , corrispondente ad un segnale differenziale nullo. In tal modo è possibile controllare la distanza punta-campione con grande accuratezza.

In SPM reali l'accuratezza nel controllo della distanza punta-campione raggiunge il valore $\sim 0.01 \text{ \AA}$. Quando la punta scansiona la superficie del campione la particolare topografia superficiale del campione stesso provoca una variazione nel parametro di interazione P , e il sistema di retroazione ristabilisce il valore impostato della distanza punta-campione ovvero del parametro di interazione ($P=P_0$) in tempo reale, cosicché quando la punta si sposta su una posizione (x,y) sulla superficie, il segnale $V(x,y)$ fornito al trasduttore è proporzionale alla distanza della superficie dal piano ideale X , $Y(z=0)$. Questo rende possibile usare i valori $V(x,y)$ per mappare la topografia superficiale, ed ottenere una immagine SPM. [3]

Durante la scansione la punta si muove lungo una linea (*line scan*) e il valore del segnale fornito al trasduttore, proporzionale al valore dell'altezza nella topografia della superficie, viene registrato nella memoria di un computer.

Successivamente la punta torna all'inizio della linea ed inizia a muoversi lungo la successiva linea di scansione (*frame scan*), ed il processo si ripete. Il segnale di retroazione memorizzato durante la scansione viene elaborato dal computer per ottenere una immagine topografica $Z = f(x, y)$ che viene riprodotta sul monitor. Oltre all'analisi topografica della superficie, i microscopi a scansione permettono analisi di altre proprietà: meccaniche, elettriche, magnetiche, ottiche. Per consentire il

funzionamento di un SPM è necessario poter controllare la distanza punta-campione e spostare la punta sopra il campione con grande accuratezza (a livello di frazioni di nm). Questo problema è risolto con l'utilizzo di speciali trasduttori, o dispositivi di scansione (scanners). Lo scanner di un microscopio è fatto di materiale piezoelettrico. I materiali piezoelettrici cambiano dimensioni quando sottoposti a campo elettrico. L'equazione che definisce l'effetto piezoelettrico inverso è:

$$u_{ij} = d_{ij}E_k$$

dove u_{ij} è il tensore deformazione, E_k le componenti del campo elettrico, d_{ij} le componenti del tensore piezoelettrico. I coefficienti piezoelettrici sono definiti dal tipo di simmetria del cristallo. Trasduttori costituiti da piezoceramiche sono comunemente usati in varie applicazioni. La piezoceramica è materiale policristallino polarizzato ottenuto per sinterizzazione da polveri di cristalli ferroelettrici.

Il comportamento alle deformazioni delle piezoceramiche reali non sono mai esattamente proporzionali, sono caratterizzate da una dipendenza non-lineare della deformazione dal campo, cioè dalla tensione di controllo. La deformazione è funzione complessa del campo elettrico

$$u_{ij} = u_{ij}(\vec{E})$$

Che per piccoli valori del campo può essere approssimata ad una funzione polinomiale con d_{ijk}, α_{ijkl} coefficienti piezoelettrici di primo e secondo grado: $u_{ij} = d_{ijk}E_k + \alpha_{ijkl}E_kE_l + \dots$

Un altro difetto delle piezoceramiche è il cosiddetto creep, un ritardo nella risposta ad un improvviso cambiamento nella tensione di controllo. Il creep produce una distorsione nelle immagini SPM. In particolare, l'effetto è notevole all'inizio del processo di scansione e dopo grandi spostamenti dal punto iniziale sull'area di scansione. Per ridurre tali distorsioni si introducono ritardi nel sistema di controllo in modo da compensare in parte i ritardi dello scanner. In figura 2 sono schematizzati i grafici temporali della tensione di controllo e dei corrispondenti spostamenti dello scanner lungo l'asse Z e nel piano X, Y. [3]

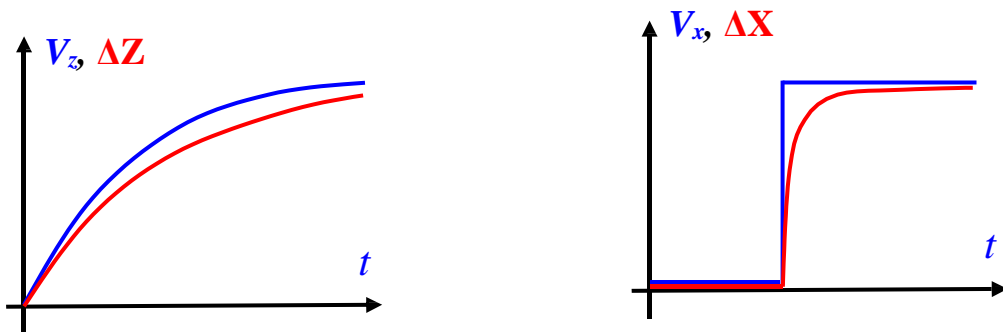


Figura 2. Grafici temporali della tensione di controllo (linea blu) e dei corrispondenti spostamenti dello scanner lungo l'asse Z e l'asse X (linee rosse)

Un altro difetto delle piezoceramiche è la presenza di una isteresi nella funzione di trasferimento $\Delta Z=f(V)$, ovvero la deformazione della piezoceramica dipende dal segno della tensione di controllo usata in precedenza. In altre parole lo spostamento ΔZ descrive, nel piano $(\Delta Z, V)$, una traiettoria a curva chiusa ove valori ΔZ diversi vengono assunti a seconda dei diversi valori della derivata temporale della tensione di controllo dV/dt (Fig. 3). Per evitare distorsioni nelle immagini SPM causate da questa isteresi, i valori vengono memorizzati, durante una scansione, solo quando viene tracciato uno dei due rami della curva $\Delta Z=f(V)$, ad esempio per X crescenti.

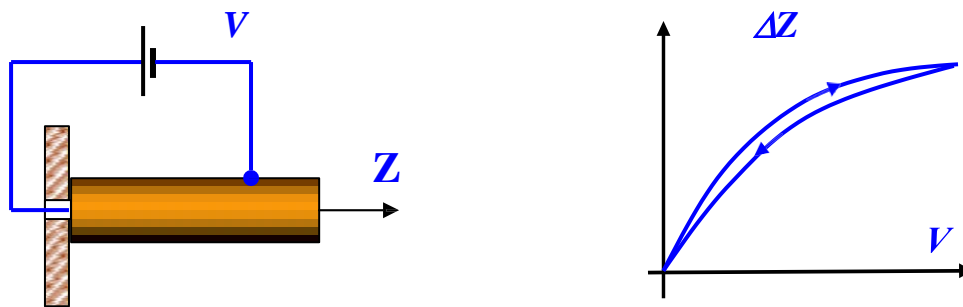


Figura 3. dipendenza dello spostamento Z . Dal valore e direzione del segnale di controllo V

Uno dei requisiti importanti nella microscopia a scansione di sonda è la precisione nei movimenti di punta e campione necessaria per scegliere con accuratezza l'area misurata. Per risolvere questo problema si sono adottati vari dispositivi, tra cui i riduttori meccanici, che trasformano movimenti grossolani in movimenti più piccoli. Tra questi vi è il riduttore a leva in cui la demoltiplicazione del movimento è prodotta dalla differenza tra le lunghezze dei due bracci della leva. Il riduttore a leva scala il movimento del seguente fattore R : $R = \frac{\Delta L}{\Delta l} = \frac{L}{l}$. Maggiore è il rapporto tra il braccio L e il braccio l , maggiore è la precisione con cui si controlla la posizione dell'estremo del braccio l . [3]

Un altro dispositivo frequentemente usato è il riduttore a molla/leva in cui il movimento è scalato sfruttando la diversità della costante elastica nei due elementi in serie. La struttura consiste in una base rigida, una molla con costante elastica k e leva flessibile con costante elastica K . I due elementi sono scelti in modo che sia $k < K$. In questo caso il fattore di scala è dato dal rapporto tra le due costanti elastiche: $R = \frac{\Delta l}{\Delta L} = \frac{K}{k}$. Maggiore è la rigidità della leva rispetto a quella della molla, maggiore è la precisione con cui si può posizionare l'estremo mobile della leva. In ogni microscopio a sonda l'insieme meccanico punta-campione è un sistema oscillante con una sua frequenza di risonanza ω_0 . Vibrazioni meccaniche nell'ambiente esterno a frequenza ω_0 , possono eccitare la

risonanza della testa di misura, producendo fluttuazioni nella distanza punta-campione che sono osservabili come rumore periodico nelle immagini SPM del campione. Gli scanner, che fanno parte della testa di misura, hanno in generale frequenze di risonanza inversamente proporzionali all'area di scansione massima. Nel progettare un SPM è necessario raggiungere un compromesso tra le dimensioni dell'area scansionabile e la frequenza di risonanza dello scanner. Valori tipici per la frequenza di risonanza di uno scanner sono tra 10 kHz e 100 kHz. Nei sistemi antivibrazione si possono distinguere sistemi attivi e sistemi passivi. Il principio su cui si basano i sistemi antivibrazione passivi è il seguente. L'ampiezza delle oscillazioni forzate in un sistema meccanico decade rapidamente a frequenze molto lontano dalla frequenza di risonanza ω_k e dalla frequenza di eccitazione. Scansionare una superficie con un SPM è come muovere il fascio di elettroni nel tuo catodico di un televisore. La punta segue una linea prima in una direzione e poi in direzione opposta in una scansione orizzontale (*line scan*), quindi passa alla linea successiva (*frame scan*). Il movimento della punta è prodotto, in piccoli passi, dallo scanner che è pilotato da un segnale a dente di sega prodotto da convertitori analogico-digitali (ADC). [3]

