# Art. n° 42 – LA MICROSCOPIA "NON CONVENZIONALE"

Questa sezione del sito "funsci.it" si è sempre occupata di microscopia "convenzionale", intendendo con questo generico termine l'insieme delle tecniche ottiche tradizionali che portano alla formazione di immagini ingrandite di qualche oggetto.

Oltre alla semplice formazione di immagini secondo elementari leggi della rifrazione (ottica geometrica) e della diffrazione (ottica ondulatoria), la microscopia convenzionale s'interessa anche dell'osservazione in radiazione polarizzata (vedi, in questo sito e nella stessa sezione, il volumetto "Introduzione alla Microscopia in Radiazione Polarizzata" – 56 pagg.), dell'esaltazione del contrasto (le cosiddette "Tecniche di contrasto" – vedi gli artt. n° 33 e 35), della fotografia e del disegno al microscopio, della ripresa televisiva, e simili.

Col passare degli anni e dei decenni, però, sono entrate in questo campo possibilità tecniche nuove basate ancora, in parte, su fenomeni ottici particolari e su nuove sorgenti (laser, tubi a raggi X, ultrasuoni, ad es.), in parte su tecniche di digitalizzazione ed elaborazione elettronica delle immagini (sensori elettronici, calcolatori, programmi di elaborazione, ecc.), in parte su radiazioni corpuscolari (elettroni) ed ancora su modalità assolutamente nuove di esplorare l'oggetto (sonde nanometriche, conduttrici, magnetiche, ecc.).

Questo testo assai riassuntivo intende quindi esporre ai micrografi "convenzionali" i principi di funzionamento delle più note fra queste nuove tecniche di acquisizione di immagini, che definiremo globalmente "non convenzionali".

Alla fine si propone un elenco alfabetico degli acronimi che i ricercatori ed i produttori hanno creato per designare le nuove tecniche, elenco lungo e ridondante, con qualche caso di sinonimia e di significati multipli, che rende spesso difficile interpretare i testi che descrivono queste novità.

Prima ancora di cominciare la rassegna, proviamo a costruire uno schema dei principi fondamentali utilizzati nella nuova microscopia. Introdurremo dei concetti e dei termini che verranno ripresi spesso nel seguito.

# Esplorazione del campo oggetto

— ad "<u>immagine totale</u> o <u>globale</u><sup>1</sup>" – l'immagine prodotta da un obbiettivo (ottico o elettronico) viene totalmente osservata o registrata con un mezzo fotografico o televisivo o su uno schermo fluorescente. Il "sensore" che registra l'immagine può essere analogico (emulsione fotografica, tubo da ripresa televisiva analogica) o digitale (lineare o di superficie –"area detector").

Se uno strumento video esplora l'immagine totale per righe o punti successivi (secondo un "raster" di righe parallele), non importa: l'immagine è acquisita a tutto campo, nello stesso istante.

— a <u>"raster"</u> – il campo oggetto viene illuminato o esplorato in successione, un punto alla volta, una riga per volta. Si parla normalmente di <u>"scanning"</u>.

In campo ottico, il "raster", il movimento dello "spot" rispetto all'oggetto – o viceversa – può essere realizzato in molti modi:

+ con numerosi punti in rapido movimento (sistema confocale con disco di Nipkow);

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Gli autori inglesi ed americani usano per "immagine totale" il termine "wide field", ma si tratta di un uso improprio: "wide field" si applica specificamente al microscopio ottico con immagine intermedia maggiore di 18 mm.

- + con un punto che si muove per righe parallele contigue; questo può avvenire con specchi oscillanti, con specchi multipli rotanti, con sistemi acusto-ottici (materiali piezoelettrici);
  - + con un fascio lineare in movimento (certi sistemi confocali);
  - + col movimento dell'oggetto in una direzione e del punto in un'altra:
  - + col movimento dell'oggetto in due direzioni, generalmente ortogonali ("sample scanning"), a "spot" fermo. La scansione dell'oggetto (R. Young, 1972) si ottiene generalmente sfruttando sistemi meccanici classici o ceramiche piezoelettriche<sup>2</sup> comandate con sistema a feedback<sup>3</sup>

Il "raster" in campo elettronico si può ottenere con metodi elettrostatici (due coppie di piastre parallele con diversa tensione oscillante) o magnetici (due coppie di elettrocalamite), capaci di deviare un fascio di elettroni o altre particelle cariche.

# Sonda di esplorazione

Si può chiamare "sonda" ciò che illumina, esamina, rileva o sfiora l'oggetto.

Può essere, sempre nel campo della microscopia non convenzionale:

- un fascio convergente di radiazione ottica o UV o IR o X (SOM; sistemi confocali in tutte le loro varianti; microscopia a raggi X, ecc.);
  - un fascio di ultrasuoni (microscopia acustica);
  - un fascio di elettroni (microscopi elettronici a scansione o a trasmissione);
  - un oggetto appuntito fino a dimensioni nanometriche (tecniche "scanning probe microscopy"— SPM in generale); useremo per brevità il termine "**tip**" = punta.

In questi casi l'esplorazione può avvenire solo a raster.

La sonda può essere:

- + a contatto con l'oggetto, se costituita da un corpo solido o da un fascio che ivi si concentra (a raster o ad immagine globale);
- + a brevissima distanza dall'oggetto; in questo caso si può misurare la variazione della distanza dall'oggetto stesso o la forza necessaria per tenere costante tale distanza (con un circuito di feedback) o qualche interazione sonda-oggetto.

Poiché sono innumerevoli le caratteristiche con cui è possibile costruire la sonda, saranno altrettanto numerose le tecniche finora escogitate e le misure che se ne possono ricavare.

### La sorgente

Generalmente, le tecniche ottiche elencate (confocale, "near field" e simili) hanno una resa fotometrica molto bassa, per cui si usano sorgenti molto intense: lampade ad arco concentrato (in xeno o in vapori di mercurio) o laser.

I laser possono essere ad emissione continua (CW) o pulsati.

Per i sistemi acustici si usano sorgenti piezoelettriche. Per i sistemi elettronici o ionici si usano "cannoni" elettronici o ionici basati sull'effetto termoionico, sull'azione di forti campi elettrici e simili.

Nei sistemi della famiglia SPM non si usa una sorgente di radiazione o di particelle: si misura l'interazione fra una punta solida e l'oggetto.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> L'effetto piezoelettrico, scoperto da P. Curie nel 1880, si manifesta in alcuni cristalli naturali ed alcuni materiali artificiali che presentano una differenza di potenziale su due facce opposte se sottoposti a compressione e, all'inverso, modificano le proprie dimensioni se sottoposti ad un campo elettrico.

Gli attuatori piezoelettrici utilizzati in varie tecniche di microscopia non convenzionale descritti in queste pagine si basano su due schemi fondamentali: "a tripode" in cui tre barre disposte a 90° l'una dall'altra assicurano separatamente gli spostamenti nelle tre direzioni dello spazio, oppure "a cilindro" in cui tre elementi piezoelettrici sono integrati in un'unica struttura cilindrica che assicura. comunque, i tre movimenti in X, Y e Z.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Sui dettagli dei sistemi a feedback si può consultare: Marco Salerno – "Microscopia 2000", pag. 39.

## I PRIMI SCHEMI – Le tecniche di scansione a raster (LRM – SOM)

Sotto il nome di "Light raster microscopy" o "Scanning optical microscopy" sono state proposte varie tecniche che proiettano sul piano oggetto uno "spot", un fascio convergente, in una piccola area. L'oggetto o il fascio viene spostato in un piano perpendicolare all'asse ottico secondo un raster di tipo televisivo e la radiazione che attraversa l'oggetto viene raccolta da qualche rivelatore.

Con opportuni circuiti elettronici il segnale del rivelatore viene utilizzato per ricostruire un'immagine complessiva del piano oggetto.

Si può pensare ad un qualunque sistema "video" in cui però il raster non è generato da una telecamera che esplora un'immagine a due dimensioni, ma dallo spostamento nel piano X–Y di uno "spot", oppure dell'oggetto stesso che passa sotto un fascio concentrato immobile (sample scanner).

Con l'avvento del laser, è stato più facile (e più veloce) ottenere il raster tenendo fermo l'oggetto e spostando il fascio illuminante (per es. con specchi oscillanti), sempre in modo da illuminare l'oggetto secondo righe contigue, ancora un "raster" (beam scanner); si parla di "Laser scan microscopy" = LSM. Riparleremo di queste ed altre forme dello "scanner" a proposito del sistema confocale.

Su questo schema elementare sono state ricamate molte applicazioni, ma il principio di base del LRM è stato il punto di partenza per lo sviluppo dei sistemi confocali, che vedremo.

Tanto per cominciare, il fatto stesso di irradiare l'oggetto un punto alla volta consente di "tenere al buio" quasi tutto l'oggetto per tutto il tempo della ripresa. Nel caso della fluorescenza, una tecnica sempre più diffusa per via dell'elevata specificità di legame dei fluocromi, specie nel caso dell'immunofluorescenza, è noto che l'irraggiamento dell'oggetto provoca il rapido decadimento del fluocromo con produzione di residui tossici. Il ridurre la superficie d'irraggiamento dell'oggetto consente di lavorare anche su oggetti viventi e per tempi più lunghi. Questo notevole vantaggio verrà mutuato, come vedremo, dalle tecniche confocali.

Il fatto però di irradiare un punto dell'oggetto alla volta consente di analizzare la radiazione che ha traversato l'oggetto con sistemi fotometrici e spettrometrici: nasce così una spettroscopia, una fluorimetria e spettrofluorimetria ed una spettroscopia Raman, tutte allargate al dominio microscopico.

#### La foto-termo-microscopia

Nel punto d'irraggiamento, l'oggetto si scalda ed emette radiazione nel lontano infrarosso. Lavorando anche in episcopia e disponendo di un rivelatore sensibile all'IR, è possibile ricostruire un'immagine che rivela la topografia di temperatura dell'oggetto e, indirettamente, la distribuzione del suo potere d'assorbimento. I parametri che determinano l'ampiezza del segnale in uscita sono più precisamente: il calore specifico dell'oggetto, la sua conduttività termica e lo spessore.

#### La microscopia foto-acustica (SPAM)

Secondo lo schema precedente, si esplora ancora il piano oggetto secondo un raster, ma la sorgente è pulsata. Può trattarsi di una sorgente convenzionale seguita da un otturatore (un disco forato rotante, per es.) o di un laser ad impulsi, poco importa.

L'oggetto è racchiuso in una "camera" chiusa con una superficie d'ingresso trasparente per consentire l'ingresso del fascio illuminante. Presso l'oggetto si trova un microfono.

Tutte le volte che un impulso di luce incide sull'oggetto, come detto sopra, si crea un riscaldamento circoscritto a quel punto, quindi un rapido aumento di pressione nella camera a gas. La successione degli impulsi di luce crea una successione di onde di pressione, quindi un suono, che

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Qui s'intende il termine "punto" non nel senso geometrico (privo di dimensioni) ma nel senso ottico (limitato per lo meno dalla diffrazione).

il microfono trasforma in una tensione ad impulsi, che può essere amplificata ed inviata allo schermo per essere trasformata in livelli di grigio o falsi colori.

Indirettamente, si ha quindi un'immagine topografica dell'oggetto, relativa al suo potere d'assorbimento, come nel caso precedente. Ma c'è di più.

L'originalità di questa tecnica consiste nel fatto che l'onda di pressione generata dall'irraggiamento puntiforme si propaga anche in profondità nell'oggetto, come avviene nella microscopia acustica (vedi sotto), e pertanto ne esplora alcune proprietà meccaniche. L'esame può rivelare strutture dell'oggetto fino a  $100~\mu$  di profondità; molto dipende dalla frequenza degli impulsi di luce. In particolare, in oggetti solidi come i semiconduttori, si possono rivelare fessure profonde, irregolarità nella struttura o delaminazioni. Tutto ciò sarebbe impossibile per via convenzionale con oggetti opachi.

Con questa tecnica si può ottenere una risoluzione fino a 3 µ.

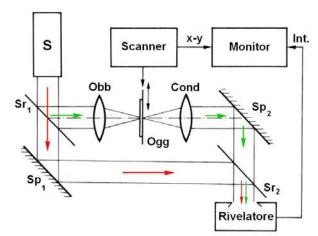
#### La tecnica interferenziale

Fig.  $1 - Sr_1$  ed  $Sr_2$  sono specchi semi-riflettenti.  $Sp_1$  e  $Sp_2$  sono specchi piani.

Si riconosce qui lo schema dell'interferometro di Mach–Zehnder con il ramo superiore  $\,Sr_1-Sp_2\,$  ed il ramo inferiore  $\,Sp_1-Sr_2.$ 

Ovviamente, il condensatore (Cond) deve essere simmetrico, con le stesse correzioni, dell'obbiettivo (Obb) per minimizzare le aberrazioni del sistema.

