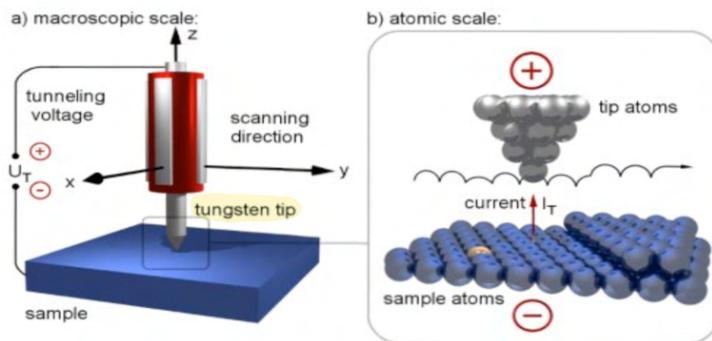
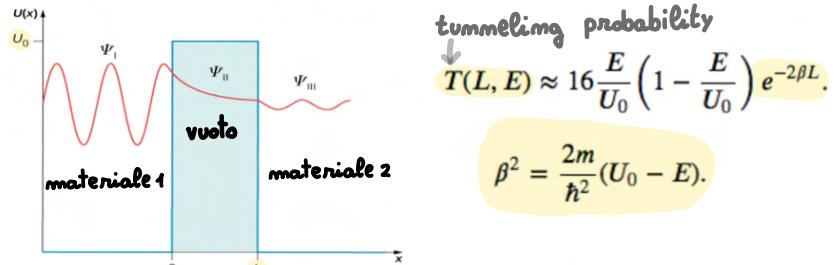


Scanning Probe Microscopy - Microscopia a scannione di sonda

$\sim 300\text{ K}$

Metodo per avere una risoluzione atomica a temperatura ambiente, senza dover usare la Cryo-TEM, e a condizioni fisiologiche (a un dato livello di pH, di potassio e sodio). Queste condizioni sono necessarie per fare esperimenti *in vitro*.

Quantum Tunnel effect

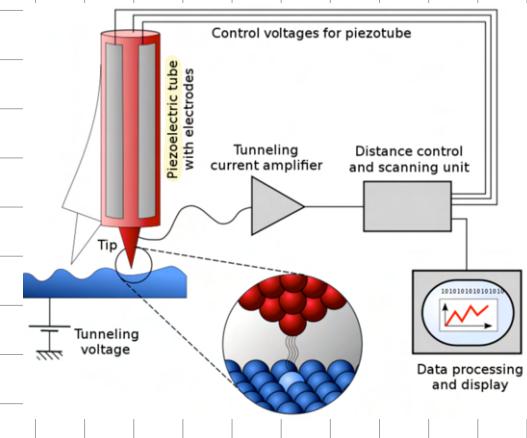


un e⁻ con una certa funzione d'onda in un materiale, puo' entrare in un altro materiale grazie all'effetto tunnel anche se i 2 materiali non sono in diretto contatto. Il vuoto tra i 2 materiali e' rappresentato da una barriera di potenziale.
(materiale + gas)

La tunneling probability dipende da un exp che e' funzione della distanza L e dell'altezza della barriera di potenziale β .

Se l'energia del potenziale U_0 e' nota, l'unica incognita che rimane e' che puo' essere facilmente dedotta e' L. Qui mi si sfrutta l'effetto tunnel per misurare la distanza di 2 oggetti; uno dei 2 oggetti e' il campione (molecola), mentre l'altro e' un "dente di metallo".

Con il tunneltomo e' possibile realizzare una punta con un singolo atomo. Quella che viene misurata direttamente e' la tunneling current (che e' proporzionale alla probabilita').



tubo piezoelettrico = cambia dimensione quando si applica una corrente. Si puo' cambiare la distanza tra il sample e la punta di frazioni di Å («delle dimensioni di un atomo»). (0.1 Å)

U_0 = energia di legame

Scanning Tunneling Microscopy

1. Si misura la tunneling current tra il campione e la punta, la quale è una funzione esponenziale della distanza.
 2. La corrente viene immessa in un feedback loop, ovvero un dispositivo che cambia il voltaggio che va al tubo piezoelettrico fin quando la corrente non torna ad un valore costante. Serve per evitare che la punta ritocco il campione.
 3. La sonda esegue uno scan di tutto il campione.
Si può agire in 2 modi:
 - si tiene L costante e si misura la corrente
 - si tiene la corrente costante e si misura L
- In entrambi i casi si ricava un profilo topografico, fino a visualizzare il profilo delle muove elettroniche e degli orbitali.
- Com: le misurazioni devono avvenire in un contenitore asciutto e privo di liquidi e le info ottenute sono solo superficiali