L'informazione raccolta dall'SPM durante la scansione è immagazzinata come archivio dati bidimensionale costituito da numeri a_{ij} (matrice). Il significato fisico di questi numeri è determinato dal tipo di interazione che è stata misurata durante la scansione. Ad ogni coppia di indici ij corrisponde un singolo punto della superficie entro l'area scansionata. Le coordinate dei punti dell'area campionata sono calcolate moltiplicando i corrispondenti indici per il valore della separazione tra i punti:

$$x_i = x_0 i, \quad y_j = y_0 j.$$

Nella rappresentazione 2D (o *Top View*) ad ogni punto della superficie $Z=f(x,y)$ è assegnato un colore (o una luminosità) che corrisponde al suo valore in z in base ad una particolare scala di colori (o scala di grigi). Il significato fisico di una immagine SPM dipende dal parametro che si è usato dell'anello di retroazione. Ad esempio il valore memorizzato nella matrice $Z=f(x,y)$ può dipendere dalla corrente elettrica che ha attraversato il contatto punta-campione, polarizzato a tensione costante, o può dipendere dalla principale forza di interazione tra punta e superficie (elettrica, magnetica, etc.). Oltre a queste "mappe" della interazione punta-campione nell'area scansionata, con un SPM si possono ottenere altri tipi di informazione: in un singolo punto della superficie del campione si può misurare la dipendenza della corrente di tunnel dalla tensione di polarizzazione, oppure la dipendenza della forza di interazione dalla distanza punta-superficie, etc. Queste informazioni vengono memorizzate in un file dati come matrice di dimensione $2 \times N$, che può essere tracciato su monitor, o stampato, o

esportato per ulteriori manipolazioni su PC. Le immagini SPM possono essere affette da diversi tipi di distorsioni, dovute ad imperfezioni dell'apparato o a vari tipi di effetti dovuti ad interazioni con l'ambiente. Le distorsioni più comuni possono essere: una componente costante, il piano di inclinazione, le imperfezioni dovute allo scanner, il rumore elettronico, l'instabilità del contatto punta-campione e il rumore indotto da vibrazioni esterne. Sono distorsioni di cui il PC ne tiene conto ed applica le correzioni dovute attraverso filtri e equazioni standardizzate. [3]

1.2: MICROSCOPIA A SCANSIONE DI TUNNEL (STM)

Il primo microscopio a scansione di sonda, storicamente, fu il microscopio ad effetto tunnel: gli elettroni attraversano una sottile barriera di potenziale che si instaura tra una punta metallica e un campione conduttivo posti ad una distanza di pochi nm. L'altezza della barriera di potenziale è determinata dai potenziali di estrazione degli elettroni dalla punta al campione e si può approssimare la forma della barriera con un rettangolo di altezza pari al valor medio dei due potenziali di estrazione:

$$\varphi^* = \frac{1}{2}(\varphi_T + \varphi_S)$$

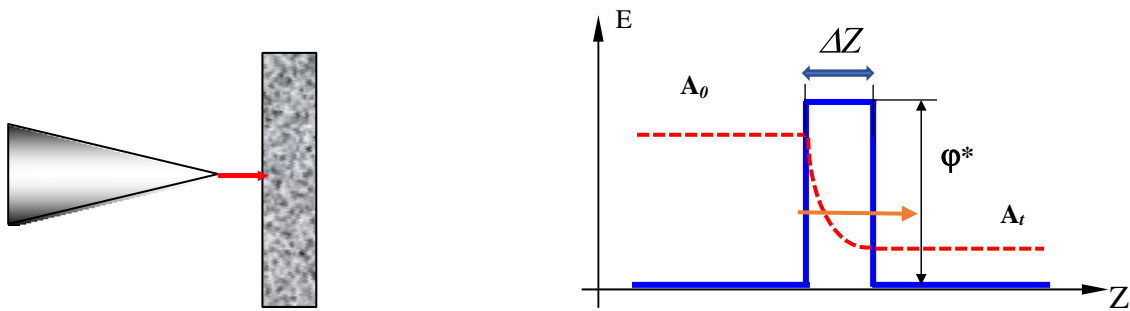


Figura 4. Tunneling elettronico attraverso una barriera di potenziale in STM

In meccanica quantistica il coefficiente di trasmissione [4, 5] attraverso una barriera rettangolare è $W = \frac{|A_t|^2}{|A_0|^2} \cong e^{-k\Delta Z}$ dove A_0 è ampiezza della funzione d'onda incidente sulla barriera A_t è la funzione d'onda trasmessa, k il coefficiente di attenuazione della funzione d'onda entro la barriera e ΔZ è la larghezza della barriera. [3]

In un'approssimazione monodimensionale [6,7], la densità di corrente tunnel tra due metalli vale:

$$j_t = j_0[\varphi^* \exp(-A\sqrt{\varphi^*}\Delta Z) - (\varphi^* + eV) \exp(-A\sqrt{\varphi^* + eV}\Delta Z)]$$

Poiché la dipendenza esponenziale è molto forte si può approssimare la densità di corrente con una formula ancora più semplice, utile per le valutazioni qualitative: $j_t = j_0(V) \exp(-\frac{4\pi}{h} \sqrt{2m\varphi^*} \Delta Z)$. Questa relazione esponenziale permette di controllare la distanza punta-campione con grande accuratezza.

Un STM è un sistema con retroazione negativa che mantiene la corrente di tunnel costante controllata dall'operatore, quindi controlla la distanza punta-campione, muovendo la punta lungo l'asse Z mediante attuatore piezoelettrico.

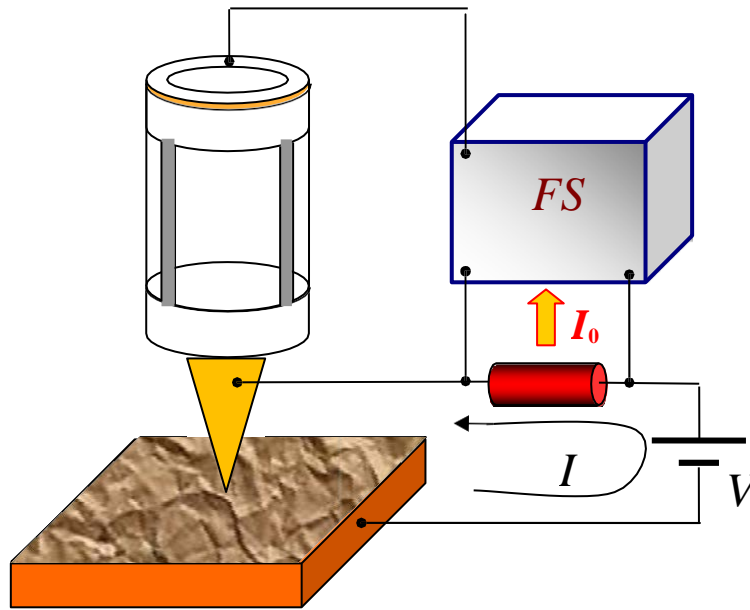


Figura 5. Diagramma a blocchi di un STM

L'immagine topografica della superficie può essere ottenuta in due modi: a corrente costante, in cui la punta si muove sopra la superficie mentre il sistema di retroazione (FS) mantiene costante la distanza punta-campione. Grazie alla dipendenza esponenziale tra la corrente di tunnel e la distanza punta-campione è possibile ricostruire la topografia del campione stesso.

Nella modalità ad altezza costante, utile solo per superfici estremamente piatte, la punta si muove sopra la superficie ad una distanza di alcuni nanometri, le differenze che si registrano in termini di corrente di tunnel vengono utilizzate per ricostruire la topografia del campione. La risoluzione di un STM lungo la direzione verticale è data dalla dipendenza esponenziale della corrente dalla distanza. In (x,y) il microscopio STM può raggiungere una risoluzione atomica, anche se tale risoluzione è fortemente influenzata dalla struttura atomica dell'apice. Una punta è stata adeguatamente affilata permette di avere pochissimi atomi come apice, con dimensione molto minore del raggio di curvatura; in questo modo, la corrente di tunnel fluisce tra gli atomi della punta e del campione permettendo risoluzioni elevate.

Per la natura intrinseca della tecnica STM le immagini dei campioni che si ottengono non sono mai puramente topografiche, ma dipendono dalle proprietà conduttive del materiale e in particolare, dalla densità degli stati elettronici molecolari.[3]

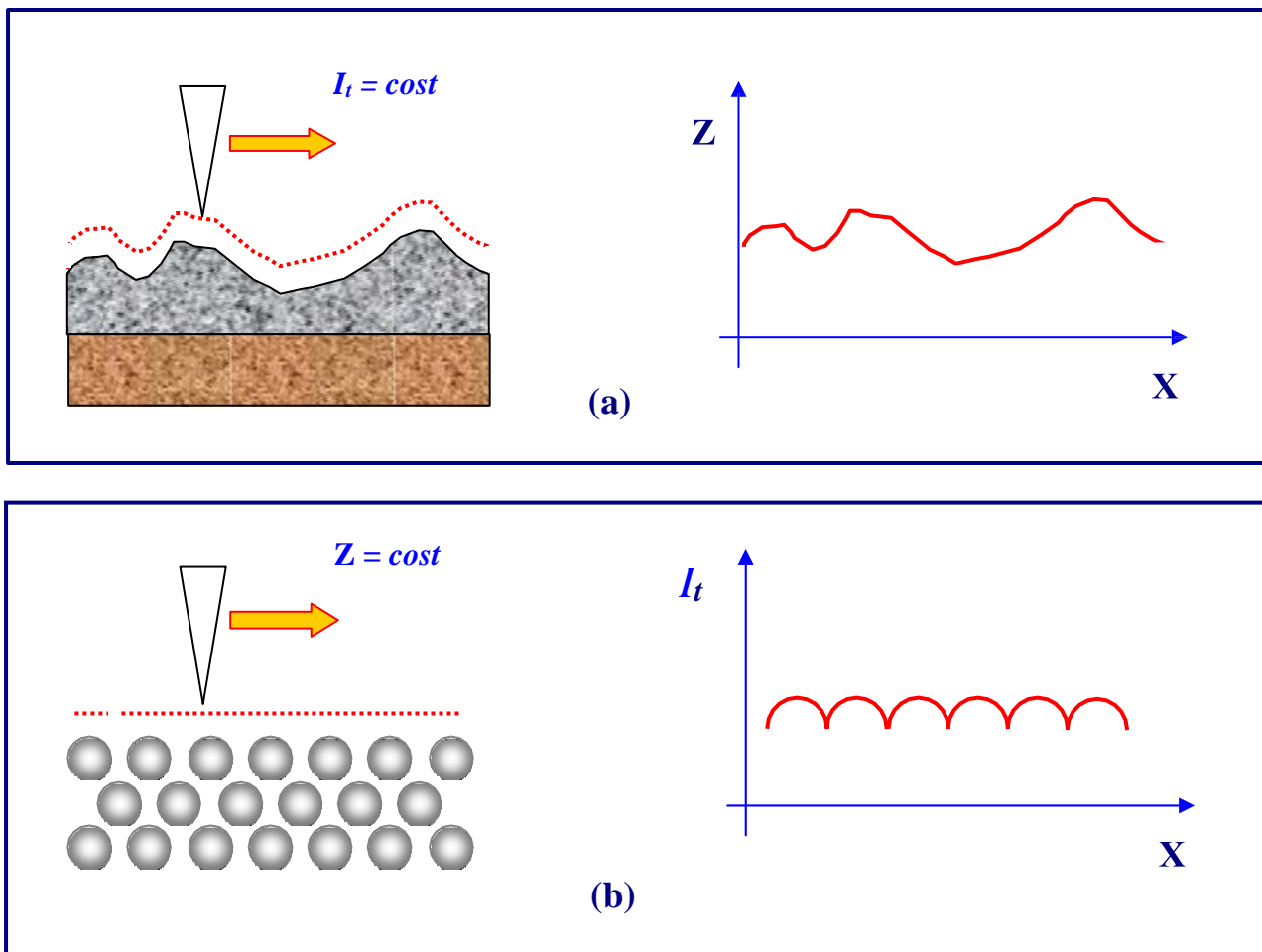


Figura 6. Formazioni delle immagini STM a corrente costante (a) e altezza costante (b)