NB: Le figure 1/2/8/9/10 sono estratte, con modifiche, da: Beyer e Riesenberg, Handbuch der Mikroskopie, Verlag Technik, Berlin, 1988.



Si riprende qui lo schema di un classico microscopio interferenziale per trasparenza (vedi, in questo sito, sez. "Microscopia ottica", l'art. n° 17, pag. 19), con la differenza che l'obbiettivo illumina l'oggetto solo un punto alla volta.

La differenza rispetto agli strumenti convenzionali è quindi che l'immagine non è formata tutta nello stesso momento (immagine globale), ma per punti successivi, secondo un raster, in seguito al movimento in due direzioni del tavolino.

Ciononostante, è possibile ricavare anche qui un'immagine in contrasto interferenziale (tinta unita) o un interferogramma (campo solcato da frange parallele).

Se si opera in trasparenza, il fattore posto in rilievo sarà il cammino ottico (indice × spessore) dell'oggetto. In episcopia sarà visualizzata la topografia superficiale del medesimo; tale opzione si presta quindi bene per superfici non speculari, ruvide, di cui si voglia osservare il rilievo.

#### L'OBIC (Optical Beam Induced Current)

In questo caso, si illumina ancora l'oggetto con un fascio concentrato ad opera di un obbiettivo. La formazione del raster può essere opera da un movimento del tavolino o del fascio medesimo. La grandezza che si misura in questo caso è la corrente indotta nell'oggetto ad opera dell'irraggiamento: una "foto-corrente".

La tecnica si applica in modo particolare a semiconduttori, fotodiodi e simili: il fascio illuminante provoca nell'oggetto lo spostamento di cariche (elettroni o lacune), quindi una corrente che può essere raccolta da opportuni elettrodi, amplificata ed utilizzata per creare i chiari-scuri dell'immagine.

La microscopia "acustica" (ad ultrasuoni) (SAM = scanning acoustic microscopy)

Come avviene per le radiazioni elettromagnetiche, ad es. quella ottica, si può parlare nel caso di suoni ed ultrasuoni di: – frequenza, – lunghezza d'onda – velocità di propagazione – indice di rifrazione – convergenza – lenti, specchi e simili. Si opera con mezzi trasparenti alle onde acusti-

che per ottenere risultati concettualmente simili.

La sorgente d'elezione, per le piccole dimensioni e l'elevata frequenza raggiungibile, è una ceramica piezoelettrica (vedi la nota a pag, 2).

In pratica, si tratta di un sottile strato di materiale naturale od artificiale rivestito su due facce opposte da sottili elettrodi conduttori. Applicando a questi ultimi una tensione alternata, si ottiene una ritmica dilatazione e contrazione del cristallo, quindi la formazione di un'onda elastica nel mezzo circostante, un suono. Vale in questo caso la solita equazione:  $\lambda = c / v$  in cui lunghezza d'onda  $(\lambda)$ , velocità di propagazione (c) e frequenza (v) si riferiscono all'onda elastica longitudinale.

In acqua, tanto per dare un'idea di grandezza, si ha: c = 1500 m/s. La lunghezza d'onda è:

 $\lambda = 1.5 \text{ mm per } \nu = 1 \text{ MHz}$ 

 $\lambda = 1.5 \,\mu$  per  $\nu = 1 \,\text{GHz}$ 

 $\lambda = 0.75 \,\mu$  per  $\nu = 2 \,\text{GHz}$ . Ecco che ci si avvicina allo spettro ottico.

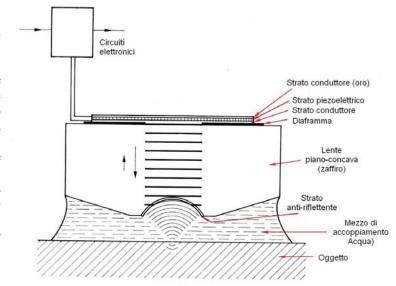
Fig. 2 – Lo strato piezo-elettrico, limitato sulle due facce da uno strato metallico, è costituito da ossido di zinco.

La lente in zaffiro, del diametro di 1 mm, presenta una velocità di propagazione c = 11.000 m/s; al contatto con l'acqua (c = 1.500 m/s) l'indice di rifrazione corrisponde a: n = 7,3, il che dà alla lente una forte potenza.

La distanza di lavoro è di qualche centesimo di mm.

Il diametro del punto focale è di circa 0,7 μ. L'oggetto è immerso in acqua, ottimo mezzo di trasmissione dei suoni.

La figura si riferisce ad un prodotto Leitz.



L'immagine globale è ottenuta per scannerizzazione ibrida: in una direzione si sposta la lente acustica; nell'altra l'oggetto.

Conviene che lo strato piezoelettrico sia comandato per brevi treni d'onda intervallati da periodi di silenzio. Durante questi ultimi, l'oggetto produce un'eco dell'onda acustica che l'ha investito e tale onda viene raccolta dalla lente e rinviata allo strato piezo. Così si produce un segnale elettrico di ritorno, anch'esso ad impulsi, che può venire amplificato ed usato per ricostruire l'immagine.

L'eco che rappresenta il segnale utile è legata alle proprietà elastiche dell'oggetto e, penetrando entro una certa profondità, rivela le irregolarità interne di esso. Si può così esaminare la struttura interna di oggetti opachi.

Vediamo qui un risultato simile a quanto avviene colla microscopia foto-acustica di cui sopra (pag. 3), ma in quel caso l'onda elastica è prodotta dall'oggetto; nel caso presente è convogliata dall'esterno su di esso.

L'acquisizione delle immagini acustiche può essere ripetuta a varie profondità se la distanza oggetto - lente può essere variata per gradini successivi; da qui, con appositi programmi, si può ricostruire la struttura elastica dell'oggetto in un'immagine a 3 D.

Questa tecnica si applica in modo particolare all'esame dei circuiti integrati.

# LE TECNICHE "CONFOCALI" (CLSM, CSLM, CSM, CSOM, SCM)

Un'intera classe di nuove tecniche si basa ancora sul noto meccanismo che intende ottenere un'immagine esplorando il piano-oggetto per punti o per righe contigue, secondo righe parallele, come nel classico "raster" televisivo. L'originalità dell'approccio confocale non è la "scannerizzazione" del piano immagine – per questo basterebbe una qualunque videocamera – e neppure l'illuminazione dell'oggetto per punti successivi, ma il raccogliere l'immagine di ogni punto del piano oggetto attraverso un forellino di minime dimensioni.

NB: anche se in italiano va benissimo il termine "forellino", l'estrema diffusione del termine inglese equivalente "pinhole" (= foro di spillo") ci obbliga ad adeguarci.

Forse è meglio discutere su uno schema di principio semplificato per chiarire questo punto essenziale.

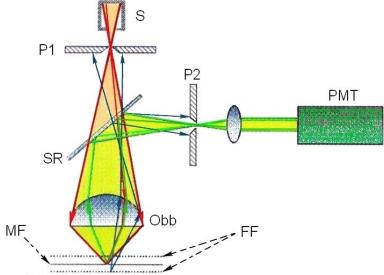


Fig. 3 — Una sorgente (S) è costituita da una lampada ad arco concentrato (a xeno o a vapori di mercurio) o da un laser, il cui fascio è concentrato da un apposito sistema convergente ed illumina il primo "pinhole" (P1), che potremmo chiamare "pinhole-sorgente". Da questo emerge un fascio divergente che occupa tutta la pupilla d'ingresso di un normale obbiettivo da microscopio (Obb): sono indicati in rosso due raggi periferici ed uno ad apertura intermedia. Uno specchio semi-riflettente (SR) elimina una parte di questo fascio (non indicata).

Se la messa a fuoco è corretta, il fascio converge in un punto del piano oggetto (MF = piano di miglior fuoco).

L'oggetto riflette o diffonde, magari per ragioni di fluorescenza, una parte di questo fascio che attraversa di nuovo l'obbiettivo (linee verdi), viene riflesso di lato verso un secondo "pinhole-immagine" (P2) ed incide su un rivelatore, per es. un fotomoltiplicatore (PMT = photomultiplier tube).

Così, un singolo punto del piano oggetto viene illuminato da un'immagine del pinhole-sorgente (creata dall'obbiettivo) e rimanda qualcosa di questo fascio illuminante verso un'immagine, assimilabile alla normale immagine intermedia di un microscopio, in corrispondenza della quale si trova un secondo pinhole.

Affinché il trucco funzioni, sarà ovviamente necessario che il P2 si trovi nella corretta posizione (centrato rispetto al fascio riflesso da SR) ed alla giusta distanza. Il sistema è quindi molto critico e richiede precisione e rigidità di tutte le parti meccaniche. Se il fascio illuminante viene "scannerizzato" da organi intermedi (specchi oscillanti, ad es.), il fascio riflesso va comunque a cadere sul pinhole-immagine, come si può dimostrare con semplici considerazioni geometriche applicate alla legge della riflessione.

I punti disposti su piani fuori fuoco (FF) producono raggi (linee blu sottili - due soli raggi indicati) che non convergono sul pinhole-immagine e vengono in buona parte assorbiti.

■ Dall'esame di questo schema emerge allora un primo punto: il piano del pinhole-sorgente (P1) è coniugato col piano oggetto (linee rosse dello schema). Quest'ultimo poi è coniugato, tramite il semi-riflettente SR, col piano del pinhole-immagine P2. Potremmo chiamare tutto ciò "il sistema dei tre piani coniugati", ma – impossibile fare diversamente – il tutto è universalmente definito "sistema confocale"; così il termine "confocale" equivale a "coniugato".

Per essere precisi, il sistema illuminante confocale si può paragonare alla classica "illuminazione critica" (Sig. R. Tagliaferri, comunicazione verbale).

■ Il secondo aspetto, essenziale per dare al sistema confocale le sue proprietà, è questo: un punto dell'oggetto situato nel piano di miglior fuoco (MF nella figura precedente) è perfettamente coniugato col pinhole-immagine; tutta la radiazione proveniente da quel punto oggetto (linee verdi in figura) si concentra in P2 e perviene al rivelatore, partecipa interamente alla formazione dell'immagine, a parte la perdita subita sul semi-riflettente SR. Se invece consideriamo un punto

situato in un piano sopra o sotto quello di miglior fuoco (FF in figura 3), il fascio da esso emergente (linee blu nella figura), dopo riflessione parziale su SR, non converge sul pinhole-immagine poiché quel punto fuori fuoco non è coniugato con quest'ultimo.

Si noti che, nella figura precedente, per chiarezza, è stato indicato solo il fascio proveniente da un punto sotto al piano di miglior fuoco; il discorso si può ripetere per ogni altro piano e punto

Il risultato di questo meccanismo è che, per un punto oggetto fuori fuoco, la radiazione da esso prodotta si sparge nei dintorni del pinhole-immagine ed in buona parte non perviene al rivelatore: in altre parole, l'immagine finale è quasi priva della radiazione fornita dai piani-oggetto fuori fuoco; ovvero, l'immagine corrisponde quasi solo ai punti del piano di miglior fuoco. È come dire che si esegue una "sezione ottica" di un oggetto a tre dimensioni: si vede solo ciò che è a fuoco. La cosa è preziosa quando il fondo dell'immagine è scuro, come nel fondo scuro ed in fluorescenza; in questi casi, fuori dal sistema confocale, qualunque punto oggetto non a fuoco produrrebbe un alone che si sovrapporrebbe all'immagine a fuoco e la confonderebbe; nel sistema confocale, la radiazione che proviene da tutti i punti fuori fuoco viene quasi del tutto soppressa. Questa eliminazione del "fondo sfocato" consente in fluorescenza di sovracolorare coi fluocromi, cosa impossibile nell'osservazione normale poiché il fondo immagine risulterebbe troppo luminoso.

È come dire che si vede dell'oggetto solo una fettina di spessore pari alla risoluzione assiale. Per essere più precisi, la risoluzione in profondità, in direzione assiale (lungo l'asse  $\mathbf{Z}$  di un diagramma i cui assi  $\mathbf{X}$  ed  $\mathbf{Y}$  si trovano nel piano oggetto), può essere inferiore a 0,5  $\mu$ , la metà della tradizionale risoluzione nel piano X-Y-il piano oggetto – che difficilmente scende sotto 0,25  $\mu$ .

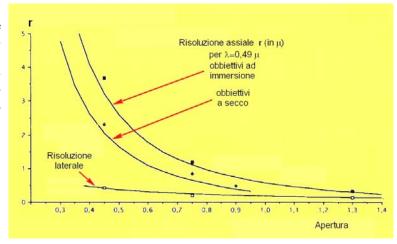
La risoluzione assiale nel sistema confocale migliora naturalmente all'aumentare dell'apertura dell'obbiettivo, col diminuire delle dimensioni dei pinhole-sorgente ed -immagine e col diminuire della lunghezza d'onda.