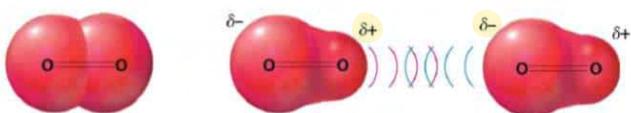
La risoluzione dipende sia dalla precisione con cui la punta può emergere spontaneamente lungo il campione, sia dalla tipologia di interazione presente tra punta e sample, più è a corto raggio e maggiore sarà la risoluzione.

Short range interaction: scala con un fattore più piccolo di $\frac{1}{r^2}$
l'interazione dipolo-dipolo al $\frac{1}{r^6}$

Long range: forza Coulomb al $\frac{1}{r^2}$

interazione dipolo-dipolo (forza di Van der Waals)

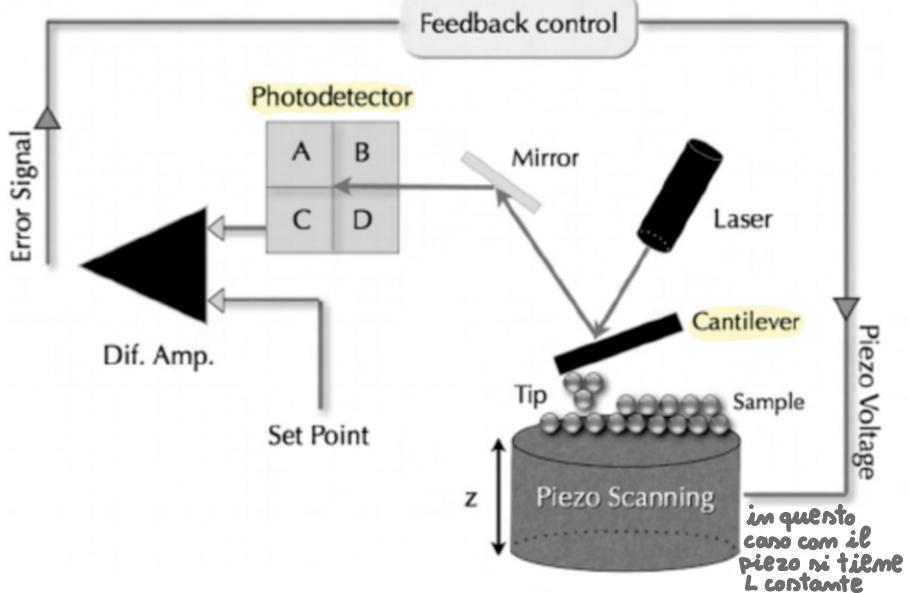
Le fluttuazioni statistiche in un atomo neutro, prima o poi causeranno uno spostamento delle cariche positive rispetto alle posizioni di quelle negative. Ciò produce un campo di dipolo instantaneo che interagisce con gli altri atomi. Quando gli altri atomi neutri vengono in contatto con le fluttuazioni statistiche del dipolo, si riarrangiano e diventano dipoli indotti. Il dipolo indotto è quello statistico interagiscono. L'interazione è sempre attrattiva.



E' un'interazione a corto raggio: $\frac{1}{r^6}$

In questo caso come device si usa un laser beam bounce

Atomic Force Microscope (AFM)