1.3: MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA (AFM)

La microscopia a forza atomica (AFM) fu inventata da G.Binnig, C.F. Quate e C. Herber nel 1986 [8]. Il principio di funzionamento si basa sulla misura della forza di interazione tra la punta ed il campione, usando sonde costituite da una leva elastica con una punta acuminata posta nell'estremità libera. La forza che viene esercitata sulla punta da parte della superficie comporta la flessione della leva che viene rilevata ed utilizzata per ricostruirne la topografia. La forza di interazione ha una componente normale alla superficie e una laterale. La punta AFM viene attratta per grandi distanze e respinta a brevi distanze della superficie del campione.

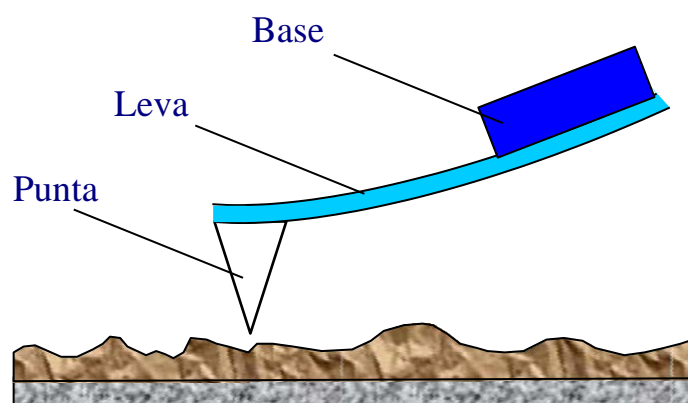


Figura 7. schema di una sonda AFM

L'acquisizione topografica si può effettuare registrando le piccole deflessioni della leva, con la tecnica beam-bounce. Il sistema ottico viene allineato in modo tale che il fascio emesso da un diodo laser viene focalizzato sulla leva e viene poi riflesso verso un sensore ottico costituito da un fotodiodo diviso in quattro settori. Questo tipo di dispositivo ottico può rilevare due tipi di forza: la flessione della leva soggetta a forza attrattiva o repulsiva (DFL) e la torsione dovuta alla componente laterale delle interazioni punta-campione (LF). Differenti valori caratterizzano l'intensità e la direzione dello spostamento della leva.

Il funzionamento dell'AFM può essere esemplificato considerando le forze di van der Waals [9]: l'energia potenziale tra due atomi, posti ad una distanza r l'uno dall'altro, è descritta dal potenziale di Lennard-Jones:

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

Il primo termine descrive la forza attrattiva causata sostanzialmente dalla polarizzazione dipolo-dipolo e il secondo termine descrive la repulsione a corto raggio dovuta al principio di esclusione di Pauli. Il parametro r_0 è la distanza di equilibrio tra gli atomi, dove il potenziale ha un minimo (Fig.8).

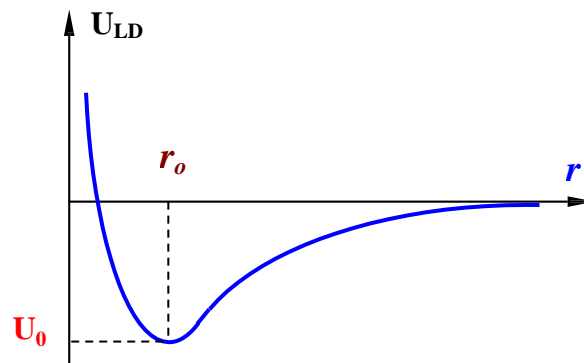


Figura 8. Andamento qualitativo del potenziale di Lennard-Jones

Il potenziale di Lennard-Jones e le forze di Van der Waals sono responsabili della forza di interazione punta-campione [10]; tale forza ha una componente normale alla superficie ed una parallela (che giace nel piano della superficie del campione), la rete di interazione è descritta da una funzione assai più complicata, ma le caratteristiche essenziali restano le stesse: la punta AFM viene attratta, cioè si deflette verso il campione quando la distanza punta campione supera r_0 ; al contrario, quando la distanza punta-campione è inferiore a r_0 la punta viene respinta dalle forze repulsive.

I metodi usati per le acquisizioni di immagini topografiche sono: a contatto oppure a semi-contatto. Nella prima modalità la punta resta in contatto diretto con la superficie, le deflessioni della leva che si originano a causa della morfologia superficiale comportano variazioni del segnale registrato del fotodiodo e permettono la ricostruzione della topografia del campione. Le leve hanno costante elastica piccola per aumentare la sensibilità e ridurre il rischio di eccessiva interazione tra la punta e il campione. [3]

La modalità a contatto si può eseguire sia a forza costante che a distanza costante. Del primo tipo il sistema di retroazione garantisce una flessione costante della leva e di conseguenza una forza di interazione. Una scansione che mantiene una distanza media tra punta e campione è utile per un campione con scarsa rugosità, in questo modo la retroazione è assente e la sonda si muove ad una distanza dal campione in modo costante della leva. Il metodo a contatto viene applicato solo nel caso di superfici rigide, non soggette a deformazione e morfologicamente non troppo corrugate.

Durante l'avvicinamento alla superficie la punta entra nel campo delle forze attrattive (di tipo Van der Waals), provocando una flessione verso la superficie, il balzo della punta contro la superficie è dovuto al forte gradiente della forza attrattiva in prossimità della superficie (Fig 9). Avvicinando ulteriormente la sonda al campione la punta inizia a sentire una forza repulsiva, tale da flettere la leva in direzione opposta (Fig. 10). La pendenza della curva $\Delta Z = f(z)$ in questa regione è determinata dalle proprietà elastiche sia della leva che del campione. Se l'interazione è perfettamente elastica la curva registrata durante l'allontanamento della sonda dal campione coincide con quella registrata in avvicinamento. Nel caso di campioni plastici (o biologici) o per campioni coperti da uno strato sottile di materiale assorbito, la forma della curva $\Delta Z = f(z)$ è più complicata e dipende da effetti di plasticità o capillarità. Inizialmente si allinea il sistema ottico, focalizzando il fascio laser sulla leva, massimizzando la corrente totale del fotodiodo e minimizzando la differenza delle correnti prodotte dai settori contrapposti ($DFL=0$, $LF=0$), durante la scansione il segnale differenziale del fotodiodo è mantenuto costante dalla retroazione e il segnale che pilota l'elettrodo dello scanner risulta proporzionale alla quota topografica della superficie. Lo svantaggio dell'acquisizione AFM in contatto meccanico tra punta e campione è il rischio di danneggiamento della punta, o del campione, nel caso si tratti di materiale soffice (organico o biologico), ideale in tal caso l'utilizzo di una leva oscillante, poiché riducono l'interazione punta-campione e consentono di misurare un maggior numero di proprietà locali della superficie.