■ Un terzo punto è questo: se il pinhole-sorgente è sufficientemente piccolo (problemi di resa fotometrica!), la sua immagine nel piano oggetto sarà la classica centrica, con tanto di anelli di diffrazione, e questo rappresenterà il classico limite alla risoluzione laterale del sistema obbiettivo. Quando però quella centrica viene coniugata sul pinhole-immagine, e se questo è adeguatamente piccolo, le regioni periferiche di questa seconda centrica possono venir rimosse dai bordi del pinhole-immagine, il che porta al superamento dei limiti della normale centrica: aumento di risoluzione, generalmente valutato in un fattore di 1,4 ×.

In dettaglio, si dimostra che la massima risoluzione nel piano oggetto (X-Y) si ha quando i due pinhole hanno un diametro di poco inferiore al diametro del disco di Airy che si forma nel relativo piano. Nel caso del pinhole-sorgente, si considera la centrica che si formerebbe nel suo piano se l'obbiettivo desse l'immagine di un punto senza dimensioni del piano oggetto. In pratica, occorre quindi tener conto dell'ingrandimento dell'obbiettivo ed il diametro del pinhole-sorgente può variare fra  $20{\text -}30~\mu$  e  $200~\mu$ .

Fig. 4 — Come si vede, la risoluzione laterale, al crescere dell'apertura dell'obbiettivo, scende a  $0.2~\mu$ .

Quella assiale (lungo l'asse Z) è minore e, stranamente, è maggiore negli obbiettivi a secco poiché l'angolo d'apertura in aria è maggiore che in olio.



Altro vantaggio del sistema confocale: l'oggetto viene illuminato solo un punto alla volta, mentre in un sistema convenzionale tutto il campo oggetto (se l'illuminazione sec. Köhler è correttamente realizzata) è soggetto all'irraggiamento. Riflettiamo: – il sistema confocale, come detto al secondo punto qui sopra, risulta molto vantaggioso nel caso della fluorescenza per via della soppressione della radiazione dai punti fuori fuoco, e quindi viene ampiamente utilizzato proprio con quella tecnica; – in fluorescenza, un fattore gravemente limitante è il rapido decadimento dell'emissione da parte del fluocromo ("fading" o "bleaching" = sbiancamento); ciò considerato, visto che il sistema confocale irradia solo un punto alla volta, il fenomeno del fading è ampiamente ridotto. I prodotti del decadimento dei fluocromi sono poi spesso tossici, e la riduzione dell'irraggiamento e del fading riduce il danno quando si opera su un oggetto vivente.

Sempre supponendo un sistema confocale che opera in fluorescenza, il fatto che la radiazione di fluorescenza abbia in genere (a parte l'effetto Raman) una lunghezza d'onda maggiore di quella incidente, consente di separare i due fasci a mezzo di filtri selettivi: il semiriflettente SR della fig. 3 può essere del tipo dicromatico (molti dicono "dicroico", ma non è corretto): trasmetterà al massimo grado la radiazione di eccitazione e rifletterà al massimo quella di fluorescenza. Se lo si pone fra la sorgente S e P1 (fig. 3) e si aggiungono qua e là altri filtri selettivi, la separazione dei due fasci può essere tale da consentire l'uso di un solo pinhole: il fascio emergente dall'oggetto non verrà indirizzato su un pinhole-immagine separato, ma sul medesimo pinhole-sorgente. Il successivo specchio "dicroico" provvederà a rimandare quel fascio sul rivelatore.

In questo caso si elimina il problema della centratura del pinhole-immagine.

#### Lo scanner

Finora abbiamo parlato di un punto oggetto irradiato, uno per volta. Ma, per costruire un'immagine, ne servono parecchi.

Occorre quindi che il piano oggetto venga "scannerizzato", esplorato, in tanti punti in successione o in tante righe parallele.

•• Si può interporre nel fascio irradiante – quello che emerge dal pinhole oggetto – uno specchio oscillante o "galvanometro" che farà spostare il punto irradiato dell'oggetto secondo una linea che corrisponde al diametro del campo oggetto. Si ha quindi un irraggiamento dell'oggetto secondo una linea.

Il termine "galvanometro" si usa qui per somiglianza con i microamperometri a specchio.

•• Per esplorare l'intero campo oggetto si può allora ricorrere a:

un secondo "galvanometro" che oscilla in una direzione perpendicolare alla prima, a frequenza minore: il campo verrà esplorato per righe successive, parallele fra loro, il classico "raster" di tipo televisivo;

un solo galvanometro seguito da un prisma rotante che porta molte facce laterali speculari, le quali imitano uno specchio oscillante in una direzione ortogonale a quella del primo specchio; nei casi in cui il pinhole oggetto è sostituito da una fenditura (il primo galvanometro diventa inutile), la successione delle righe parallele può essere fornita proprio dallo specchio poligonale.

Il primo sistema a fenditura è dovuto a Koester, 1979.

un solo galvanometro – esplorazione secondo una riga – ma con lento spostamento del tavolino porta-oggetto a mezzo di opportuno motore collegato ai movimenti del tavolino stesso. La formazione del raster si avvale allora di due movimenti separati, del fascio e dell'oggetto; questo metodo, data l'inerzia del sistema meccanico del tavolino, sarà allora molto lento e per un'immagine completa occorreranno molti secondi: la velocità del tavolino deve essere tale che le righe disegnate dal galvanometro risultino contigue. Anche il galvanometro del resto possiede un'inerzia e la durata della singola riga limita la velocità del tavolino.

•• Deflessione ottica. Si può deflettere un fascio di radiazione facendogli attraversare un cristallo od una ceramica piezoelettrica portante due elettrodi su due facce opposte. Applicando una tensione oscillante sugli elettrodi, a frequenza molto elevata, il cristallo o la ceramica subisce

una variazione periodica della densità, quindi una variazione del suo indice di rifrazione, che si propaga nella ceramica costituendo "un reticolo di fase". Un fascio che attraversa la ceramica può quindi essere diffratto di un angolo variabile. Questo tipo di scanner "acusto-ottico" può essere molto veloce, ma il suo indice presenterà una "dispersione", una variazione dell'indice in funzione della lunghezza d'onda, il che crea forti problemi di cromatismo in tutto il sistema se si opera in luce bianca. I sistemi piezoelettrici soffrono anche di isteresi e scarsa linearità nella risposta.

### •• Il disco rotante (Nipkow, 1967)

È stato uno dei primi tentativi di sistema confocale. Si tratta di un disco che porta numerosi pinhole (fino a 200.000) disposti secondo una spirale di Archimede. Durante la rotazione del disco, il piano oggetto viene irradiato in altrettanti punti abbastanza contigui da garantire una sufficiente risoluzione. S'intende che il disco si trova nel piano coniugato dell'oggetto, cioè nel piano dell'immagine intermedia. Il diametro dei fori è di qualche decina di micron.

Col disco di Nipkow si esplora tutto il piano oggetto e l'immagine prodotta non sarà "punto per punto", ma totale; il rivelatore dovrà avere una superficie sensibile di dimensioni tali da registrarla integralmente. Può bastare un sensore del tipo per telecamere. Negli strumenti commerciali, la velocità del disco è tale da consentire la ripresa di decine o centinaia di immagini al secondo (fps = frames per second). In sostanza si ottiene un "filmato video" e quindi è possibile esaminare oggetti viventi in tutte le loro modificazioni in tempo reale.

Se la sorgente è "a luce bianca" il "video" può essere a colori reali ("true color").

### La sorgente

Come abbiamo appena detto, se la velocità del sistema lo consente (sistemi a disco rotante, specialmente), è possibile ricavare immagini in rapida successione, a velocità "video", ed in questo caso è utile una sorgente "bianca" che consentirà di ottenere immagini in colori reali. Le limitazioni fotometriche imposte dalle dimensioni del pinhole-sorgente richiedono in ogni caso una sorgente molto brillante, possibilmente di piccole dimensioni per facilitare la concentrazione del fascio da esse prodotto. La scelta usuale cade su lampade ad arco concentrato in vapori di mercurio (che però mostra uno spettro con forti righe) o, meglio, in xeno, a spettro continuo.

Quando si opera in fluorescenza, il caso più comune, si possono sfruttare le righe di massima emissione dei vapori di mercurio e poi raccogliere le varie bande della radiazione di fluorescenza con due o più fotomoltiplicatori preceduti da specchi dicroici e filtri a banda stretta "tarati" in funzione dello spettro di emissione dei fluocromi previsti.

Quando il raster viene realizzato "a spot" successivi con galvanometri o prismi rotanti o scanner acusto-ottici, si preferiscono, per la loro brillanza, sorgenti laser. Se il laser è a lunghezza d'onda fissa, non sarà possibile ottenere immagini in colori reali. Oggi però, per la fluorescenza, si possono trovare dei laser che emettono su più righe o addirittura "tarabili" su qualunque lunghezza d'onda entro certi intervalli. In questi casi, l'emissione del laser dovrà accordarsi con la sensibilità spettrale del fluocromo usato – la varietà dei fluocromi disponibili si sta allargando un giorno dopo l'altro.

Da quanto detto risulta che un sistema confocale può operare entro una regione spettrale molto ampia, dalla classica fluorescenza in UV al sistema "a più fotoni" che vedremo fra poco, che opera nella regione del rosso o del vicino infrarosso (NIR = near infrared).

Da ciò risulta che i normali obbiettivi ed altri sistemi ottici dei microscopi convenzionali possono presentare problemi di aberrazioni cromatiche poco tollerabili. In genere, i sistemi ottici per un sistema confocale saranno progettati *ad hoc*.

# La velocità

Abbiamo già rimarcato che i sistemi a disco rotante possono presentare una velocità di ripresa compatibile con un normale filmato video. I sistemi a laser e specchi oscillanti possono richiedere da uno a venti secondi per immagine (qualche millisecondo per pixel), per cui non sono utilizzabili su oggetti in movimento. Ancora più lenti i sistemi con scansione dell'oggetto (del tavolino).

#### Il sensore o rivelatore

Quando la scansione del piano oggetto è veloce, abbiamo notato, occorre un sensore di superficie ("area detector") come nelle videocamere, per trasdurre l'intera immagine in segnale video. Nei sistemi più lenti, si esplora uno spot alla volta ed allora basta un sensore integrale, che rivela in ogni istante tutta la radiazione che lo colpisce. Data la bassa resa fotometrica dei sistemi confocali, la scelta cade di solito su fotomoltiplicatori (PMT = photomultiplier tube). In questo caso, dovrà seguire un circuito elettronico capace di ricostruire l'intera immagine partendo dalla sequenza dei segnali corrispondenti ad altrettanti pixel.

## La scansione secondo l'asse Z

La tecnica confocale, ovviamente, si avvicina molto a quella convenzionale, per lo meno in quanto non richiede di operare sotto vuoto. Si può quindi osservare anche oggetti *in vivo*, senza preparazione preliminare, a parte il trattamento con fluocromi, come già accennato. Ma c'è qualcosa di originale.

Abbiamo citato sopra la piccolissima profondità di fuoco del sistema confocale, il fatto che "si vede a fuoco" solo uno spessore minimo dell'oggetto, fino a  $0.5~\mu$  di spessore, la "sezione ottica". Tale facoltà consente allora di riprendere una successione di immagini corrispondenti a piani successivi all'interno di un oggetto spesso.

In altre parole, la possibilità di eseguire "sezioni ottiche" dell'oggetto, in qualunque regione del suo spessore – compatibilmente con la distanza di lavoro dell'obbiettivo, s'intende – rende in molti casi inutile la tradizionale tecnica delle "sezioni sottili", quasi obbligatoria nell'esame microscopico convenzionale di oggetti solidi.

In genere, gli strumenti operanti con la tecnica confocale possiedono un meccanismo di messa a fuoco motorizzato che consente di riprendere una serie di immagini – di sezioni ottiche – a diversa altezza nello spessore dell'oggetto. Una specie di "fette" successive. Nei sistemi con scansione a galvanometri o "acousto-optic" (pagg. 8–9), il movimento di messa a fuoco del tavolino rimane l'unico comandato a motore.

La distanza (secondo l'asse Z) fra una "fetta" e l'altra, si chiama "step size" (= dimensioni del gradino).

Ogni fetta, ogni sezione ottica, come abbiamo detto, ha uno spessore che abbiamo definito come "risoluzione assiale" (dipendente da: apertura dell'obbiettivo, diametro dello "spot immagine" e lunghezza d'onda), che può scendere anche fino 0,5 µ. Quando lo "step size" ha lo stesso spessore della risoluzione assiale, allora tutto lo spessore globale dell'oggetto verrà esplorato. Se lo step size è maggiore della risoluzione assiale, l'immagine dell'oggetto sarà costituita da piani non contigui separati da piani non osservati, di spessore pari alla differenza fra step size e risoluzione assiale. Insomma, occorre distinguere fra questi ultimi due valori.

Ebbene, con le moderne tecniche di ripresa digitale delle immagini e di elaborazione elettronica è poi possibile integrare una "pila" di immagini parallele in modo da ricavarne una ricostruzione in 3 D dell'intero oggetto. Da questa poi è possibile ricavare immagini contenenti tutti i dati della pila di immagini per un valore fisso del parametro X oppure Y: è come dire che si ottiene un'immagine nel piano X-Z (o Y-Z), invece della normale immagine nel piano X-Y. Qualcosa del genere si fa in un normale esame diagnostico TAC.