in questo caso con il piezo si tiene la costante

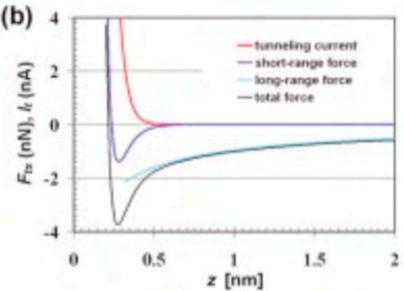
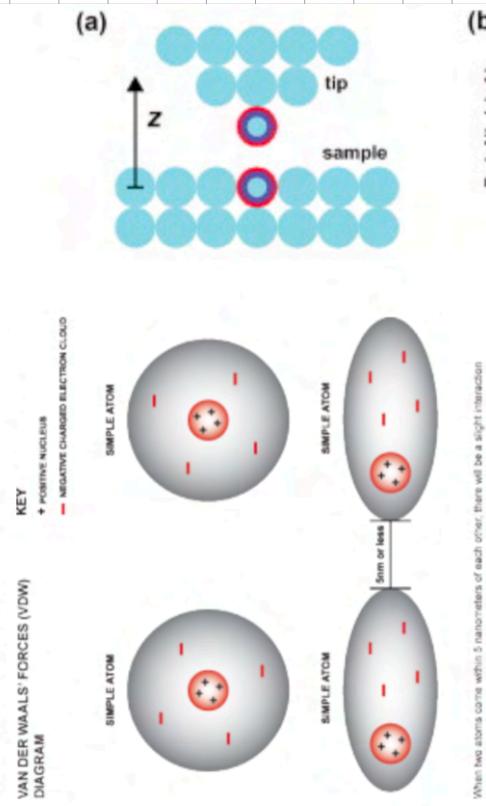
Il fascio laser rimbalza sulla base della punta metallica (cantilever) viene riflesso e va in un photodetector costituito da 4 quadranti. Quindi quando la punta si abbassa leggermente, il fascio luminoso rimbalza su un quadrante diverso del photodetector.

Si misura la forza attrattiva tra la punta e il sample, se sono molto vicini la forza dipolo-dipolo è molto forte e fa abbassare la punta. La forza dipolo-dipolo è una forza atomica perché è una forza che agisce anche fra 2 atomi. Se la punta viene realizzata in modo tale che all'estremità vi sia un solo atomo, si può registrare la forza tra 2 atomi. Con il photodetector si ottiene una misura di Δz in funzione di x e y. Questo metodo, quindi, prende il nome di **atomic force microscope**, perché può mappare la topografia del campione a partire dalle misure della forza atomica tra la punta e il sample.

Più la distanza è piccola (= più il sample e' spesso) maggiore è la forza.

Anche AFM può funzionare in 2 modi come STM.

Forze atomiche:



long range atomic van der Waals force
tip polarization – surface polarization

short range atomic van der Waals force
tip atomic dipole – surface atomic dipole

Coulomb repulsion: only when atoms really “touch” each other

The sensitivity of atomic forces to distance is similar (or better) than that of tunneling current to distance!

Unlike electric currents:

- Forces exist also between dielectrics
- Forces do not need a vacuum or very clean metal surfaces

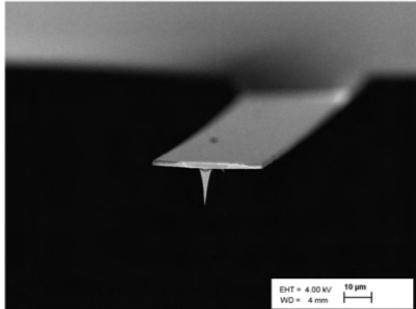
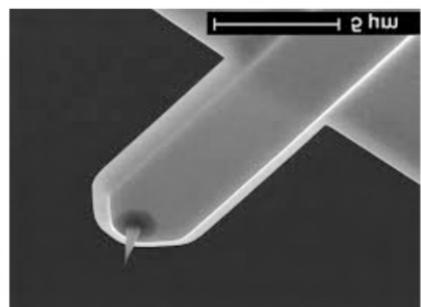
Nell' AFM non è necessario il moto. Si possono visualizzare i virus.

Silicon cantilever

Elastic “micro-springboard” with a sharp tip at the free end.

The tip can be atomically sharp
It can bend and oscillate, driven by the very small atomic forces.

The large structure from which it springs is called the “carrier chip” and it can be handled easily.



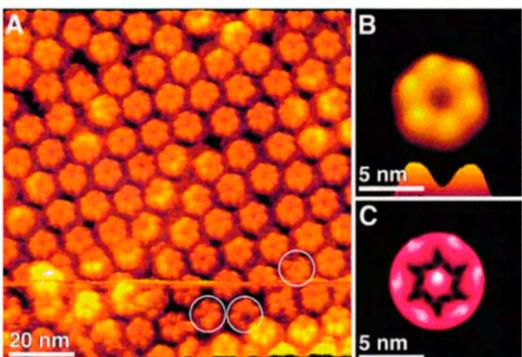


Fig. 2 (A) AFM images of the arrangement of connexons (hexameric half-channels that bridge the extracellular space between adjacent plasma membranes) in gap junctions plaques. (B) Top and side view of a single connexon. (C) Enhanced structural details of a single connexon. Reprinted with permission from ref. 37. Copyright 2002 American Chemical Society.