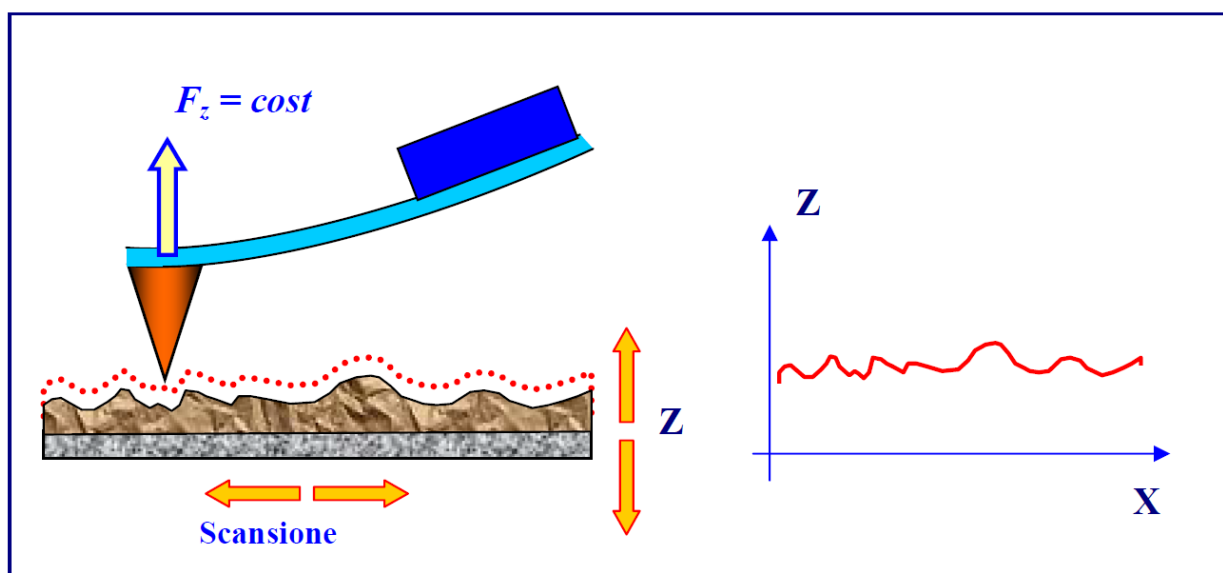


Figura 9. Immagine AFM acquisita a forza costante

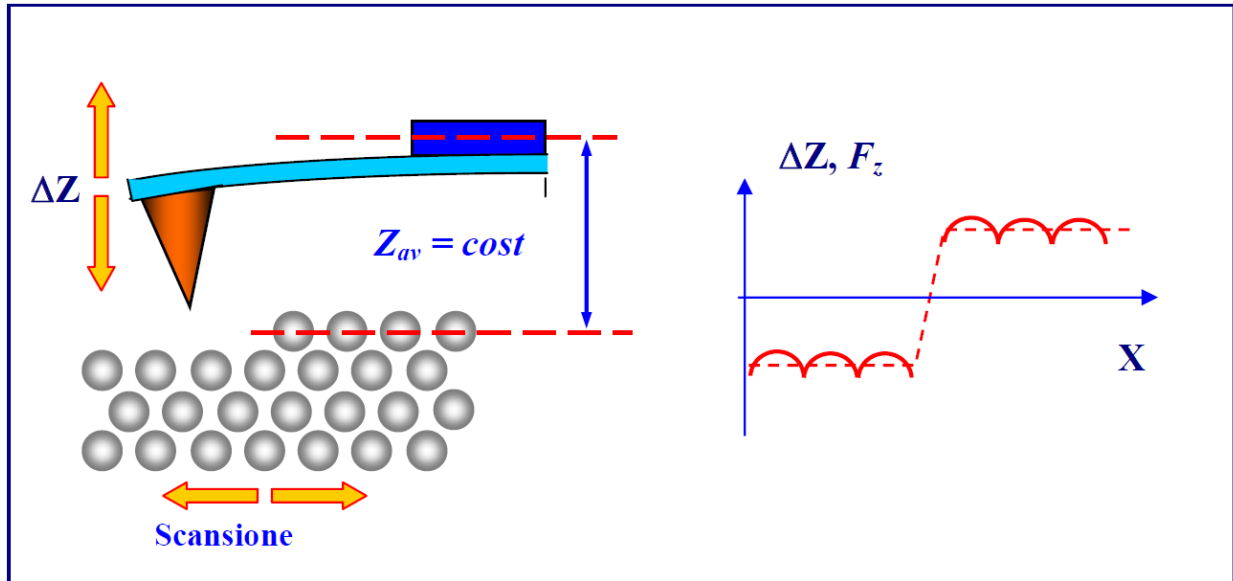


Figura 10. Immagine AFM acquisita a distanza media costante (o altezza costante)

Nella modalità a semi-contatto la leva viene fatta oscillare alla propria frequenza caratteristica (frequenza di risonanza) caratterizzata da una sua fase a ampiezza. Durante l'avvicinamento della leva al campione, l'ampiezza di oscillazione della leva viene smorzata, di un fattore deciso dall'utente, sempre mantenendo costante la frequenza di risonanza. Durante la scansione vengono registrate variazioni dell'ampiezza e della fase di oscillazione della leva che derivano da: le forze di interazione di van der Waals unite alla forza elastica che si aggiunge durante il contatto. L'ampiezza e la fase delle oscillazioni dipendono dall'interazione punta-campione, in un'oscillazione stazionaria l'energia fornita al sistema in un ciclo uguaglia l'energia dissipata in un ciclo. Durante l'acquisizione dell'immagine in semi-contatto il piezo eccita la leva in prossimità alla frequenza di risonanza con ampiezza A_ω . Durante la scansione la retroazione mantiene costante l'ampiezza di oscillazione al valore A_0 , impostato dall'operatore. La tensione fornita dall'anello di retroazione viene memorizzata come immagine topografica, contemporaneamente, viene memorizzata la variazione dello sfasamento come immagine a “contrasto di fase”. [3]

2: MICROSCOPIA A SCANSIONE DI MICROONDE

2.1: CARATTERISTICHE GENERALI SMM

La microscopia a scansione a microonde in campo vicino (SMM) permette di mappare su scala nanometrica proprietà fisiche quali ad esempio l'impedenza, la capacità e la costante dielettrica dei materiali in esame. La tecnica prevede che la sonda dei microscopi SPM funga anche da sorgente a microonde, quindi la sonda SPM ha una duplice funzione: scansiona il campione a distanza di pochi nanometri dalla superficie e lavora come antenna microonde. Le variazioni nell'interazione elettromagnetica fra la sonda e il campione sono misurate osservando le variazioni nel coefficiente di riflessione dell'onda (S_{11}), tramite un analizzatore di reti vettoriale (VNA). [11]

La risposta elettrodinamica della sonda SMM è ottenuta dalla capacità del campo vicino, o dai campi evanescenti, di immagazzinare energia reattiva, elettrica e magnetica, in prossimità del campione. Quando un campione dielettrico o permeabile viene portato nelle immediate vicinanze della punta l'energia cambia, influenzando a sua volta la risposta elettromagnetica del sistema di rilevazione del microscopio.

Le misure quantitative delle microonde sono molto importanti nell'indagine di materiali allo stato solido, poiché le misurazioni possono essere altamente raffinate e precise. La radiazione compresa tra il vicino UV e infrarosso, interagisce con i materiali attraverso interazioni quantistiche che dipendono fortemente dalla lunghezza d'onda utilizzata. D'altra parte, le frequenze di radiazione nel range delle microonde interagiscono con la materia secondo le leggi della fisica "classica".

L'idea originale della microscopia in campo vicino è spesso attribuita a Synge [12], che propose l'utilizzo di uno schermo opaco con un piccolo foro del diametro della lunghezza d'onda (circa 10 nm), tenuto a 10 nm dalla superficie del campione piatto e liscio; il campione, otticamente trasparente, è posizionato sotto l'apertura e la luce trasmessa viene raccolta punto per punto fino ad eseguire una scansione completa del campione. Successivamente vennero svolti calcoli della distribuzione del campo elettromagnetico da Bethe [13] e Bouwkamp [14,15,16]. Solo in seguito vengono sviluppate sonde non risonanti: in questo caso una sonda di trasmissione (coassiale o a guida d'onda) irradia un segnale microonde dall'apertura della sonda, un primo esempio di questo tipo di sonda è stato sviluppato da Brynt e Gunn [17]. Lo sviluppo di microscopi ottici a campo vicino mediante guide d'onda ottiche [18,19] ha stimolato lo sviluppo di nuovi microscopi a microonde; il primo tra questi è stato sviluppato da Fee, Chu, e Hansch misurando il segnale riflesso da una sonda coassiale aperta

e non risonante [20]. Altro tipo di microscopio è stato sviluppato da Golosovsky [21,22] e Bae [23,24].

Punto di forza di ogni microscopia a microonde in campo vicino è la capacità di effettuare misurazioni senza alcun contatto fisico tra la punta ed il campione; tuttavia, ciò richiede che la separazione tra la punta e il campione deve essere mantenuta pressoché costante e del valore di pochi nanometri. Proprio per questo motivo la tecnica SMM viene associata a microscopi a scansione di sonda tra cui la microscopia a forza atomica (AFM) e la microscopia a scansione di tunnel (STM) [11].

2.2: SMM CONVENZIONALE

La tecnica SMM valuta le interazioni che si sviluppano tra la punta e il campione usando un campo evanescente, che decade esponenzialmente dal campione. La SMM è sempre accoppiata ad una tecnica SPM la cui la sonda funge anche da “antenna” per inviare e poi ricevere il segnale microonde. Le microonde, generate e rilevate dal VNA, raggiungono il campione (segnale incidente) e poi tornano indietro (segnale riflesso) dopo l’interazione con il campione stesso.

Un risonatore può essere costruito da un cavo coassiale collegato da un lato ad una sorgente tramite un condensatore di disaccoppiamento, dall’altro alla sonda a sua volta accoppiata al campione durante la misurazione. Il segnale viene riflesso completamente alla sorgente quando l’intensità del parametro di scattering complesso S_{11} è vicina all’unità; se la frequenza emessa della sorgente corrisponde a una delle frequenze risonanti il coefficiente S_{11} è ridotto al minimo, cioè la maggior parte dell’energia è conservata nel risonatore; poiché il parametro S_{11} è misurato direttamente dal sistema, la SMM deve essere utilizzata a queste frequenze di risonanza (oppure a frequenze prossime ad essa). Al contrario, quando non è presente alcun campione, il risonatore ha una condizione al contorno aperta su entrambi i lati.

Imtiaz e Anlage [25] hanno associato un microscopio STM standard (il cui circuito di feedback è stato utilizzato per mantenere la sonda a una determinata distanza dal campione) ad un segnale a microonde, in una configurazione riflettometrica; la misurazione del segnale a microonde riflesso ha così fornito una risoluzione nanometrica. D'altra parte, alcuni autori hanno impiegato la microscopia a forza atomica (AFM) per guidare i circuiti di feedback, usando la punta conduttiva AFM anche come sonda a microonde. Tabib-Azar e Wang [26] hanno sviluppato con successo un sistema simile, in cui la sonda SMM veniva controllata da un AFM, e hanno effettuato l'imaging di cellule mammarie cancerose a 1,8 GHz. Seguendo questa strategia, Han, Tanbakuchi e altri ricercatori di Agilent (ora Keysight) hanno introdotto un "microscopio a scansione di impedenza", sfruttando un VNA e un controller AFM [27,28]. I dispositivi sfruttano l’ampia dinamica attualmente disponibile del VNA e rendono possibili misurazioni quantitative accurate dell'impedenza complessa. Un'eccellente descrizione della tecnologia SMM è riportata nella review di Imtiaz [29].