È chiaro che queste possibilità d'integrazione ed elaborazione delle immagini in uno spazio a tre dimensioni sono progredite poco alla volta, parallelamente allo sviluppo dei sensori fotosen-

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> La risoluzione assiale è in genere migliore nei sistemi a laser.

sibili digitali e del calcolo elettronico. È il piccolo spessore della sezione ottica consentito dal sistema confocale che ha dato impulso alla tecnica 3 D, concettualmente possibile con qualunque altro sistema ottico.

# La diascopia

Finora abbiamo tacitamente limitato il nostro esame a strumenti che lavorano in episcopia, come quello schematizzato in fig. 3. Nella pratica, infatti, questo schema è il più diffuso per la buona ragione che i maggiori pregi del sistema confocale si rivelano nell'esame in fluorescenza, che da tempo ha abbandonato l'eccitazione in diascopia.

Ma nulla vieta che si possa operare anche in diascopia.

In questo caso, si dispongono obbiettivo e condensatore simmetricamente rispetto al piano oggetto: il condensatore deve svolgere la funzione che nello schema episcopico è svolta dall'obbiettivo e pertanto deve possedere pari apertura, pari risoluzione e pari correzioni. Il pinhole-immagine si troverà sotto al condensatore, simmetricamente disposto rispetto al piano-oggetto come il pinhole-sorgente.

Se lo schema più comune è quello episcopico in fluorescenza, dipende dai progressi continui nella produzione di fluorromi sempre più selettivi e specifici, che consentono di mettere in evidenza molte strutture cellulari minutissime.

La specificità dei fluocromi è spesso dovuta alla possibilità di legarli chimicamente ad anticorpi che riconosceranno particolari sostante come antigeni e vi si legheranno con estrema precisione. Si tratta di un meccanismo di tipo immunitario, e si parla di "immuno-fluorescenza". Secondo questa linea, si evidenziano non solo strutture, ma specifici complessi biochimici.

L'idea base del sistema confocale è stata espressa da M. Minsky intorno al 1955 (brevetto del 1957), ma la tecnologia dell'epoca non consentiva la produzione di strumenti di uso pratico e di prestazioni avanzate. Il progresso del confocale è parallelo con quello delle sorgenti laser, dei sistemi elettronici di elaborazione e ricostruzione delle immagini e dei software corrispondenti.

#### SISTEMI a MULTIFOTONI

Ripartiamo dallo schema già esaminato del sistema confocale. Supponiamo ancora di operare con la tecnica della fluorescenza, dominio prevalente dell'ottica confocale.

Dallo schema di fig. 3 sappiamo che il fascio d'eccitazione che proviene dal pinhole-sorgente converge verso un punto ben definito del piano oggetto. L'intensità della fluorescenza, a parte il fading ed altri fattori, è più o meno proporzionale all'intensità dell'irraggiamento. Il fascio conico che converge nel piano oggetto e diverge dopo esser stato riflesso (o trasmesso) eccita l'oggetto in un ampio spessore, ben al di là della "sezione ottica" sopra definita. La sezione ottica è creata solo dal pinhole-immagine, il quale elimina il fascio che emerge dai punti fuori fuoco. Ma un ampio spessore di oggetto è esposto simultaneamente all'irraggiamento.

In alternativa, si può fare in modo che l'eccitazione della fluorescenza avvenga solo nel punto di massima convergenza del fascio illuminante. Se così fosse, la sezione ottica sarebbe dovuta al fatto che l'eccitazione del fluocromo avviene solo in un piano assai sottile dell'oggetto, eliminando quindi tutta la radiazione che può provenire dai piani contigui.

Questo notevole risultato si ottiene sfruttando un fenomeno dimostrato da W. Kaiser e B. Garrett nel 1961, applicato alla microscopia da W. Denk nel 1990: l'eccitazione a due o più fotoni. Ecco il succo della questione.

Quando una qualunque molecola assorbe un fotone, due sono le possibilità: o lo diffonde passivamente (effetto Rayleigh), o lo assorbe e si porta ad un livello energetico superiore, eccitato. In questo caso, il fotone deve possedere un'energia, e quindi una frequenza, uguale o superiore all'energia corrispondente al salto compiuto dalla molecola. Dopo un tempo brevissimo (fluorescenza) o più o meno lungo – anche ore (fosforescenza) – la molecola torna allo stato iniziale e-

mettendo un fotone di energia, e quindi di frequenza, generalmente inferiore (Legge di Stokes).

Per ottenere quindi una fluorescenza nello spettro "visibile" occorre eccitare il materiale con radiazione di maggiore energia, nella regione del blu-viola o nell'UV.

Da qui il danno che l'irraggiamento provoca nell'oggetto.

Questo avviene quando una data molecola viene eccitata da un solo fotone.

L'effetto "**two-photon**" o "**multiphoton**" è completamente diverso: se due o tre fotoni di energia pari alla metà (o un terzo) di quella necessaria ad eccitare la fluorescenza di un dato composto giungono in tempi brevissimi sulla molecola, si può ancora avere l'eccitazione di essa, ma <u>usando radiazione di energia pari alla metà</u> – o ad un terzo – di quella richiesta per la normale fluorescenza. In parole povere, per avere fluorescenza nel campo visibile, si può irradiare l'oggetto nell'estremo rosso o addirittura nell'infrarosso (IR).

Questo riduce di molto gli effetti dannosi sull'oggetto e la creazione del fading – con la risultante produzione di composti di degradazione del fluocromo, spesso tossici.

Ma il pregio maggiore del metodo "two-photon" è un altro: l'eccitazione è proporzionale <u>al quadrato</u> dell'intensità dell'irraggiamento. Questo significa che, se tutto è ben congegnato, l'eccitazione si verifica solo nel punto di maggior convergenza del fascio eccitante, non in tutto il suo volume. Si parla di fenomeno "non lineare".

Ecco perché la fluorescenza si verifica, come detto sopra, solo in uno spessore ridottissimo del campione.

In un sistema confocale ad eccitazione "two-photon", il pinhole-sorgente rimane necessario per limitare l'irraggiamento dell'oggetto ad una macchia del diametro della centrica, ma il pinhole-immagine è quasi inutile, visto che tutto ciò che è fuori fuoco non viene neppure eccitato.

Un altro vantaggio del sistema "two-photon" è che l'irraggiamento nel rosso estremo o nell'IR può penetrare in un oggetto vivente molto più profondamente dell'UV: si può esplorare l'oggetto in uno spessore assai maggiore di quello consentito dall'eccitazione uni-fotone.

Le condizioni per la realizzazione della fluorescenza "two-photon" sono ovvie: – l'energia della somma dei due o tre fotoni "eccitanti" deve essere almeno uguale all'energia del fotone emesso per fluorescenza – i due fotoni eccitanti devono raggiungere la molecola-bersaglio entro un tempo assai breve:  $10^{-16}$  sec.

Quest'ultima condizione sembrerebbe quasi irrealizzabile, ma oggi la soluzione è data dai laser "a femtosecondi", capaci di emettere impulsi brevissimi, con una velocità di ripetizione dell'ordine appunto del femtosecondo<sup>7</sup>.

I sistemi "two-photon" sono quindi legati all'uso di questi laser speciali, che ovviamente sono assai costosi.

La struttura di base dello strumento rimane quella del confocale.

### ALCUNE VARIANTI sul TEMA

Ne citiamo solo un paio: i costruttori si sbizzarriscono, come sempre, a trovare nuove applicazioni per un dato principio fisico.

Il sistema "Laser feedback microscopy" (LFM) di Zeiss (A. Bearden, 1989) si basa ancora sul sistema confocale, ma ottiene un'interferenza fra il fascio laser di eccitazione ed uno di "riferimento" in modo da poter risolvere spostamenti in direzione Z dell'oggetto dell'ordine di una frazione di lunghezza d'onda, dell'ordine del nanometro. Per questo dispositivo si veda, a pag. 4, la figura 1 che ne dà uno schema intuitivo.

Il "Differential phase contrast" (DPC) (Pang, 1987) prevede un sistema confocale con un rivelatore diviso in quattro quadranti. Se l'oggetto, nel punto irradiato, presenta piccole variazioni d'inclinazione o di altezza della superficie, il fascio che ritorna verso il pinhole-immagine viene più o meno deviato rispetto al pinhole medesimo e quel punto dell'oggetto apparirà più scuro; i quattro quadranti del rivelatore saranno diversamente illuminati e questa differenza indica la deviazione della superficie dell'oggetto rispetto al piano ideale.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> 1 femtosecondo = 1 fs =  $10^{-15}$  sec.

Le immagini che si ottengono in questo modo danno una sensazione di rilievo, come nella classica tecnica del contrasto interferenziale differenziale (DIC).

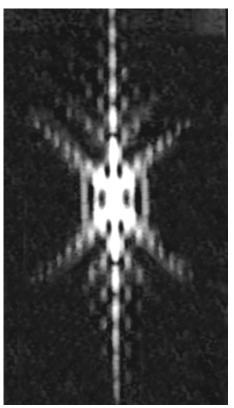
### La DECONVOLUZIONE

La tecnica confocale ha per principio il compito di obliterare la radiazione proveniente da piani non a fuoco dell'oggetto. Ma un risultato analogo può essere raggiunto per via matematica.

Fig. 5 – Sezione longitudinale di una centrica, passante per l'asse ottico.

Questo è il concetto: sappiamo che, ad un punto oggetto (punto geometricamente inteso, senza dimensioni) corrisponde, nel piano immagine, una caratteristica figura, la famosa "centrica" o "immagine di diffrazione" di Airy, supposto un sistema ideale senza aberrazioni. Sappiamo anche però che tale immagine non si limita al piano immagine ideale, ma si espande nello spazio; in altre parole, la centrica è una figura a tre dimensioni a forma di bicono (vedi, in questo sito, sez. "Microscopia ottica", l'art. n° 21: "Lo star test, ...", pagg. 4 – 9). Possiamo descrivere l'immagine a 3 D di un singolo punto oggetto come la sua "funzione di trasferimento" o PSF (point spread function). Figura a lato.

Se cioè osserviamo tale immagine in una serie di posizioni di messa a fuoco contigue e ricostruiamo l'immagine a 3 D con opportuni calcoli, possiamo trasformare la centrica in un algoritmo che la rappresenta.



Occorrerà fornire ad un calcolatore provvisto di apposito software una serie di immagini di quel punto oggetto riprese a distanza ben definita.

Occorrerà anche che il movimento di messa a fuoco sia motorizzato e controllato dal medesimo calcolatore in modo da fornire al software l'esatta coordinata nell'asse Z di ogni immagine.

Il sensore può essere rappresentato da una videocamera ad alta risoluzione, come una telecamera digitale a CCD raffreddato.

Naturalmente, la PSF che si ottiene dipende dal sistema ottico utilizzato, ivi compreso il copri-oggetto, l'olio da immersione, ecc. Per ogni combinazione ottica utilizzata occorre ovviamente calcolare una diversa PSF.

Se il software ha così acquisito la descrizione matematica della struttura a 3 D della centrica, può anche compiere l'operazione inversa ("deconvoluzione"): data l'immagine di un punto sfocato, potrà ricostruirne l'immagine a fuoco portandola nello stesso piano oggetto in cui si trovano gli altri punti a fuoco. In altre parole, l'informazione sull'intensità di un punto sfocato viene recuperata (nel sistema confocale viene obliterata) e "riassegnata" al piano a fuoco.

I matematici parlano di manipolazione della "trasformata di Fourier".

Naturalmente, in questa operazione il software è informato sulle coordinate 3 D di ogni punto (nel piano X ed Y dal sensore video; nell'asse Z dal comando del motore di focalizzazione). Da tutto ciò si può allora, con sofisticata elaborazione, ricostruire la struttura tridimensionale dell'oggetto, avendo ricondotto però l'immagine di ogni punto sfocato in un punto a fuoco nel piano cui esso appartiene.

Il risultato finale può allora essere simile a quello di un sistema confocale, coll'inconveniente di un lavoro di calcolo assai lento: anche qualche ora per immagine. La risoluzione nel piano X-Y e nell'asse Z può essere la stessa: rispettivamente anche meno di 0,2  $\mu$  e 0,5  $\mu$ . L'uso di una sorgente "bianca" può consentire la ricostruzione di immagini in colori reali; se si opera in fluorescenza, si potrà scegliere il fluorromo senza troppe limitazioni.

Restiamo ancora, per poco, nel campo ottico strettamente inteso.

Fin dalla fine del secolo scorso, sta entrando nel campo applicativo un principio che era già stato intuito nel 1928 (E. H. Synge, lettera ad A. Einstein). Le prime applicazioni pratiche risalgono agli anni '80, per opera di tecnici dell'IBM e dell'Università di Cornell (Ithaca, N.Y.).