Contact -mode imaging of cell membranes, single proteins, individual bacteria in liquid (physiological environment)

Purple membrane
Bacteriorhodopsin trimers

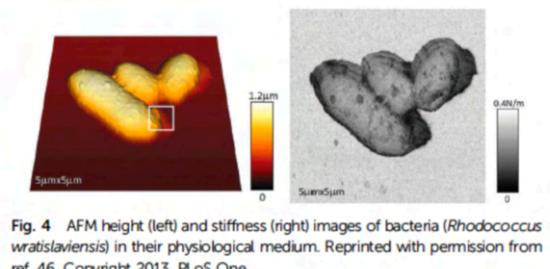
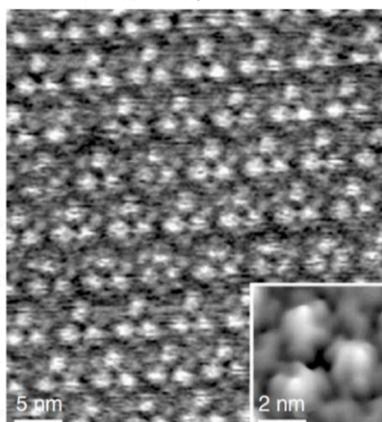


Fig. 4 AFM height (left) and stiffness (right) images of bacteria (*Rhodococcus wratislaviensis*) in their physiological medium. Reprinted with permission from ref. 46. Copyright 2013, PLoS One.

Near-field Scanning Optical Microscopy - NSOM

L'equazione delle onde è solo una soluzione del campo EM, nella condizione di far field (= la sorgente delle onde EM è molto distante dal punto di osservazione).

"distante" = distanza \gg lunghezza d'onda

Nel caso di near field microscopy, si considera una distanza tra sample e sorgente inferiore rispetto alla lunghezza d'onda. Non si considerano le onde EM che si propagano lontano dalla sorgente, ma il campo EM near field.

In questo modo il limite della diffrazione non è più rilevante.

Per tenere il sample e la sorgente così vicini si deve usare la stessa tecnologia della scanning probe microscopy.

Lo scan del sample avviene spostando la sorgente.

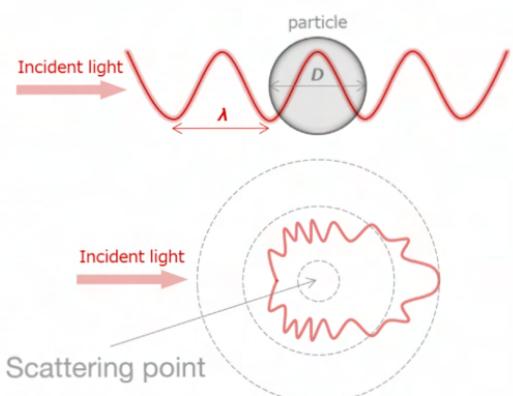
Mie scattering:

consideriamo una piccola particella sferica fatta di metallo con conduttività $\sigma \sim \epsilon_2$ (ϵ_2 = parte immaginaria della costante dielettrica), che ha un grande assorbimento.

skin depth δ : penetrazione della radiazione EM dentro il mezzo

$$\delta = \frac{c}{\sqrt{8\pi\mu\sigma\omega}} \sim 20 \text{ nm} \text{ per i metalli nello spettro IR-VIS}$$

il raggio della particella (a) è dell'ordine di δ



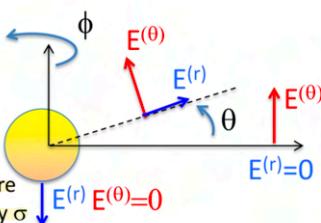
la particella scatterà la luce incidente, che poi può propagarsi anche lungo direzioni diverse da quella incidente.