Generalmente, tutti i sistemi appena descritti sono intrinsecamente a "banda stretta", cioè si utilizza un intervallo di frequenza limitato e si introduce un risonatore o un interferometro per aumentare la sensibilità. Al contrario, un sistema a “banda larga” permette l’esecuzione di indagini spettroscopiche locali mediante le microonde, soluzione particolarmente attraente per applicazioni biologiche. Molte strutture cellulari sono infatti polari o polarizzabili e danno origine ad eccitazione fotonica quando irradiate da un campo

elettromagnetico variabile nel tempo. Il campo elettrico applicato deforma periodicamente la struttura e possono verificarsi risonanze vibrazionali, nell'intervallo di microonde e onde millimetriche (a seconda della struttura, delle dimensioni e dell'elasticità). Un brevetto datato settembre 2009 da Sun *et al.* [9] sfrutta l'assorbimento risonante a microonde dei virus attraverso l'accoppiamento dipolare ai modi acustici; il nuovo dispositivo sarebbe quindi in grado di discriminare diversi virus. Tuttavia, anche senza invocare l'assorbimento risonante a microonde -verosimilmente limitato dai fenomeni di smorzamento-, la SMM in campo vicino consente la misurazione della permittività dielettrica e della conducibilità su base locale [31,32].

Nella strumentazione implementata del professor Farina [33,34,35] e utilizzata presso il laboratorio di microscopia (fig. 1), una punta metallica viene utilizzata per monitorare la corrente di tunnel (STM) e per registrare il segnale a microonde (SMM); in questo modo, il circuito di tunneling viene utilizzato per mantenere una distanza di punta/campione adeguata (pochi nanometri) e la punta metallica funziona anche come “antenna” a microonde. È possibile recuperare variazioni locali dell'impedenza del campione misurando il coefficiente di riflessione sulla sonda a microonde [36]; inoltre, vista la capacità delle microonde di penetrare, in una certa misura, al di sotto della superficie, l'SMM consente l'analisi delle caratteristiche sub-superficiali. Nella nostra implementazione sfruttiamo un VNA, mescolando quindi alcune funzionalità dei sistemi di Imtiaz e Anlage [25] e quella di Keysight [27,28], ma senza usare un risonatore. In questo modo il microscopio SMM registra i dati nella intera gamma di frequenze consentita dal VNA, permettendo la spettroscopia microonde. Nel dettaglio (vedere la rappresentazione schematica nella Fig. 11), il nostro SMM è un sistema a “banda larga” che sfrutta e controlla un microscopio STM commerciale, un solver P47 di NT-MDT e un analizzatore di rete vettoriale Agilent PNA E8361, con larghezza di banda compresa tra 67 GHz e 120 dB di gamma dinamica.

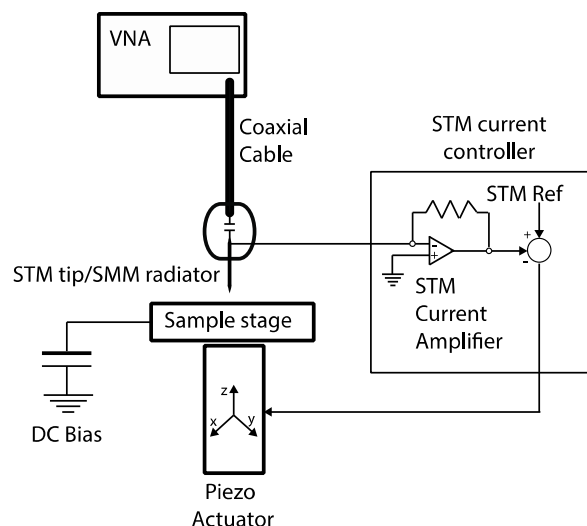


Figura 111. Schema rappresentativo del STM combinato con SMM.

Un VNA collegato direttamente alla punta STM ha aperto la strada a un ampio campo di indagine, come la spettroscopia. Ad esempio, questa tecnica è stata applicata alle cellule tumorali (appositamente trattate) per

accertare la presenza di fullerene incorporato (vedere la discussione riportata di seguito) [34]. La sensibilità del sistema è stata migliorata sfruttando la correlazione delle immagini ottenute a diverse frequenze vicine e usando un ulteriore espediente, la riflettometria nel dominio del tempo [36]. L'idea di riflettometria nel dominio del tempo può essere compresa in termini di "modulazione a spettro allargato" del segnale a microonde; l'informazione, diffusa in uno spettro di frequenze, viene recuperata e fatta collapsare in un singolo istante temporale mediante una trasformata inversa di Fourier. Quindi la manipolazione dei dati aumenta l'immunità al rumore e di conseguenza la sensibilità del sistema. In una misurazione standard, il nostro sistema produce una matrice 3D di dati; le figure sono 256x256 punti spaziali (in x e y) misurati su 512 punti di frequenza (tracciati in z), che possono diventare un insieme arbitrario di punti nel dominio del tempo.

Le peculiarità della SMM possono essere comprese dalla Figure 2 che mostra le cellule MCF7 analizzate dalla nostra SMM/STM tra 16 e 17 GHz [15]. La rappresentazione SMM nel dominio del tempo (Fig. 12a) ha una qualità dell'immagine superiore rispetto a quella STM ottenuta contemporaneamente (Fig. 12b). Inoltre, SMM è in grado di rilevare la presenza di C_{60} nella membrana cellulare; le Figure 12c e 12d mostrano le differenze sistematiche, in termini di impedenza relativa (rispetto all'impedenza caratteristica), tra MCF7 trattate e non trattate con Fullerene [34].

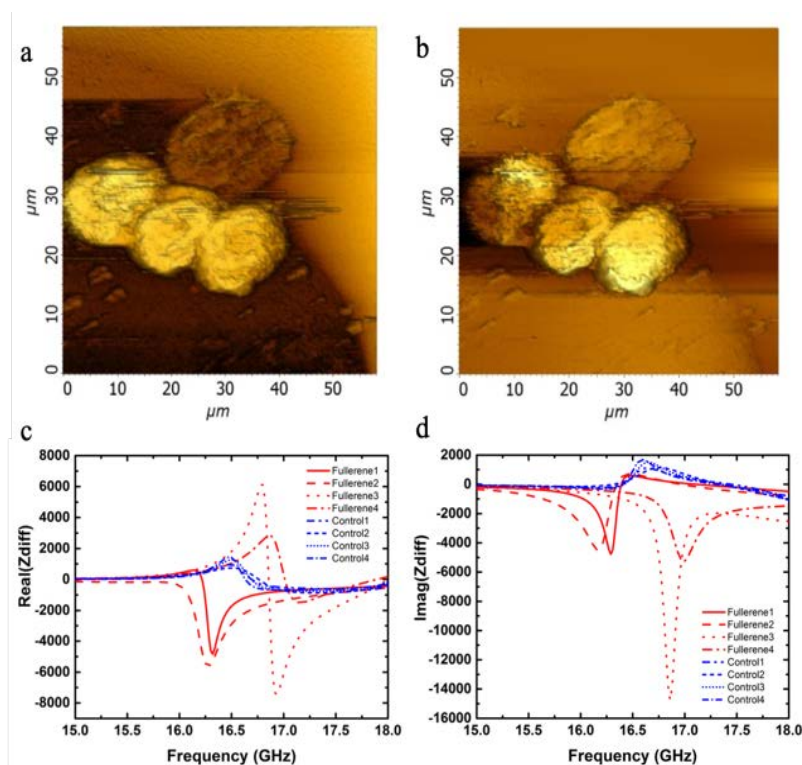


Figura 12: (a) Immagine ottenuta tramite SMM nel dominio del tempo e (b) immagine ottenuta mediante STM di cellule MCF-7 trattate con fullerene; Impedenza relativa: parte reale (c) e immaginaria (d) calcolata da cellule MCF-7 trattate (rosso) e non trattate (blu) con fullerene.

Recentemente, la microscopia SMM basata su SPM ha attratto molti ricercatori in campo biologico e biomedico grazie alla possibilità di misurare parametri come la costante dielettrica dei doppi strati lipidici [37], la permittività elettrica delle singole cellule batteriche [38] e l'impedenza complessa delle cellule CHO e di *E. coli* [39]. Poiché le proprietà elettromagnetiche sono correlate alla struttura chimica dei campioni, la possibilità di operare una spettroscopia elettromagnetica a livello nanometrico sarebbe di estrema rilevanza in biochimica/biofisica, biologia e fisiologia.

Fino ad ora, nonostante le intriganti possibilità appena citate, le applicazioni della SMM sono limitate alla scienza delle superfici e ai materiali semiconduttori, mentre l'utilizzo in campo biologico è estremamente limitato. Ciò è dovuto a diverse ragioni, tra le quali è opportuno sottolineare che tutti i sistemi commerciali (attualmente non più di tre aziende producono SMM) funzionano ad una singola frequenza, impedendo la spettroscopia. In effetti, tutte le SMM commerciali usano un circuito di risonanza per aumentare la sensibilità [40]; questo approccio esclude la SMM a banda larga che è desiderabile perché *i)* fornisce informazioni su tutta una banda di frequenza permettendo la spettroscopia, *ii)* consente di filtrare, nel dominio del tempo, i segnali indesiderati [36] e *iii)* consente la tomografia a microonde, poiché i segnali a frequenze diverse penetreranno nel campione a diverse profondità.

2.1: SMM INVERTITO

Nel laboratorio del Professor Farina è stato progettato un nuovo tipo di microscopio chiamato microscopio invertito a microonde (iSMM), con l'intento di superare i limiti della SMM convenzionale: la struttura è a basso costo, facilmente disponibile ed è compatibile con l'ambiente fisiologico in modo da consentire l'applicazione della SMM anche a sistemi biologici vivi. Inoltre, il sistema lavora a "banda larga", consente la spettroscopia a differenti frequenze e quindi l'analisi nel dominio del tempo.

L'idea principale dell'iSMM è schematizzata nella figura 13: la sonda di scansione conduttiva (AFM o STM) è sempre messa a terra e il segnale microonde viene iniettato attraverso una linea di trasmissione (guida d'onda complanare, slot line) che diventa, in questo modo, il supporto del campione. L'ingresso e l'uscita della linea di trasmissione sono collegati ad un VNA, in modo che sia i segnali riflessi che quelli trasmessi (rispettivamente S_{11} e S_{21}) possano essere misurati [41,42]. Una misurazione a due porte di questo tipo ha di solito un intervallo dinamico di 120-140 dB, il che rende più semplice il rilevamento della piccola perturbazione causata dalla sonda collegata a terra durante la scansione del campione.