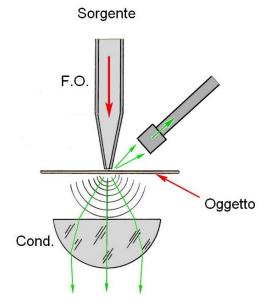
Il concetto di base è semplice: se si pone assai vicino all'oggetto un diaframma con un foro molto piccolo (inizialmente si ipotizzava un foro di 10 **nm**), l'illuminazione del piano oggetto si riduce all'incirca alle dimensioni del foro e quella diventa la risoluzione del sistema. La distanza foro—oggetto deve essere simile al diametro del foro.

L'oggetto andrà poi esplorato per punti e righe successivi, secondo la modalità "raster".

Qualche esperimento fu attuato nel 1972 con microonde (E. A. Ash), ma oggi, con gli sviluppi della tecnologia delle fibre ottiche, si dispone una guida di luce (una fibra ottica, per intenderci) con l'estremità assottigliata a mo' di sottile cono fino ad un diametro di 20–100 **nm** (0,05 μ, mediamente); si alimenta l'altra estremità della fibra con opportuna sorgente; si dispone l'estremo assottigliato della fibra molto vicino all'oggetto, di cui si vuole osservare la superficie. Questo "molto vicino" giustifica il termine "near field" (campo vicino) poiché si tratta di pochi **nm**.

Fig. 6 — Schema di base del sistema "near field". Una sorgente opportuna alimenta la fibra ottica (F.O.) la cui estremità sfiora l'oggetto. La radiazione trasmessa o diffusa (frecce verdi) viene poi raccolta da un sistema ottico convergente (Cond.) e, tramite specchi o altre fibre ottiche, convogliata ad un rivelatore.

Per migliorarne la trasmissione, la fibra ottica può essere rivestita da uno strato ("cladding") metallizzato.



La radiazione diffusa o trasmessa o emessa per fluorescenza, viene poi raccolta da un opportuno sistema convergente a ragionevole distanza ("far field" = campo remoto) ed inviata ad un rivelatore molto sensibile (PMT o speciali fotodiodi "avalanche").

Il piano oggetto viene esplorato quindi in una serie di punti ben definiti. Per ottenere un'immagine di una certa area in quel piano, si ricorre di solito ad un movimento dell'oggetto nel piano perpendicolare all'asse della fibra, per righe successive parallele, il classico raster.

Per sfruttare appieno le piccole dimensioni dell'estremità della fibra ("tip") ed evitare che il fascio che ne emerge si allarghi per diffrazione, occorre che il "tip" stia molto vicino alla superficie dell'oggetto. Prima condizione.

Data l'elevata risoluzione del sistema, occorre poi che l'oggetto venga movimentato con sistemi molto rigidi, molto precisi e con elevata risoluzione. Seconda condizione.

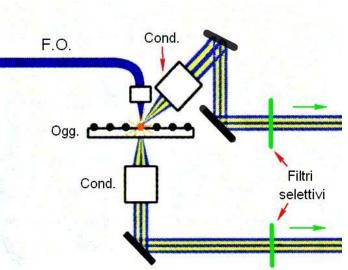
Riguardo ad entrambe le condizioni, si ritrovano le esigenze dei sistemi non ottici cui accenneremo più sotto (SPM), in cui la distanza fra una "sonda" solida e l'oggetto è molto piccola o addirittura nulla, e l'oggetto va spostato con estrema risoluzione.

Per eseguire lo spostamento del nostro "tip" nell'asse Z, in verticale, e dell'oggetto – nel piano X-Y, il piano oggetto – si ricorre in genere a cristalli piezoelettrici o materiali artificiali (ceramiche sinterizzate) sottoposti ad un campo elettrico variabile; tale campo viene creato applicando su due facce della lamina ceramica due elettrodi, due lamine conduttrici collegate ad un generatore di tensione. Ne abbiamo già parlato a proposito dei microscopi acustici e nella nota a pag 2.

Fig. 7 – In uno schema più generale, si comprende come la radiazione che incide sull'oggetto possa venire raccolta da due diversi canali, con lo schema "per trasmissione" o "per riflessione".

Se si opera in fluorescenza, opportuni filtri selettivi bloccano la radiazione di eccitazione.

Per rendere costante la distanza fra "tip" ed oggetto (inutile dire che non è possibile usare un copri-oggetto: troppo spesso) si ricorre ad un sensore che, alimentando un circuito di feedback negativo, opera sul sistema di spostamento del tip; la risoluzione in asse Z può scendere a meno di 1 **nm**. Anche questo è un problema comune ai sistemi SPM.



Nel complesso, il sistema "near field" consente di fare ciò che si fa con un normale microscopio a raster, ma in scala nanoscopica: illuminare un oggetto, raccogliere la radiazione da esso trasmessa o diffusa, provocare in esso la fluorescenza, eseguire analisi spettroscopiche, anche nella banda infrarossa, anche nel campo Raman, quindi eseguire analisi chimiche e fotochimiche, in ogni caso in dimensioni di poche decine di **nm**. Il "near field" si combina perciò con la tecnica SPM e, come questa può operare su oggetti non trattati, anche viventi, anche in ambiente aereo o in acqua.

Le piccole dimensioni del tip consentono poi di restringere l'eccitazione della fluorescenza a regioni del piano X–Y dieci volte (circa) più piccole di quelle consentite dalla microscopia convenzionale e dal sistema confocale con i più forti obbiettivi ad immersione. Si può arrivare ad una risoluzione di una ventina di **nm.** 

Il pregio comunemente attribuito al sistema "near field" di "superare i limiti della risoluzione legati alla diffrazione" è dovuto al fatto che il "tip" della fibra ottica di illuminazione può essere più piccolo della lunghezza d'onda della radiazione impiegata.

Poiché però il tip deve trovarsi ad una distanza minima dall'oggetto, non sarà possibile scendere nella profondità dell'oggetto, come si fa invece col sistema confocale. In compenso, il sistema di feedback che mantiene costante la distanza fra tip ed oggetto può dare informazioni topografiche sull'andamento della superficie esplorata.

Per risolvere alcuni problemi legati a questo sistema si usa spesso far oscillare il tip con movimenti assai piccoli ad alta frequenza. La variazione della distanza fra tip ed oggetto produce nel circuito di feedback un segnale alternato che varia di ampiezza appena quella distanza si scosta dal valore desiderato e può facilitare quindi la stabilità del dispositivo.

Questo il principio. La realizzazione pratica ha imposto però molti aggiustamenti ed accorgimenti. Fra l'altro, le piccole dimensioni del tip danno al sistema una resa fotometrica bassissima, resa che diminuisce col cubo della distanza fra tip ed oggetto.

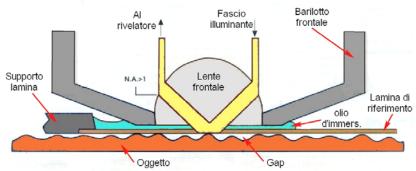
## PHOTON TUNNELING MICROSCOPY (PTM) (1993)

Siamo ancora nel campo della microscopia ottica, ma sfruttando l'effetto tunnel ottico: quando un fascio incide su una superficie lucida da un mezzo più rifrangente ad uno meno rifrangente con incidenza superiore all'angolo limite, si verifica la riflessione totale ed il fascio non subisce perdite fotometriche; però, al di là della superficie riflettente, per uno spessore di circa 1/2 di lunghezza d'onda, si crea una "onda evanescente" che non si propaga oltre, ma contiene una parte dell'energia dell'onda incidente.

Se, molto vicino alla superficie, si trova un oggetto non assorbente, l'onda evanescente si propaga in esso e sfugge al fascio riflesso. L'immagine di quell'oggetto mostrerà con forte contrasto quelle regioni della superficie dell'oggetto in cui si verifica questo effetto tunnel in campo

ottico. In altre parole, si distinguono bene i punti dell'oggetto che sfiorano la superficie riflettente da quelli che si trovano fuori dall'onda evanescente.

Fig. 8 — In sostanza, un microscopio episcopico con illuminazione in fondo chiaro: il fascio illuminante giunge sulla superficie inferiore della lamina di riferimento con un angolo superiore all'angolo limite e viene totalmente riflesso. Un eventuale oggetto assai vicino — il "gap" deve essere minore dello spessore dell'onda evanescente — appare più scuro dove tale onda si propaga nell'oggetto.



Si noti che il fascio illuminante deve provenire entro l'apertura dell'obbiettivo (che deve essere ad immersione); siamo quindi in condizioni di fondo chiaro, ma con forte obliquità del fascio, tale da provocare la riflessione totale al di sotto della lamina.

Lo spazio ("gap") fra lamina di riferimento ed oggetto deve essere pieno d'aria; la lamina aderisce alla lente frontale dell'obbiettivo tramite un velo d'olio d'immersione e deve essere piana e liscia entro una minima frazione di lunghezza d'onda.

L'immagine si forma e può essere vista o fotografata con mezzi convenzionali.

Questa tecnica non aumenta molto la risoluzione trasversale, ma aumenta molto quella in spessore per via dell'esiguo spessore dell'onda evanescente, fino a 0.2 - 0.4 **nm** nella regione di massima intensità. Le regioni dell'oggetto che si trovano fuori dello spessore dell'effetto tunnel appaiono piatte in quanto lì prevale la riflessione totale.

Il sistema di rilevazione PTM può essere applicato ad uno strumento "near field" (vedi sopra), all'interno di un sistema SPM (vedi sotto, pag. 23). Ne nascono allora le tecniche PSTM = STOM = EFOM (vedi la sezione "Acronimi", alla fine dell'articolo).

#### MICROSCOPIA A RAGGI X

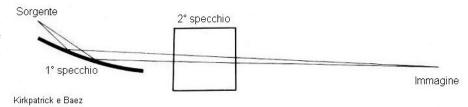
Visto che la lunghezza d'onda dei raggi Röntgen (o "X") è assai minore di quella delle radiazioni ottiche, UV ed IR (da 0,1 a 10 nm), si potrebbe pensare di utilizzarli per ottenere immagini a maggior risoluzione, anche più di 100 volte quella ottenibile dalla microscopia convenzionale.

Ma c'è qualche difficoltà: non si conoscono mezzi per ottenere la rifrazione, e quindi lenti convergenti, per tali radiazioni; dunque, niente obbiettivi per raggi X. Si possono solo costruire specchi, di natura metallica. Con opportune curvature, anche gli specchi possono operare la convergenza dei raggi X e quindi è possibile costruire sistemi ottici per essi. Si tratta di specchi a riflessione totale. In questi sistemi occorre correggere con molta cura l'astigmatismo, ma non esiste aberrazione cromatica in quanto le leggi della riflessione non dipendono dalla lunghezza d'onda.

Problemi del genere ha dovuto affrontare anche l'astronomia a raggi X.

Uno degli schemi proposti prevede due specchi cilindrici disposti su piani ortogonali fra loro. Un primo specchio crea la convergenza secondo un piano meridiano verticale; un secondo sul piano orizzontale perpendicolare al precedente.

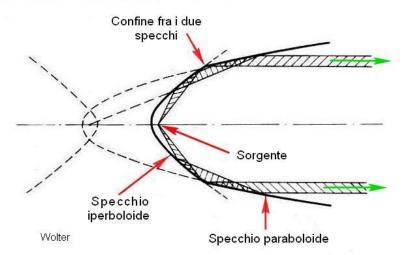
Fig. 9 – Uno schema di principio relativamente facile da costruire poiché le superfici riflettenti sono cilindriche.



Un altro schema prevede due specchi concavi non sferici coassiali.

 $Fig. \ 10-Certamente\ più\ difficili$  da costruire sono gli specchi non sferici.

NB: Le figure 1/2/9/10/11, con modifiche, sono tratte da: Beyer e Riesenberg, Handbuch der Mikroskopie, Verlag Technik, Berlin, 1988.



Altro schema si basa su tre specchi concavi e convessi coassiali, non conici.

Fig. 11 — Sono disegnati due raggi, uno di massima apertura (in rosso) ed uno parassiale (in verde).

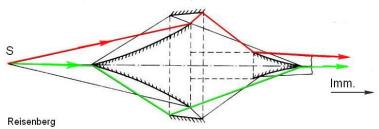


Fig. 12

In altri casi, si ottiene la convergenza dei raggi X sfruttando le "lamine a zone di Fresnel" (fig. 12): si tratta di lamine trasparenti con zone opache circolari concentriche di decrescente larghezza e crescente diametro.

Sfruttando la distribuzione della radiazione diffratta da un punto-sorgente ed obliterando le "zone" corrispondenti ad opportune fasi dell'onda diffratta, la "lamina a zone" può operare la convergenza del fascio che l'attraversa e quindi comportarsi come una lente convergente.<sup>8</sup>

Non risulta che la tecnica dei raggi X sia stata adottata largamente, anche se in certi casi (oggetti opachi, ad es.) può fornire informazioni strutturali uniche. Infatti, l'assorbimento dei raggi X è legato al peso atomico dell'atomo e quindi un'immagine "in X" dà informazioni sulla distribuzione degli elementi (chimicamente intesi) nel campione.