Il campo E M può essere calcolato ovunque nello spazio analiticamente:

Mie scattering

Born & Wolf, Chapter 14.5

plane wave illumination
 E^{inc}



$$E_{scatt}^{(r)} = \frac{\lambda_0^2}{4\pi^2\epsilon^2 r^2} \frac{1}{r} \cos \phi \sum_{l=1}^{\infty} F_l^{(r)} \left(\frac{a}{\lambda}; \sigma \right)$$

F: spherical harmonics sums

$$E_{scatt}^{(\theta)} = \frac{\lambda_0}{2\pi\epsilon r} \cos \phi \sum_{l=1}^{\infty} F_l^{(\theta)} \left(\frac{a}{\lambda}; \sigma \right)$$

$$E_{scatt}^{(\phi)} = \frac{\lambda_0}{2\pi\epsilon r} \sin \phi \sum_{l=1}^{\infty} F_l^{(\phi)} \left(\frac{a}{\lambda}; \sigma \right)$$

The near-field ($1/r^2$) is radial and has an extension in space of the order of the skin depth:

$$\delta = \frac{c}{\sqrt{8\pi\mu\sigma\omega}}$$

From VIS to IR, δ is around 20 nm for noble metals (Al, Au, Ag, Cu, Pt...)

The propagating far-field ($1/r$) is non-radial and has the same radiation pattern as that of a linear dipole oriented along x

L'unica componente che rispetta la conservazione dell'energia è quella angolare ($I \propto \frac{1}{r^2}$)

Quindi quella radiale partecipa solo al near-field, mentre quella angolare principalmente al far field poiché non propaga.

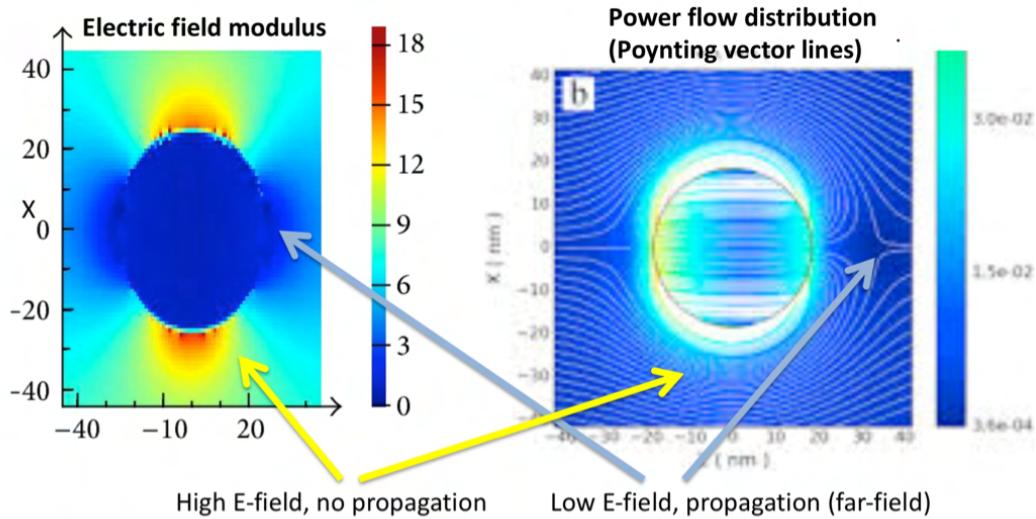
Per $r \rightarrow 0$ il radial near field è molto più intenso di quello far field.

The concept of near field

Spherical silver nanoparticle with radius of 20nm ($\lambda = 400$ nm, $\lambda/r=20$)

Z: direction of illumination (from left to right)