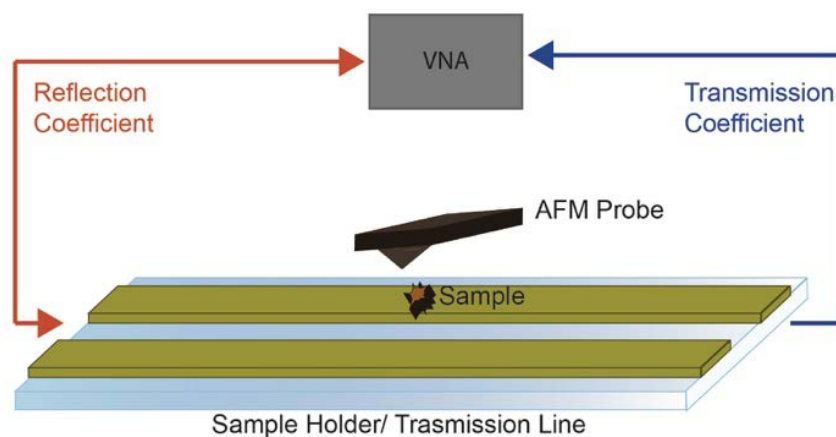


Figura 13. Schema rappresentativo dell'SMM invertito

In passato, sono state proposte misure a due porte usando la sonda per rilevare uno dei due parametri di scattering. Invece, in questo tipo di microscopio invertito, il segnale microonde viene introdotto e rilevato attraverso la linea di trasmissione, mentre la sonda è collegata a terra. Il campione viene posizionato sulla stessa linea di trasmissione e considerando che anche la parte introno è messa a terra, l'interazione parassitaria tra la sonda e il campione viene in questo modo ridotta. L'SMM invertito ha una gamma dinamica più ampia, una maggiore sensibilità e una larghezza di banda più ampia rispetto all'SMM convenzionale.

La microscopia a microonde consente di recuperare le proprietà elettriche locali del campione dai dati ad alta frequenza [38,43]. Grazie, alla flessibilità della configurazione dell'iSMM, è possibile analizzare quantitativamente un'ampia gamma di campioni. Combinando sia l'analisi quantitativa a microonde che la disposizione SMM invertita, diventa possibile la caratterizzazione elettrodinamica non invasiva di cellule vive e strutture subcellulari. [35]

CAPITOLO 3: RISULTATI

3.1: STRUMENTAZIONE E ANALISI SENSIBILITA' LUNGO LA LINEA

La strumentazione utilizzata per l'acquisizione di immagini con microscopio a microonde invertito è quella presente nel laboratorio di microscopia presso il dipartimento di Ingegneria dell'Informazione. Il dispositivo utilizzato è un Solver PRO P47 della NT-MDT per analisi in modalità AFM. Le acquisizioni AFM/iSMM vengono eseguite tramite una testina progettata e realizzata in sede, combinata con un VNA (Agilent Vector Network Analyzer PNAE8361, featuring 67 GHz bandwidth and 120 dB of dynamic range) e un terminale da 50 Ω (come in foto Fig. 14).

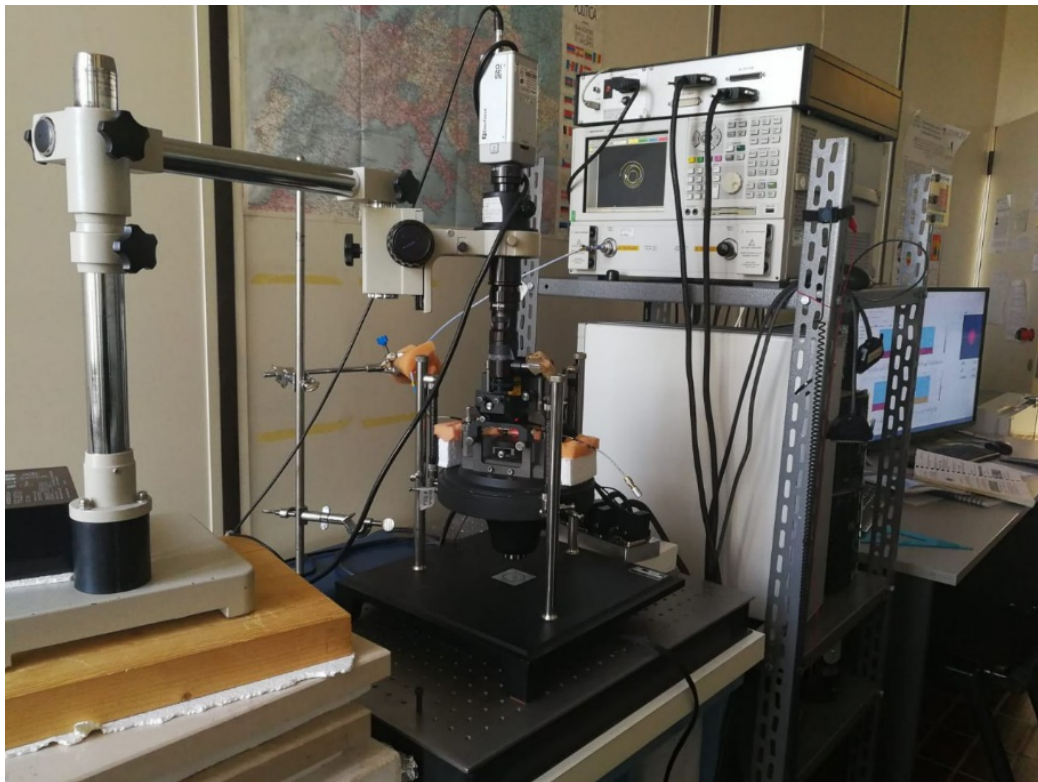


Figura 124. Foto dello strumento in dotazione

Il supporto del campione diventa il nuovo microscopio a microonde, il segnale non viene più iniettato tramite la punta, ma attraverso una slot line in oro (vedi foto riportata in Fig. 15). Il segnale a microonde percorre una delle due linee mentre l'altra è posta a massa. La sonda di scansione percorre la riga di segnale (su cui è adagiato il campione) perturbandone il campo elettromagnetico per permettere l'imaging dei campioni.

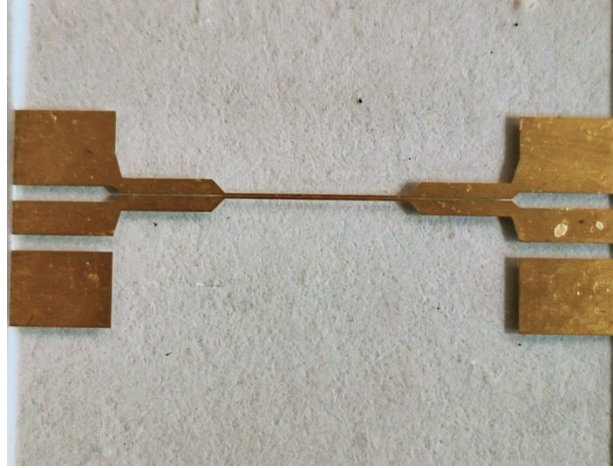


Figura 15. Foto di iSMM, la slot line è supporto del campione e sonda del segnale a microonde.

Al fine di capire se la sensibilità alle microonde del microscopio rimane invariata lungo l'intera linea di segnale, è stato eseguito un controllo del rapporto segnale rumore (SNR) lungo tutta la linea stessa; in particolare, la sensibilità è stata valutata in 7 regioni diverse (rappresentate schematicamente in Fig. 16). Il valore SNR viene calcolato secondo la formula riportata di seguito:

$$SNR(p(f)) = 20 \text{Log} \left(\frac{|\bar{p}_1(f) - \bar{p}_2(f)|}{\sigma(p(f))} \right)$$

in cui $p(f)$ è il valore complesso in termini di S_{11} estrapolato dalla linea d'oro. $p(f)$ viene misurato in due diverse condizioni: quando la sonda si trova in prossimità e poi lontana della linea di segnale (corrispondenti a $p1(f)$ e $p2(f)$) per rivelare i cambiamenti nella risposta elettromagnetica del sistema.

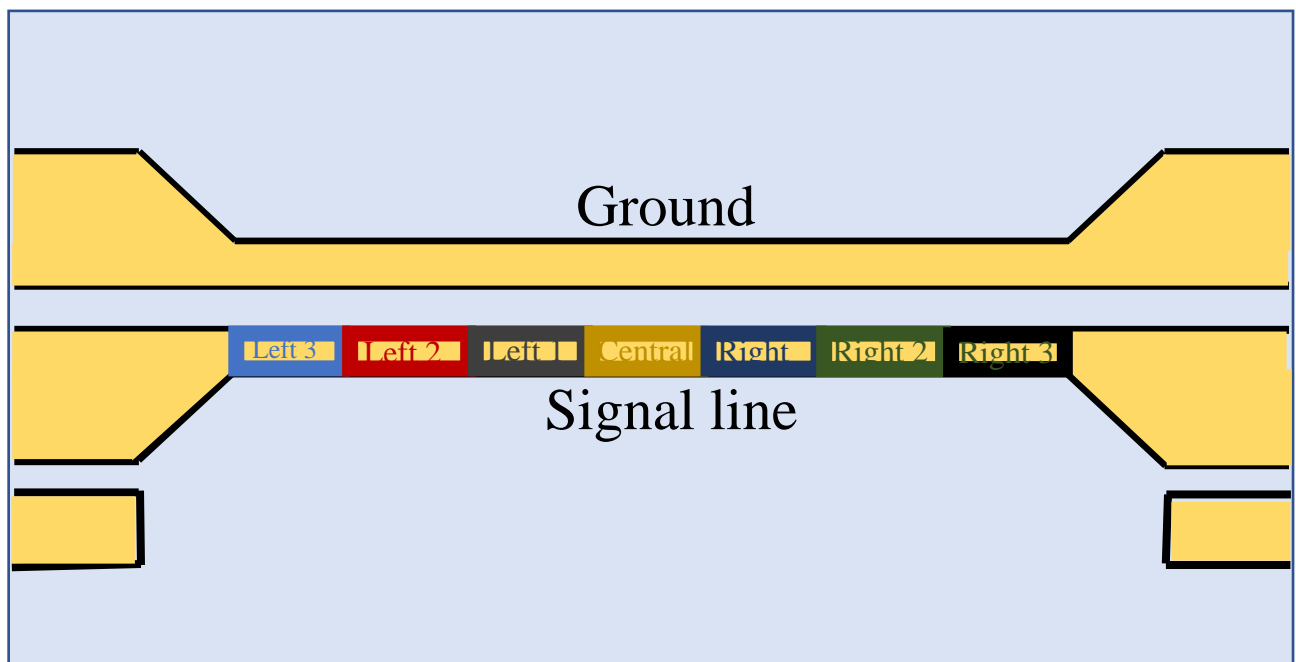


Figura 16. Divisione delle zone

Una volta controllata la sensibilità nelle sette zone selezionate in precedenza si è provveduto all'extrapolazione dei dati (grafico in Fig. 17). Dai risultati ottenuti è possibile evincere quale sia la zona migliore per posizionare il campione al fine di avere un valore elevato di SNR e quindi una qualità dell'immagine migliore.