Lo spessore dell'oggetto viene in genere tenuto inferiore a 10  $\mu$ . La risoluzione nel piano oggetto ha valori simili, ma l'oggetto va tenuto sotto vuoto.

#### I MICROSCOPI ELETTRONICI

Ora esaminiamo sistemi ingrandenti ad immagine globale o a raster, che non sfruttano più radiazioni elettromagnetiche o acustiche, ma particelle elementari cariche: elettroni (raramente ioni) generati da un "cannone" ed accelerati da opportuni elettrodi.

Anche le particelle cariche, come le radiazioni elettromagnetiche (ottiche, UV, IR, X), se non sollecitate da campi esterni, si propagano in linea retta. Si può nel loro caso parlare di rifrazione, o almeno di deflessione, e quindi di "lenti".

Le lenti per elettroni o ioni possono essere costituite da campi elettrici (elettrostatici, per

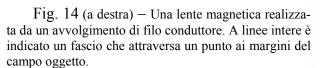
<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Vedi: R. Bruzzese – Ottica, laser e applicazioni – Liguori, Napoli, 1994.

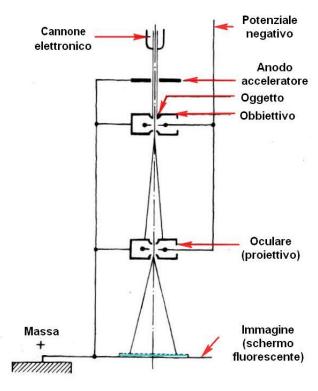
l'esattezza) o magnetici concentrati; le lenti elettrostatiche si realizzano con elettrodi forati ad alto potenziale (figura a lato).

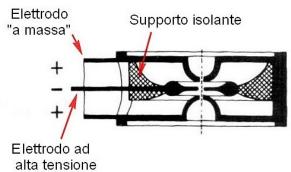
Fig. 13 – Una tipica lente elettrostatica per elettroni: un elettrodo a tensione negativa di molti kV accompagnato da entrambi i lati da due elettrodi "a massa" (a potenziale convenzionale zero). Il fascio traversa verticalmente l'insieme dei tre elettrodi e viene reso convergente.

(Da: W. Glöde – Vom Lesestein zum Elektronenmikroskop, Berlin, 1986, modif.)

Le lenti magnetiche si realizzano con bobine anulari percorse da corrente continua (figura 14, qui sotto).







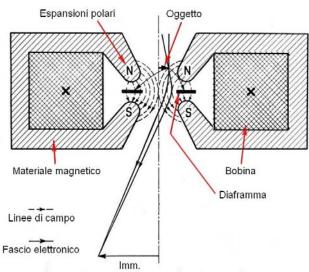


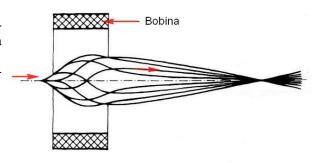
Fig. 15 (a sinistra) – Una lente elettrostatica si può rappresentare come una lente ottica ed uno schema elementare di microscopio elettronico ricorda da vicino un microscopio ottico a proiezione.

(Da: W. Glöde – Vom Lesestein zum Elektronenmikroskop, Berlin, 1986, modif.)

Per le lenti magnetiche il paragone con le lenti ottiche è meno stringente poiché gli elettroni vengono deflessi da un campo magnetico, ma percorrono traiettorie elicoidali (figura seguente).

Fig. 16 (a destra) — In una lente magnetica, ogni elettrone può convergere verso un medesimo punto focale, ma non procedendo in linea retta.

(Da: W: Glöde – Vom Lesestein zum Elektronenmikroskop, Berlin, 1986, modif.)



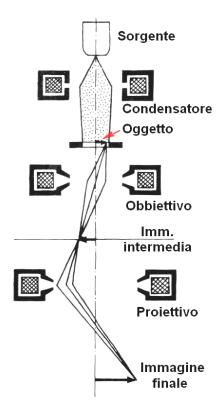


Fig. 17 – Anche nel caso delle lenti magnetiche, è possibile trovare un chiaro paragone col microscopio ottico.

Qui è rappresentato anche l'equivalente di un condensatore. (Da: W. Glöde – Vom Lesestein zum Elektronen-mikroskop, Berlin, 1986, modif.)

In entrambi i casi schematizzati qui sopra il sistema opera ad "immagine globale" in quanto il fascio incide su tutto il campo oggetto. È il caso del TEM (vedi sotto).

Il fascio elettronico però può essere reso convergente con opportune lenti in uno "spot" sul piano oggetto. Sarà allora possibile esplorare tale piano per punti, in modalità raster: è lo schema del SEM. La deflessione del fascio si può ottenere con elettrodi piani posti ai lati del fascio, con differenza di potenziale alternata (come avviene di solito negli oscilloscopi), oppure con un campo magnetico alternato prodotto da opportuni avvolgimenti (come avviene nel "giogo" dei televisori a CRT).

Come sorgente, i microscopi elettronici utilizzano un "cannone" in cui un catodo riscaldato emette elettroni (per effetto termo-ionico o per emissione di campo) che vengono poi accelerati da elettrodi forati, ancora a somiglianza di un cinescopio classico.

#### La risoluzione

Come è noto, una particella carica come l'elettrone si può comportare anche come onda elettromagnetica; la sua lunghezza d'onda equivalente dipende dalla sua energia e, nell'uso pratico, può scendere a circa in ventesimo di nm. Ciò consente agli strumenti elettronici un potere risolutivo di qualche decimo di nm.

#### Il contrasto

Nei modelli a trasmissione (TEM) il contrasto è dovuto alla diversa opacità dell'oggetto al transito degli elettroni, che vengono diffusi in un ampio angolo, in proporzione allo spessore dell'oggetto ed alla sua densità.

In quelli a scansione (SEM) il contrasto è dovuto al potere assorbente e diffondente dell'oggetto e quindi all'intensità degli elettroni che ritornano dall'oggetto ad un opportuno rivelatore.

#### Le aberrazioni

Un fascio di elettroni non può essere totalmente "monocromatico", nel senso che l'energia di tutti gli elettroni non può essere esattamente la stessa. Ciò può provocare l'equivalente di un'aberrazione cromatica in campo ottico. Anche le traiettorie degli elettroni possono non essere monocentriche e soffrire di tutte le aberrazioni geometriche dell'ottica.

Inoltre, dopo aver traversato l'oggetto, alcuni elettroni perdono energia per urti con gli atomi dell'oggetto e quindi la loro lunghezza d'onda equivalente aumenta; questi vengono facilmente eliminati e non contribuiscono alla formazione dell'immagine.

Come nel microscopio ottico, anche in quello elettronico si fa spesso uso di diaframmi per limitare le aberrazioni e migliorare il contrasto. L'elevata risoluzione degli strumenti elettronici consente però di operare con fasci ad apertura molto piccola, il che consente di ottenere valori di profondità di fuoco assai maggiori di quelli degli strumenti ottici (vedi la fig. 18), fino a 1.000 volte di più.

Un brutto limite dell'ottica elettronica è dato dalla scarsa capacità di penetrazione degli elettroni, per cui, quando si osserva in trasparenza (TEM) il campione deve essere molto sottile (da circa 5 a 500 nm). Per ottenere da oggetti solidi le necessarie fette "ultrasottili" sono disponibili "ultramicrotomi" sofisticati e porta-oggetti speciali.

Un altro limite è che gli elettroni sono frenati dalle molecole dell'aria ed il loro percorso deve svolgersi nel vuoto. Tenere un oggetto nel vuoto esclude però gli oggetti viventi e spesso richiede un trattamento particolare degli oggetti stessi. Solo in rari casi (vedi ESEM ed ETEM nell'elenco degli acronimi, in fondo all'articolo) si può tenere l'oggetto non sotto vuoto spinto.

Ovviamente, non è possibile con l'analisi elettronica ottenere immagini a colori, almeno non a colori reali. C'è poi il problema dei costi ...

# L'ombreggiatura

Una tecnica interessante è stata introdotta fin dal 1944 da Williams e Wyckoff per i preparati da osservare al microscopio ottico, ma si presta benissimo anche per il microscopio elettronico.

Si tratta il campione, non coperto da alcun vetrino, con una nube di atomi di vapore metallico emessi da un crogiolo di tungsteno ad alta temperatura in ambiente di vuoto spinto (almeno  $10^{-4}$  mm di mercurio). La superficie dell'oggetto deve essere inclinata rispetto alla direzione d'arrivo dei vapori e l'angolo d'inclinazione deve essere tanto più piccolo quanto più il rilievo dell'oggetto è modesto, in modo che l'ombreggiatura sia sempre percepibile.

Il metallo evaporato deve possedere un elevato peso atomico: oro, cromo, palladio e simili.

# TEM (trasmission electron microscopy)

Lo strumento opera ad "immagine globale". Lo schema di base è quello delle figure 15 e 17. A parte il diverso tipo di radiazione utilizzata, non vi sono sostanziali differenze rispetto al microscopio ottico convenzionale: una sorgente, un condensatore, un obbiettivo, un proiettivo ( = oculare). Le lenti sono di tipo elettrostatico o magnetico, come illustrato nelle figure precedenti.

L'immagine finale può essere raccolta da uno schermo fluorescente ed osservata, magari tramite un microscopio ottico a piccolo ingrandimento e forte distanza di lavoro; l'osservazione va eseguita attraverso una finestra trasparente. L'immagine può essere raccolta anche da un'emulsione fotografica.

Opportuni rivelatori possono eseguire un'analisi spettroscopica degli elettroni trasmessi o diffusi dall'oggetto.

I primi esemplari risalgono ai primi decenni del 1900, ma idee e tentativi risalgono a molti anni prima, per opera di molti ricercatori in molti paesi. Si fa spesso il nome di E. Ruska, che ne ricavò un Nobel nel 1986 (rassegna storica esauriente in W. Glöde – Vom Lesestein zum Elektronen-mikroskop – Veb Verlag Technik, Berlin, 1986, pag. 165). Nel 1938 la casa tedesca Siemens aveva già offerto un modello commerciale. Un modello della casa Philips del 1947 prevedeva una tensione di accelerazione di 400 kV. Nel 1966 la Jeol proponeva un modello da 1.000 kV.

#### SEM (scanning electron microscopy)

I primi strumenti commerciali compaiono nel decennio 1960–70 per opera della casa inglese Cambridge Instruments.

Pur non essendo dotato di un potere di risoluzione elevato come quello del microscopio elettronico a trasmissione, il SEM ha il vantaggio di fornire immagini tridimensionali poiché risulta molto efficace la tecnica dell'ombreggiatura citata subito prima.

Questi strumenti operano con la tecnica "scanner" e l'immagine viene ricostruita su un qualunque schermo. Il fascio di elettroni, accelerato con un anodo a circa 10 kV e concentrato da opportune lenti sul piano oggetto, viene "spazzolato" – di solito con coppie di bobine magnetiche; ovviamente, i movimenti del fascio sull'oggetto e dello spot sullo schermo sono sincroni. La corrente nelle bobine deflettrici determina l'ampiezza dello spazzolamento, quindi del campo oggetto esplorato; è come dire che si può variare l'ingrandimento, visto che poi il campo oggetto

viene comunque visualizzato su uno schermo di dimensioni fisse. Di solito, il campo oggetto è di pochi micron, ma può variare in modo da realizzare un ingrandimento lineare da 5:1 a 500.000:1. La profondità di fuoco è dell'ordine di  $100~\mu$ , centinaia di volte maggiore che nel microscopio ottico.

La regolazione della tensione di accelerazione determina il diametro del fascio a livello dell'oggetto (pochi nanometri), quindi la risoluzione; è come dire che "si mette a fuoco" lo strumento.

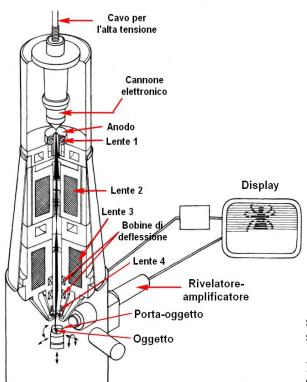
Al di là del piano oggetto non vi sono lenti poiché gli elettroni riflessi o diffusi dall'oggetto ("elettroni secondari") vengono raccolti integralmente da un opportuno rivelatore, formando l'immagine per punti successivi. I contrasti nell'immagine sullo schermo sono legati all'intensità degli elettroni secondari raccolti dal rivelatore, ma questa intensità dipende anche dall'angolo formato dal fascio con la superficie dell'oggetto, per cui si ottiene nell'immagine un contrasto legato al rilievo dell'oggetto, anche senza "ombreggiatura".