X: direction of the electric field vector of the illumination



Rayleigh and Mie scattering plots

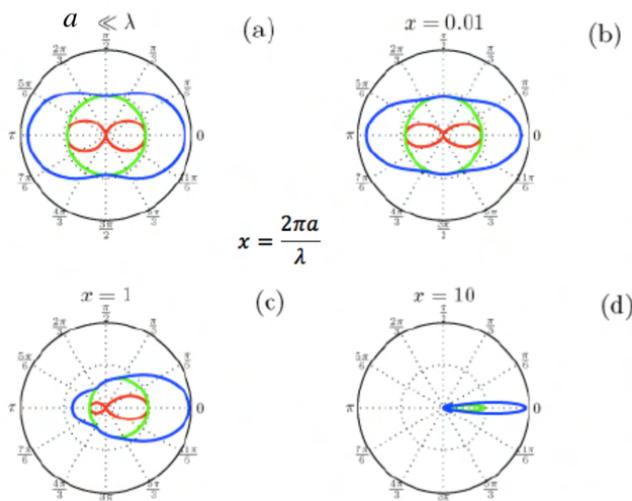


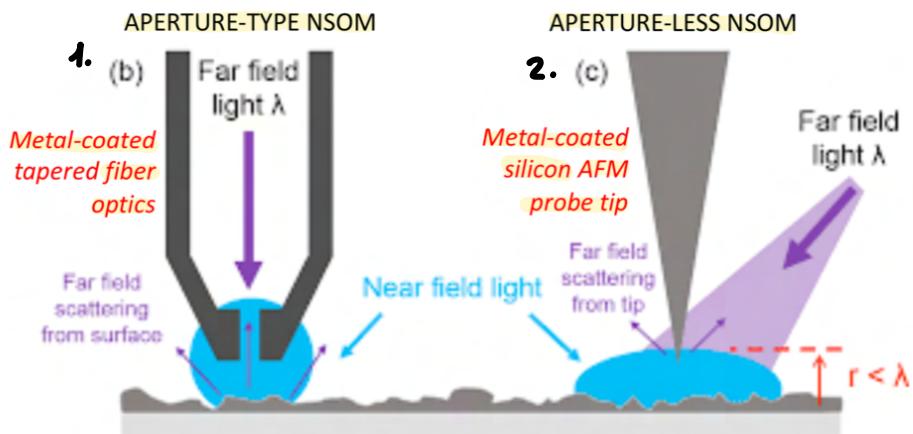
Figure 1.2: Normalized angular distribution of the scattered light for 4 different size parameters. (a) Rayleigh limit (b) $x = 0.01$ (c) $x = 0.1$ (d) $x = 10$. The green curve is the parallel incident polarization. The red is the perpendicular one and the blue one for unpolarized light.

Rayleigh scattering (blue sky) is the limit of Mie scattering for small particle size (molecules) and small conductivity σ

Rayleigh pattern is symmetric
Mie pattern is almost symmetric for **small particles** (therefore, backscattered radiation can be detected in Aperture-less NSOM)

For **large particles** the forward Mie scattering is stronger (the dipole analogy is not valid any more). Important for microscopy of single cells or bacteria with dimensions of a few wavelengths.

Two ways beyond the diffraction limit



Near-field detection, no propagation: the imaging resolution does not depend on λ !!

Relevant length scales:

- 1) wavelength λ does not determine resolution but it determines intensity
- 2) probe-sample distance $r \ll \lambda$: controlled by the feedback loop with piezo (Scanning probe)
- 3) aperture diameter or radius of curvature of the probe tip: determines resolution !!

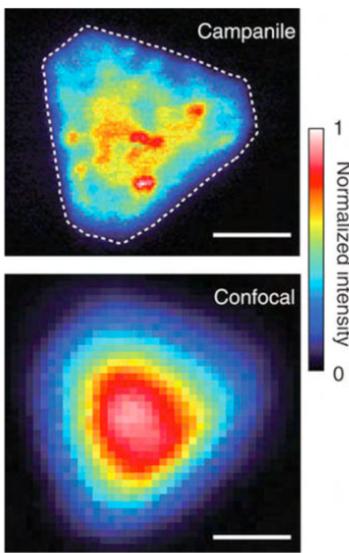
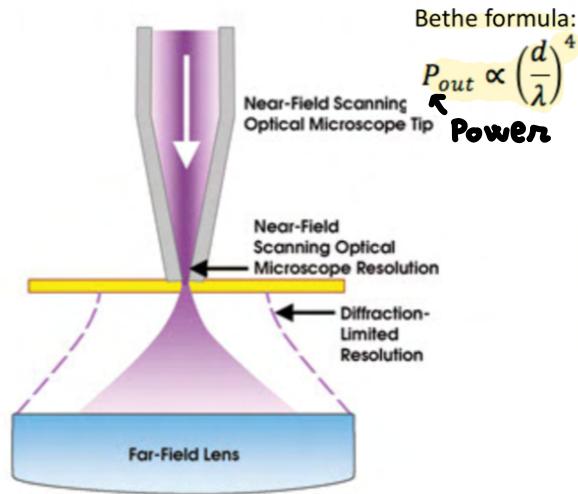
1. **Aperture Type NSOM:** come scanning probe microscopy ma la punta viene sostituita da una fibra ottica coperta di metallo in modo che la luce può uscire solo da un piccolo foro in cui non c'è la copertura di metallo. La piccola apertura costituisce la sorgente EM per il sample.