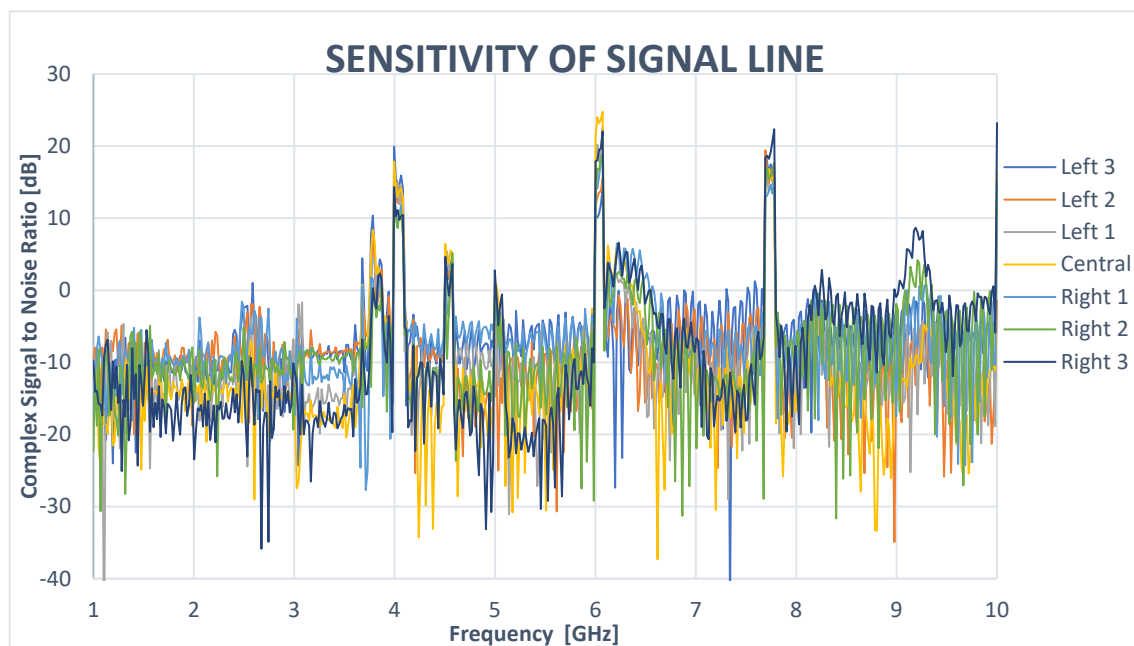


Figura 17. Grafico della sensibilità ottenuta tra 1 e 10 GHz per le 7 regioni della linea di segnale.

Dal grafico precedente si nota che in termini di frequenza la sensibilità maggiore è intorno a 6 GHz, mentre in termini di zone si ha sensibilità più alta al centro della linea. Per verificare questa ipotesi è stato tracciato un grafico dove è riportato il segnale SNR a 6 GHz per le 7 zone (Fig. 18).

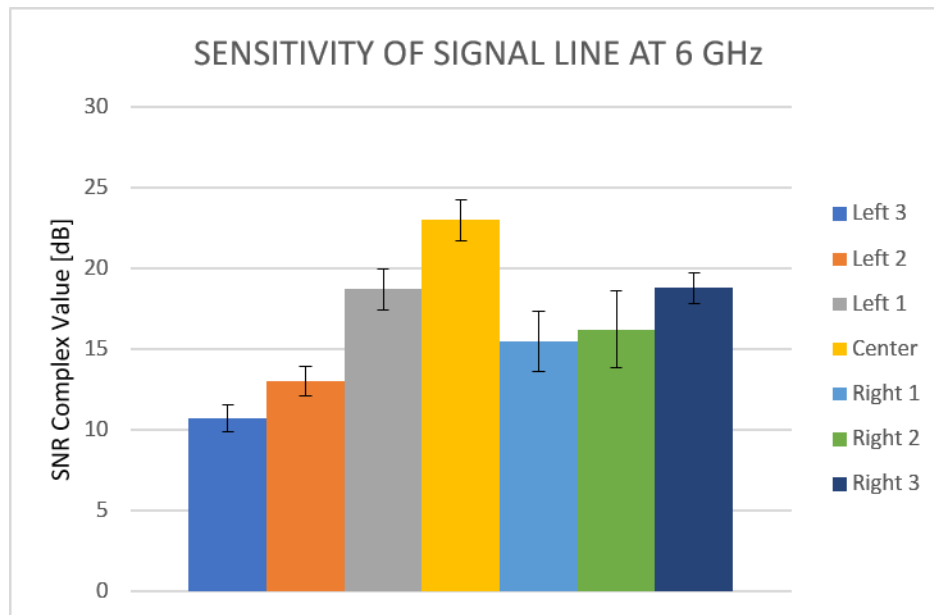


Figura 18. Grafico della sensibilità ottenuta a 6 GHz per le 7 regioni della linea di segnale.

Il grafico riportato nella figura precedente mostra una sensibilità più elevata al centro della linea di trasmissione a 6 GHz. Tuttavia, la sensibilità è fortemente influenzata dalla frequenza di analisi, per cui una banda differente in termini di frequenza potrebbe causare una diversa sensibilità lungo la linea. Inoltre, i dati mostrano che non si hanno differenze significative in termini di rapporto segnale rumore nelle zone esterne della linea di trasmissione.

3.2: SCANSIONE AFM/iSMM

Una volta scelto il luogo dove effettuare le scansioni in AFM/iSMM si è cercato di ottimizzare tutti i parametri del sistema. Per la scansione AFM nel campo biologico risulta conveniente utilizzare la modalità in semicontatto, descritto nei capitoli precedenti, con una frequenza di risonanza di 15kHz tipica della punta utilizzata (CSG01/Pt). L'immagine ottenuta (riportata in Fig. 19) risulta nitida ed è possibile vedere lo step tra il vetro e la linea di trasmissione.

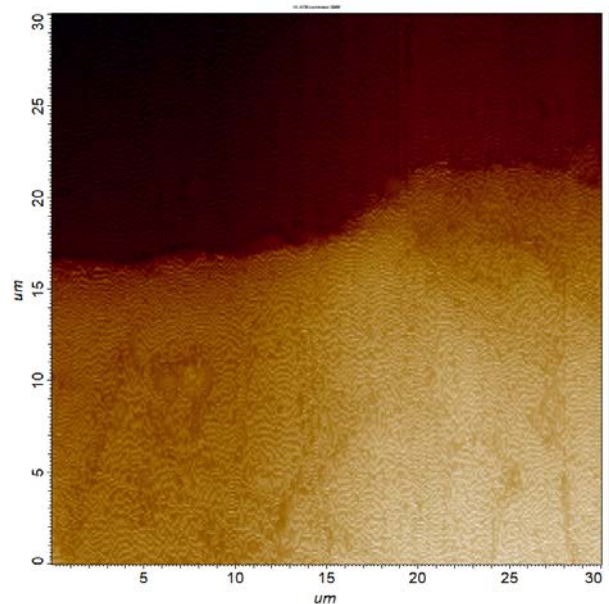


Figura 19. AFM linea di trasmissione.

La sensibilità del sistema a microonde è stata riscontrata massima tra 5.8 e 6.9 GHz, per cui tale banda di frequenza è stata scelta per la scansione iSMM. Una volta ottenuta la sensibilità è stata fatta partire contemporaneamente una scansione AFM/iSMM (Fig. 20), al termine della quale si è ottenuto il seguente risultato nel dominio della frequenza e del tempo.

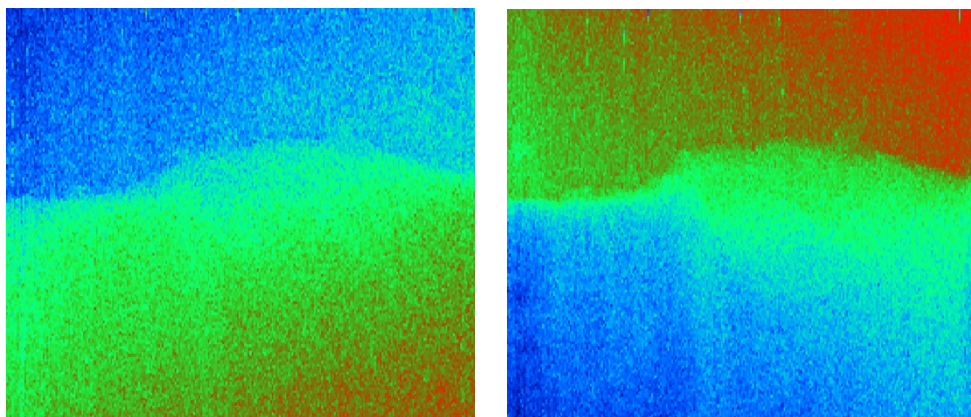


Figura 20. Immagini ottenute da iSMM nel dominio della frequenza (sinistra) e nel dominio del tempo (destra)

CONCLUSIONI

Il lavoro fin qui descritto ha permesso in un primo luogo di evidenziare le principali potenzialità e gli ostacoli dell'applicazione pratica della tecnica iSMM su campioni di natura biologica.

È stato possibile ricavare, in un primo luogo, tramite tecnica AFM, informazioni di natura morfologica della linea di trasmissione nella modalità a semicontatto. Si è inoltre cercato di ottimizzarne i parametri per poter continuare il lavoro utilizzando, successivamente, campioni di natura biologica al fine di ricavarne informazioni importanti in campo fisiologico e fisiopatologico.