Se si usa un rivelatore sensibile alla radiazione ottica o ai raggi X, l'immagine può fornire dati sulla composizione chimica dell'oggetto poiché quest'ultimo non si limita spesso a diffondere gli elettroni primari (vedi XSEM) ma produce radiazioni elettromagnetiche varie.

Le lenti, in genere di tipo magnetico, servono solo a concentrare il fascio sull'oggetto; dopo di questo non vi sono lenti, evitando il problema delle aberrazioni, presente nel TEM.

Sia nel TEM che nel SEM le prestazioni si sono evolute nel tempo, dai primi decenni del 1900 ad oggi; per parlare solo della risoluzione, si è passati da decine di nanometri a 0,1-0,2 nm.

Fig. 18 (a destra) — Un campione di diatomite: una roccia sedimentaria marina, di struttura pulverulenta, composta principalmente da frustoli di diatomee. Foto al SEM di M.Badalotti — Tensione di accelerazione = 10 kV.



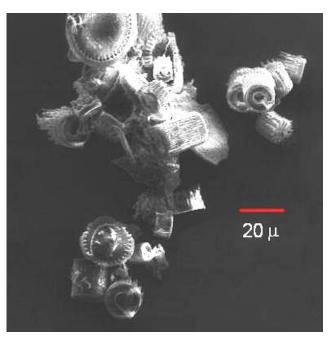


Fig. 19 (a sinistra) — Molte parti di questo schema sono ben chiare; si noti il porta-oggetti, suscettibile di traslazioni in tre direzioni e di rotazioni su altrettanti assi.

Il rivelatore si trova dalla stessa parte dell'oggetto. NB: le figg. Da 19 a 22 sono tratte, con modifiche, da: W. Glöde – Vom Lesestein zum Elektronen-mikroskop, Berlin, 1986.

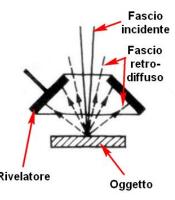
Finora si è supposto che lo strumento SEM operi "in episcopia", nel senso che la radiazione diffusa dall'oggetto viene raccolta dalla stessa parte da cui proviene la "illuminazione", come è schematizzato dalla figura seguente.

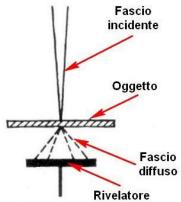
Fig. 20 — Si noti l'elettrodo che raccoglie gli elettroni secondari, di forma anulare. Se vogliamo, è lo schema inverso di un illuminatore episcopico a fondo scuro in un microscopio ottico: in quest'ultimo, il fascio illuminante giunge dalla periferia dell'obbiettivo, mentre la radiazione riflessa o diffusa dall'oggetto viene raccolta da un sistema ottico centrale. Qui l'illuminazione viene da un fascio centrale e l'immagine è formata da elettroni diffusi in una zona periferica.

Ma si può pensare di raccogliere gli elettroni secondari trasmessi dall'oggetto. In questo caso, il rivelatore sta, rispetto Rivelatore l'oggetto, dalla parte opposta della sorgente.

Se il rivelatore raccoglie anche l'eventuale fascio diretto, si può parlare di "diascopia in fondo chiaro" (figura seguente).

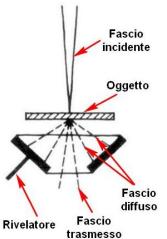
Fig. 21 - SEM con raccolta degli elettroni trasmessi. In questo caso, a differenza degli altri, il rivelatore non è di forma anulare.





Se invece il rivelatore raccoglie solo gli elettroni fortemente deviati dall'oggetto (figura seguente), si può fare un paragone con la diascopia in fondo scuro, con la solita inversione dei fasci illuminante e formatore d'immagine.

Fig. 22 - Rivelatore anulare che raccoglie solo gli elettroni fortemente deviati dall'oggetto.



A questo punto, con l'aria di niente, abbiamo illustrato il principio dell'ultima variante del microscopio elettronico: lo STEM.

STEM (scanning trasmission electron microscopy)

Si tratta dunque di uno strumento basato sullo schema del SEM, ma con un rivelatore che non raccoglie gli elettroni retrodiffusi dall'oggetto, bensì quelli che lo hanno traversato. Il funzionamento è ancora a raster.

Dopo il piano oggetto non vi sono lenti, quindi si evitano le aberrazioni delle lenti obbiettive e proiettive presenti nel TEM. L'immagine è formata dagli elettroni trasmessi e diffusi dall'oggetto e raccolti da un rivelatore anulare.

La sorgente è un cannone ad emissione di campo. La deflessione è ancora operata da campi magnetici.

La risoluzione ottenibile è più elevata di quella del TEM, e può elevarsi a 0.1 - 0.2 nm, che è dell'ordine del "raggio di Bohr", il raggio del più piccolo atomo, quello dell'idrogeno.

Questa soluzione risale, come principio, al 1938 (von Ardenne) ma entra in commercio solo dopo il 1969; oggi gode di alcuni perfezionamenti recenti e si è ampiamente diffusa.

#### Microscopio protonico

È stato tentato anche l'uso di un fascio di protoni invece che d'elettroni. L'idea di base è che la massa del protone è assai maggiore di quella dell'elettrone e quindi la lunghezza d'onda associata è proporzionalmente minore: aumento di risoluzione.

Le lenti elettrostatiche dovranno naturalmente funzionare con tensioni di segno opposto.

Il potere distruttivo dei protoni sull'oggetto è però così forte da impedire l'uso diffuso di questa soluzione. Anche il loro potere di penetrazione è così piccolo che nessun oggetto è sufficientemente trasparente: le immagini appaiono in bianco nero, senza chiaro-scuri.

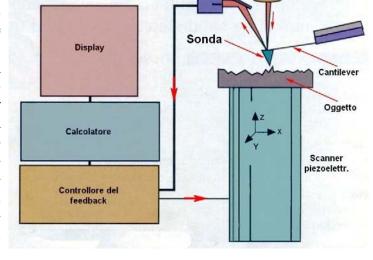
#### TECNICHE NON OTTICHE e NON ELETTRONICHE

### SPM (scanning probe microscopy)

Un gruppo di tecniche parte da un principio comune che non sfrutta radiazione elettromagnetica – ottica, UV, IR, X e simili – né corpuscolare: una sonda solida appuntita ("probe" o "stilo") di varia natura esplora la superficie del campione, a brevissima distanza od a contatto, mentre il campione si sposta rispetto ad essa secondo un raster, come abbiamo visto nel caso del "near field". L'immagine può essere così ottenuta "by touch".

Durante la scansione, viene rilevato un segnale che consente di ricostruire la topografia della superficie esplorata o altre sue caratteristiche. Il segnale può nascere dall'effetto "tunnel" (vedi la nota 9 a pag. 25) fra sonda ed oggetto, dallo sfregamento ("shear") della sonda sull'oggetto, dall'inclinazione della sonda rispetto all'oggetto, dalla forza necessaria per mantenere costante la distanza sonda–oggetto, e simili.

In genere la sonda (il "tip" ha un raggio di curvatura di meno di 1 nm) è fissata all'estremità di una sottile laminetta flessibile, detta "cantilever" (= "trave a sbalzo"), di dimensioni 20 × 100/200 μ; gli spostamenti della sonda sono rilevati proiettando sulla superficie lucida del cantilever un fascio laser concentrato; un apposito rivelatore a due settori contigui rileva gli spostamenti del fascio riflesso poiché risponde alla differenza dei segnali provenienti dai due settori: tale differenza si annulla solo quando il fascio è perfettamente centrato sulla linea che divide i due settori. Si vedano le figure a lato.

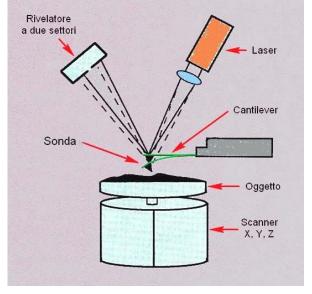


Rivelatore

Laser

Fig. 23 a/b – Il principio generale del SPM.

Questo meccanismo di rilevamento dei movimenti del cantilever non è privo di effetti collaterali: il fascio del laser raggiunge in parte anche la superficie del campione, viene da questo riflesso ed allora interferisce col fascio riflesso dal cantilever, formando anche delle vere frange d'interferenza. Tale effetto si minimizza studiando bene la geometria del sistema, ma non sempre è del tutto neutralizzato.



La cosa si complica quando il movimento relativo sonda-oggetto in direzione X o Y non è parallelo alla direzione del cantilever: in "modalità contatto" quest'ultimo può andare soggetto a torsione in direzione trasversale a causa dell'attrito e spostare lateralmente il fascio riflesso. Quest'effetto può essere rivelato e neutralizzato se il sensore è formato da quattro settori contigui invece che da due ("fotocellula a quattro quadranti").

Un'altra causa di errore viene dalla forma piramidale o conica del tip: se l'oggetto presenta un ripido scalino, come una punta sottile od un piccolo infossamento, il tip sfiora queste ripide pendenze con i fianchi della piramide e la forma rilevata alla fine dipende più dalla forma del tip che da quella dell'oggetto.

Lo spostamento della sonda o dell'oggetto, in tre direzioni, è generalmente ottenuto sfruttando le ceramiche piezoelettriche ed è controllato da sensori capacitivi od ottici tramite un circuito di feedback. L'ampiezza dei movimenti va da 0,1 mm a pochi micron; la "frequenza di riga" dello scanner va da meno di 1 Hz a 100 Hz.

L'oggetto viene quindi esplorato punto per punto ed un apposito software deve ricostruire l'intera immagine. Gli ingrandimenti ottenibili sono dell'ordine di 10<sup>6</sup>; la risoluzione in altezza (asse Z) può arrivare a 0,1 **nm**.

Poiché la risoluzione ottenibile nel piano dell'oggetto, legata alla finezza del tip, è dell'ordine di 0,1 nm, altrettanto si pretende dal "movimentatore" (o "attuatore") piezoelettrico. A questi livelli, anche la deriva termica dei vari componenti diviene importante, e può richiedere una stabilizzazione della temperatura dell'ordine di un'ora.

Durante la scansione, la distanza sonda—campione può essere mantenuta costante per mezzo del sistema di feedback (scansione "a distanza costante" o "quota costante"), ed in questo caso si rileva qualche grandezza elettrica (la corrente che attraversa la sonda, ad es.) o la forza necessaria per mantenere quella distanza costante; oppure si tiene ferma la sonda (scansione "ad altezza costante"). Si vedano gli schizzi nella figura seguente.

Se la sonda è a contatto col campione, si possono rilevare i suoi movimenti, quindi la topografia e la rugosità della superficie dell'oggetto, le sue deviazioni, quindi gli attriti ("shear force"), ecc.

La sensibilità dello strumento può consentire di misurare le forze di adesione fra molecole organiche e si arriva così all'identificazione chimica ("chemical force microscopy").

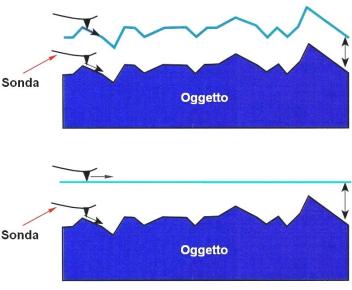
In altri casi, si misura la rugosità di una superficie con risoluzioni non ottenibili con altri metodi; ciò può essere importate nel valutare l'affidabilità di una protesi articolare, ad es.

Questi strumenti possono operare in aria libera, ma rapidamente si presenta un limite: lo spazio fra tip ed oggetto può essere riempito da condensa di vapor d'acqua, azoto, ecc. e la punta si trova immersa in un minuscolo menisco che ne altera la posizione in virtù della tensione superficiale del vapore.

Un rimedio (LFM) consiste nell'imprimere alla sonda una rapida oscillazione ad alta frequenza – un **contatto intermittente** (tapping mode); la grandezza che si misura è allora la variazione nell'ampiezza e nella fase dell'oscillazione.

Fig. 24 — Principio del SPM con scansione a quota costante (sopra), a contatto (sonda inferiore) o ad altezza costante (sotto).

Spesso, in un SPM viene incorporato un microscopio ottico convenzionale al **Sonda** fine di facilitare il posizionamento del campione e della sonda: diventa visibile



il punto di contatto delle due parti.

Gli inizi della tecnica SPM risalgono al 1981 ed a G. Binnig e H. Röhrer, ricercatori dell'IBM (premi Nobel per la fisica nel 1986).

STM = scanning tunneling microscopy

È una delle prime forme di SPM; in essa si sfrutta l'effetto tunnel<sup>9</sup>; ha conquistato molti campi d'applicazione e può arrivare ad una risoluzione a scala atomica; ovviamente, dello stesso ordine dovrà essere la dimensione della punta della sonda.

I primi tentativi di realizzare questa tecnica risalgono al 1972; i primi modelli commerciali sono comparsi intorno al 1989.