2. **Aperture less NSOM:** ni usa una sonda standard usata in atomic force microscopy e ni considera la punta come sorgente di onde EM. Problema: il rilievo non arreba molto, quindi ni ricopre con un metallo

Si illumina la punta con una sorgente luminosa di far field , in modo da approssimare la punta con una particella sferica che agisce da Mie scattering device.

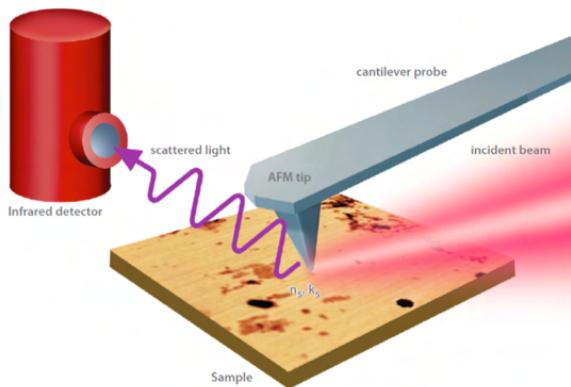
Aperture-type NSOM

Metal-coated Tapered Fiber optics with a very small aperture of diameter $d \ll \lambda$ at the end:
Very high resolution (d), very low efficiency.



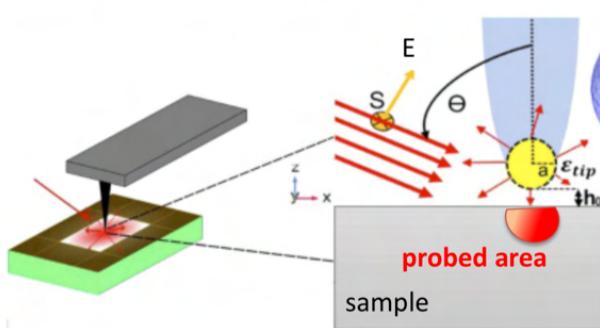
2D material photoluminescence.
Scale bar: 1 micron

Aperture-less NSOM



Experimental configuration:

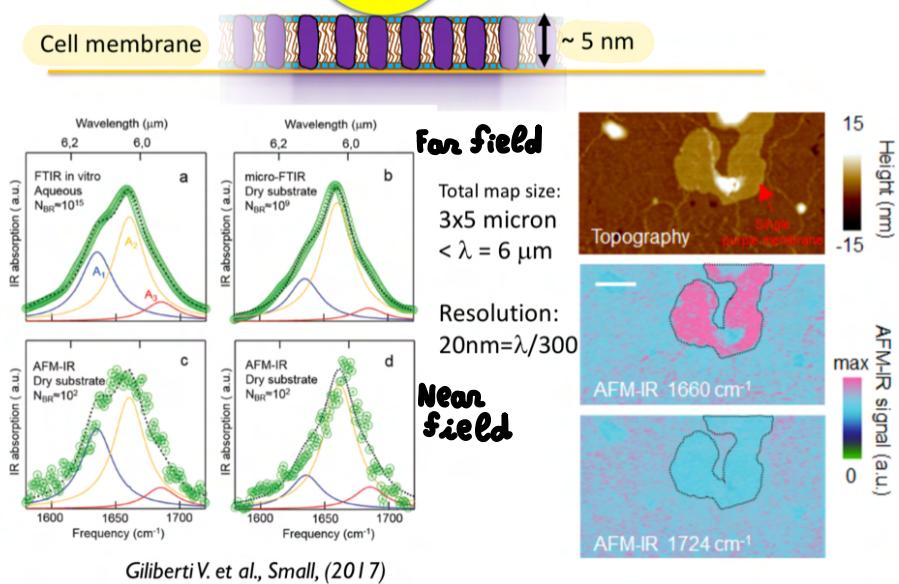
- an AFM with gold-coated cantilever
- a laser focused on to the probe tip
- a sensitive light detector to see the weak scattered light, originated by the near-field interaction
- a modulation mechanism to separate near-field and far-field signals (e.g. tip oscillation)



Electromagnetic model: Mie scattering

- the probe tip is seen as a metal sphere
- the laser is the illumination wave
- the near-field region penetrates into the sample but does not propagate

Aperture-less near-field IR spectroscopy ?



Example: near-field Raman imaging of a single molecule