Le analisi eseguite permettono di affermare che, sebbene ancora da ottimizzare, sarà possibile avere immagini importanti di strutture subcellulari al fine di ricavarne i loro parametri in termini di composizione locale e la risposta elettromagnetica.

I dati che hanno suscitato maggiore interesse sono quelli riguardanti la sensibilità della linea di scansione. Seppur non si è ancora in grado di poter avere immagini di campioni biologici, si è cercato di ottimizzare i parametri di partenza per un futuro miglioramento del progetto fin qui seguito.

In conclusione, il lavoro indica la potenzialità del microscopio invertito a microonde per quanto riguarda le immagini nel dominio del tempo e della frequenza collegate alle immagini topografiche ottenute dalla tecnica AFM a semicontatto. Il microscopio iSMM, ad oggi, supera i limiti posti dall'SMM convenzionale al fine di effettuare analisi in ambiente fisiologico.

BIBLIOGRAFIA

- [1] G.Binnig, H.Rohrer - Scanning tunneling microscopy. // *Helvol. Phys. Acta*, vol. 55, # 6, p.726 – 735 (1982).
- [2] G.Binnig, H.Rohrer - Scanning tunneling microscopy. // *Helvol. Phys. Acta*, vol. 55, # 6, p.726 – 735 (1982).
- [3]: Victor L. Mironov, "Fondamenti di microscopia a scansione di sonda", Accademia Russa Delle Scienze, Istituto Per La Fisica Delle Microstrutture.
- [4] D.I. Blohintsev – “Fundamentals of quantum mechanics”, Moscow, Nauka, 1983.
- [5] L. D. Landau, E.M.Lifshits – "Theoretical physics, vol. 3 - Quantum mechanics ", M.: "Fizmatlit", 2001, 804 p.
- [6] J.G.Simons – Generalized formula for the electric tunnel effect between similar electrodes separated by a thin insulating film // *J. Appl. Phys.*, 34, 1793 (1963).
- [7] J.G.Simons-Electric tunnel effect between dissimilar electrodes separated by a thin insulating film // *J. Appl. Phys.*, 34, 2581 (1963).
- [8] G.Binnig, C.F.Quate, Ch. Gerber – “Atomic force microscope”. // *Phys. Rev. Lett.*, vol. 56, #9, p. 930 – 933 (1986).
- [9] J.S.Barash – “Van der Waals forces”, M: Nauka, 1988, 344 p.
- [10] M.Saint Jean, S.Hudlet, C.Guthmann, J.Berger – “Van der Waals and capacitive forces in atomic force microscopies”. // *J. Appl. Phys.*, vol. 86 (9), p. 5245 – 5248 (1999).
- [11] Principles of Near-Field Microwave Microscopy Steven M. Anlage, Vladimir V. Talanov, And Andrew R. Schwartz p. 215-237
- [12] E. A. Synge, *Phil. Mag.* C 6, 356 (1928).
- [13] H. A. Bethe, *Phys. Rev.* 66, 163 (1944).
- [14] C. J. Bouwkamp, *Philips Res. Rep.* 5, 401 (1950).
- [15] G. A. Massey, *Appl. Optics* 23, 658 (1984).
- [16] R. D. Grober, T. Rutherford, T. D. Harris, *Appl. Optics* 35, 3488 (1996).
- [17] C. A. Bryant and J. B. Gunn, *Rev. Sci. Instrum.* **36**, 1614 (1965).
- [18] D. W. Pohl, W. Denk, and M. Lanz, *Appl. Phys. Lett.* **44**, 651 (1984).
- [19] E. Betzig, M. Isaacson and A. Lewis, *Appl. Phys. Lett.* **51**, 2088 (1987).
- [20] R. G. Bosisio, M. Giroux, and D. Couderc, *J. Microwave Power* **5**, 25 (1970).
- [21] M. Golosovsky and D. Davidov, *Appl. Phys. Lett.* **68**, 1579 (1996).
- [22] M. Golosovsky, A. Galkin, and D. Davidov, *IEEE Micro. Theor. Tech.* **44**, 1390 (1996).
- [23] J. Bae, T. Okamoto, T. Fujii, K. Mizuno, T. Nozokido, *Appl. Phys. Lett.* **71**, 3581 (1997).
- [24] T. Nozokido, R. Iibuchi, J. Bae, K. Mizuno, *Rev. Sci. Instrum.* **76**, 033702 (2005).
- [25] Imtiaz *et al.*, *Ultramicroscopy*, 94: 209-216, 2003.
- [26] Tabib-Azar *et al.*, *IEEE Trans Microw Theory Tech* 52:971-978, 2004.
- [27] Karbassi *et al.*, *Rev. Sci. Instrum.* 79: 094706, 2008.
- [28] <http://literature.cdn.keysight.com/litweb/pdf/5989-8881EN.pdf>
- [29] Imtiaz *et al.*, *IEEE Microw. Mag.* 15:52-64, 2014.
- [30] Sun *et al.*, Patent US 2009/0237067A1, 2009.
- [31] Xiang *et al.*, *Mater. Charact.* 48:117-125, 2002.
- [32] Tuca *et al.* (2016). *Nanotech.* 27:1–9, 2016.
- [33] Farina *et al.*, *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* 59:2769-2776, 2011.
- [34] Farina, *et al.*, *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* 64:4823–4831, 2016.
- [35] Pietrangelo *et al.*, *Exp. Gerontol.* 44:523-531, 2009.
- [36] Farina *et al.*, *Nanoscale* 3:3589-3593, 2011.
- [37] Gramse *et al.*, *Biophys. J.* 104:1257–1262, 2013.
- [38] Biagi *et al.*, *ACS Nano* 10:280–288, 2016.

- [39] Tuca *et al.* (2016). *Nanotech.* 27:1–9, 2016.
- [40] Gramse *et al.*, *Nanotechnology* 25:145703, 2014.
- [41] Farina *et al.*, *Appl. Phys. Lett.*, 114:093703-3, 2019.
- [42] Fabi *et al.*, 2019 IEEE/MTT-S International Microwave Symposium, Accepted manuscript.
- [43] Biagi *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*,19:3884-3893, 2017.

RINGRAZIAMENTI

Finalmente, il giorno di poter scrivere questi ringraziamenti è arrivato: queste frasi per me hanno sempre avuto un senso molto profondo. Vorrei spendere, quindi, due parole di ringraziamento nei confronti di tutte le persone che hanno contribuito a farmi raggiungere questo importante traguardo.

Vorrei ringraziare, in primo luogo, il prof. Farina, relatore di questa tesi di laurea, per la grande opportunità avuta e per la disponibilità dimostrata durante tutto il periodo del tirocinio.

Vorrei ringraziare Eleonora Pavoni, correlatrice di questa tesi, per averne permesso la stesura, corretto ogni virgola e avermi fatto apprezzare la lingua italiana, alternando momenti di incredibile ingegno a momenti di ordinaria vita in laboratorio, nella speranza di poterci rincontrare negli anni.

Vorrei ringraziare tutte le persone dell'ufficio del dipartimento dell'informazione che ho incontrato durante il mio tirocinio per aver tirato fuori idee intraprendenti e sempre fuori dal comune, oltre che ai momenti di goliardia trascorsi insieme. Siete fantastici!

Vorrei ringraziare i miei genitori: Mario e Marzia, che mi hanno permesso di poter concludere questo percorso, per non aver mai smesso di credere in me, nel bene e nel male e che continuano a sostenermi nonostante tutto. Una piccola parte di questa tesi e di questa giornata è anche per voi, perché siete la mia forza per affrontare tutto e andare avanti.

Ringrazio mio fratello Marco, per essere così com'è. Per tutti gli anni trascorsi in un piacevole amore e odio fraterno, facendomi sentire sempre una sorella maggiore migliore di quanto lo creda io stessa.

Ringraziare Gino, il mio coinquilino, è d'obbligo. La persona che mi ha fatto ridere, che mi ha fatto conoscere il vero senso della frase "arrendersi mai", la mia roccia. Inoltre, vorrei ringraziare nonna Teresa, che seppur per poco tempo, mi ha dimostrato cosa sia lottare e a sorridere sempre. Ad Iginio ed Elvira che mi hanno visto fare i primi passi, che hanno lottato fino alla fine. A Iginio per avermi allenato in cocciutaggine, ad Elvira per aver sempre corso, pensato a tutto e mai trascurato nulla.

Ringrazio le mie prime compagne di avventura Federica, Serena e Silvia, per avermi insegnato a non parlare di mattina presto, per avermi fatto sentire subito a casa non molto lontano da casa. A Michela, che è entrata a far parte di questa famiglia all'ultimo, ma è come se ci fosse sempre stata. A Giulia BT che, anche se super indaffarata è sempre presente per farmi fare una risata. Ad Alina, Andrea ed Elena che sono sempre stati disponibili, grandissime persone e compagni di degustazioni serali.

Ringrazio Maria, la mia "disgrazia", che mi ha fatto ridere, piangere e riflettere in questo ultimo periodo. Che per una tirata d'orecchi non si è mai tirata indietro, è sempre stata presente ad ogni mio

cambio d'umore repentino, quindi posso affermare che sia la migliore disgrazia che mi potesse capitare.

Ringrazio zio Massimo, che mi ha sempre difeso a spada tratta, a volte anche nell'indifendibile. Che è sempre stato presente, che mi ha sostenuto anche se non me lo meritavo. Persona davvero importante nella mia vita che mi sprona sempre ad essere una persona migliore.

Come non ringraziare Cristina, la mia terrorista psicologica preferita, senza la quale tutto questo non poteva accadere. Lei ha visto una piccola fiamma e l'ha trasformata in un vulcano in piena eruzione. Mi ha spronato, mi ha assistito agli esami, mi ha urlato contro e mi ha sostenuto in tutto.

Come non ringraziare il gruppo dei Los Desaparecidos, per essere così come sono, per essere un gruppo sempre presente, con la sana follia che ci accomuna e ci rende perfetti così come siamo. Per avermi fatto credere che tutto è possibile.

Infine, vorrei ringraziare tutti voi, che vorrei nominare uno ad uno, ma potremmo star qui per delle ore: per essere stati sempre presenti, per avermi sostenuto, per avermi fatto sempre sentire una persona amata.

Grazie veramente a tutti per aver contribuito, chi in un modo, chi nell'altro al raggiungimento di questo percorso.