Poiché la corrente di tunnel dipende fortemente dalla distanza sonda—oggetto (valori possibili: 1-10 nm)<sup>10</sup>, è poi possibile risolvere variazioni in altezza (asse Z) dell'ordine di un decimillesimo di nm. Lo scorrimento della corrente di tunnel viene promosso applicando un'opportuna differenza di potenziale (intorno a 10 mV) fra sonda ed oggetto e dipende dalla differenza di "funzione lavoro" fra le due parti a contatto; tale funzione esprime l'energia di estrazione che occorre fornire ad un elettrone affinché possa allontanarsi dall'atomo in cui risiede e, per molti metalli, equivale a circa 4 elettron-volt.

La sonda è in genere realizzata in tungsteno o in lega di platino-iridio. Anche l'oggetto deve essere almeno parzialmente conduttore per consentire lo scorrimento della corrente di tunnel. Se l'oggetto è molto sottile, può essere sufficiente che sia conduttore il suo supporto; in altri casi, l'oggetto viene rivestito da un film sottile conduttore.

Data l'elevata risoluzione del sistema, occorre un meccanismo che permetta di muovere la sonda rispetto all'oggetto in tre direzioni con estrema precisione e stabilità; in genere si ricorre a sistemi piezoelettrici. Spesso occorre tenere l'oggetto in una camera ad atmosfera controllata per impedirne la contaminazione.

Un STM può lavorare "a distanza costante" (vedi sopra) oppure "a corrente costante": il circuito di feedback fa variare la quota della sonda in modo che la corrente di tunnel rimanga costante. In questo modo si registra l'intensità del comando che viene inviato allo scanner per ottenere quel risultato. È possibile lavorare anche ad altezza costante, ma in questo caso si corre il rischio di urti fra il tip e l'oggetto, se questo presenta qualche irregolarità nella superficie superiore alla distanza tip-oggetto.

La grandezza che si misura è la corrente di tunnel, e richiede un nanoamperometro. Tale grandezza non viene in genere acquisita come grandezza analogica, in continuo, ma per punti successivi, spesso 256 punti per riga, con una frequenza di campionamento dell'ordine di qualche kHz. Il tempo d'acquisizione di un'immagine singola si colloca così intorno a 10-30 s. Non conviene in genere utilizzare frequenze di campionamento più elevate per non interferire con la frequenza di risonanza dell'attuatore piezoelettrico, che si colloca appunto intorno ad una decina di kHz.

Quell'attuatore viene in genere applicato alla sonda, non al porta-oggetto; in questo modo la sua massa può essere assai piccola e la sua frequenza di risonanza molto elevata.

AFM = atomic force microscopy = SFM = scanning force microscopy

Introdotta nel 1985, questa tecnica sfrutta le interazioni dinamiche fra sonda ed oggetto e lavora col principio del contatto fra le due parti. Si può quindi operare su oggetti conduttori o isolanti, anche su oggetti viventi. In quest'ultimo caso si può presentare il problema della fragilità

25

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> L'effetto tunnel elettronico è un fenomeno di natura quantistica che si verifica quando due corpi sono tanto vicini (a circa 1 nm di distanza) che gli orbitali elettronici degli atomi eterogenei più prossimi si sovrappongono sensibilmente. In queste condizioni, le nubi elettroniche dei due corpi accostati sono in grado di scambiarsi elettroni i quali, se pilotati da un'opportuna tensione, possono creare una corrente elettrica.

L'effetto tunnel consiste nel superamento occasionale di una barriera energetica da parte di una particella, dotata di una quantità di energia ritenuta insufficiente dal punto di vista della fisica classica. Fu scoperto nel 1960.

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> La corrente di tunnel varia di un fattore 10 quando la distanza tip-oggetto varia di meno di 0,1 **nm**.

dell'oggetto, che viene deformato dalla sonda; si può irrigidire l'oggetto rivestendolo di una sottile patina metallica, per evaporazione sotto vuoto, ma questa può nascondere le strutture più minute.

La grandezza che si misura è la deflessione del cantilever, generalmente rilevata dallo spostamento del fascio riflesso da essa (vedi la fig. 23); la causa della deflessione può essere termica (temperatura, conducibilità), elettrica o magnetica (attrazione o repulsione), meccanica, anche del gruppo delle forze di van der Waals<sup>11</sup>; genericamente forze chimico-fisiche.

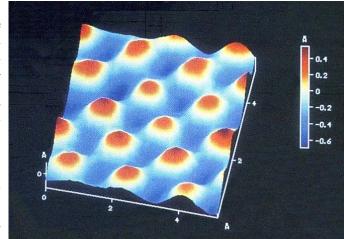
Si può misurare in ambiente aereo, in ambiente liquido o nel vuoto (al fine di ridurre le sorgenti d'inquinamento che contribuiscono poi alle forze di adesione). Si sono ottenute immagini, un po' confuse a dire il vero, anche di singoli filamenti di DNA.

Il lavoro sottovuoto è generalmente raccomandato poiché un minimo velo d'umidità sul campione può alterare fortemente l'interazione fra sonda ed oggetto, come citato alla pagina precedente. Anche l'ossigeno dell'aria può creare strati di ossido irregolari che alterano le caratteristiche dell'immagine finale.

Fig, 25 — Una delle prime immagini ottenute dal AFM (1981): in uno strato di grafite si vede il contorno degli atomi di carbonio; non i loro confini materiali, ma l'andamento della nube elettronica probabilistica che circonda i nuclei atomici.

L'area rappresentata occupa  $0.5 \times 0.5$  **nm**; la differenza fra i picchi (rossi) e gli avvallamenti (blu) della nube vale circa 0.1 **nm**.

La risoluzione ottenibile è di uno o pochi **nm** nel piano X - Y, anche meno di 0,1 **nm** in altezza, lungo l'asse Z. La minima forza misurabile è di  $10^{-9}$  Newton.



Specialmente nel caso dell'AFM, l'esplorazione a raster del campione viene effettuata non con un'andata "lenta" in una direzione ed un ritorno veloce in direzione opposta, come nei sistemi televisivi analogici; andata e ritorno vengono effettuati alla stessa velocità, a zig-zag.

Nell'elaborazione successiva, si costruiscono poi due immagini separate, una con le righe in andata ed una con le righe di ritorno. In questo modo si possono rivelare dissimmetrie dovute all'attrito che deforma la sonda in modo diverso a seconda del senso del movimento.

La modalità operativa più comune dell'AFM, si è detto, è "a contatto", ma si può operare anche in "non contatto" o "a contatto intermittente" (vedi sopra, pag. 24). Nel caso del noncontatto, si può operare "a quota costante" o "a grandezza misurata costante". Nel primo caso, la "grandezza misurata costante" è la deflessione del cantilever.

La modalità "non contatto" è poco usata poiché le forze dì interazione tip-oggetto diventano in quel caso assai più piccole e si richiede una maggiore sensibilità al meccanismo di rilevazione. D'altra parte, il contatto sonda-campione può alterare la superficie di quest'ultimo o logorare il tip, tutti effetti di cui bisogna tener conto, sia nell'impostare la forza di contatto, sia nell'interpretare l'immagine finale. Anche le condizioni ambientali (temperatura, umidità, ecc.) possono influire sui risultati.

Accanto alle classiche tecniche SPM (STM ed AFM), si sono sviluppate negli ultimi anni diverse varianti che consentono di acquisire sempre nuove informazioni sulla natura chimico-fisica del campione, in particolare sulla struttura elettronica locale della sua superficie. Si può parlare, genericamente, di "spettroscopia" SPM.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> Forze attrattive o repulsive fra molecole, di natura elettrica, più deboli di quelle di natura chimica. Si esercitano a distanze molto piccole, dell'ordine di pochi nanometri, e possono risultare prevalenti finché non entrano in gioco le forze di adesione.

#### Citiamo solo la:

MFM = magnetic force microscopy: una delle innumerevoli varianti del SPM prevede una sonda rivestita di materiale ferromagnetico, capace quindi di interagire con i campi magnetici presenti presso la superficie del campione; questo deve dunque essere costituito da materiali magnetici ed il campo d'applicazione preferito è quello dei materiali a memoria magnetica ("hard disc" e simili).

L'esame può essere condotto in aria o in liquido, in condizioni d'ambiente normale.

La risoluzione ottenibile è dell'ordine di 10 nm. La grandezza che si misura è quella di ogni altro SPM: l'interazione fra tip e campione.

Per aumentare la sensibilità dello strumento, è frequente usare l'accorgimento, già citato, di forzare la sonda (tramite un elemento piezoelettrico) ad oscillare a frequenza supersonica (10 – 100 kHz) nelle vicinanze della sua frequenza di risonanza. Quello che si registra allora è qualunque variazione nell'ampiezza, nella frequenza o nella fase dell'oscillazione, provocata dal campo magnetico del campione.

Lo strumento può operare anche come AFM e rilevare la topografia<sup>12</sup> (il rilievo) o l'attrito col campione; anzi, in molti casi, per evitare che il rilievo influisca sull'interazione dei campi magnetici, si esegue una prima "spazzolata" per la misura del rilievo e poi, quando si misura l'interazione magnetica, si sottrae da quest'ultima la prima misura al fine di calcolare il solo effetto magnetico.

Non vogliamo estendere oltre la trattazione, già troppo soporifera, con un elenco delle varianti SPM; nella parte terminale dell'articolo ("Acronimi"), verranno solo elencati diversi acronimi relativi con un breve commento.

Dobbiamo però segnalare il fatto che la tecnica SPM, utilizzando sonde speciali a contatto, può essere utile per modificare meccanicamente l'oggetto. Abbiamo in altre parole una possibilità di incisioni a livello nanoscopico ("nanoindenter", nanolitografia).

Queste sonde speciali possono sfruttare le eccellenti proprietà meccaniche delle molecole di fullerene ( $C_{60}$ ) o dei nanotubuli di carbonio.

Durante la misura del rilievo, il tip oscillante sfiora il campione. Durante la misura dell'interazione magnetica, il tip è tenuto a distanza costante dal campione e non lo tocca mai.

### **ACRONIMI**

# legati alla microscopia non convenzionale

4 Pi SOM: vedi qui sotto.

4 Pi confocal microscopy = una variante del sistema confocale in cui il fascio laser è suddiviso in due fasci che incidono sull'oggetto tramite due identici obbiettivi disposti simmetricamente rispetto al piano oggetto; si riduce la dimensione assiale della centrica nel punto di fuoco e si migliora la risoluzione – il nome viene dal fatto che la centrica occupa quasi tutto l'angolo solido a  $4\pi$ .

4 Pi = STORM = stochastic optical reconstruction microscopy (photoactivation localization superresolution microscopy) = sistema confocale basato su fluocromi altamente selettivi.

AEM = analytical electron microscopy = TEM contenente un rivelatore degli elettroni che hanno perso una parte della loro energia – consente analisi chimiche ad alta risoluzione.

AFAM = atomic force acoustic microscopy = AFM (vedi) che sottopone l'oggetto ad ultrasuoni per misurarne la durezza in scala nanometrica. La sonda è a contatto con l'oggetto.

AFM = atomic force microscopy (vedi testo, pag. 25).

APFIM = atom probe field-ion microscopy = uno strumento FIM (vedi sotto) capace, attraverso la spettrometria del tempo di volo degli ioni, d'identificare la specie chimica degli atomi dell'oggetto.

APM = atom probe microscopy = APFIM.

ATR = attenuated total reflectance infrared microscopy = una variante del TIRF (vedi sotto) che opera nella gamma IR e misura l'assorbimento IR dell'oggetto.

BAM = Brewster angle microscopy = microscopia in riflessione (in episcopia) sotto l'angolo di Brewster per rivelare lo stato di polarizzazione della radiazione riflessa da uno strato sottile (per es. strati anti-riflettenti).

BEEM = ballistic electron emission microscopy = una variante del STM (vedi sotto) che misura il cammino medio degli elettroni che transitano dalla sonda all'oggetto.

CAFM = conductive atomic force microscopy = AFM in cui il "tip" è portato ad una certa tensione continua e si misura la corrente che scorre in un oggetto conduttore.

CCM = charge collection microscopy = electron beam induced contrast = variante del SEM in cui si misura la corrente indotta nell'oggetto dal fascio elettronico incidente.

CFM = chemical force microscopy = variante del SPM in cui il tip è addizionato con un ligante in grado di interagire chimicamente con l'oggetto; si misura la forza del legame fra tip ed oggetto.

CITS = current imaging tunneling spectroscopy = variante del STM in cui si misura il rapporto corrente-tensione nella sonda e quindi la conducibilità elettrica del campione.

CLSM = CSLM = confocal laser scanning microscopy = termine generico per il sistema confocale a laser.

COM = conventional optical microscopy.

CPM = coherence probe microscopy = microscopia interferenziale in episcopia in luce bianca, dedicata alla misura del rilievo della superficie dell'oggetto.

cryoEM = cryoelectron microscopy = SEM o TEM con raffreddamento dell'oggetto alla temperatura dell'azoto o dell'elio liquidi; consente di osservare oggetti biologici ancora idratati.

cryoSEM e cryoTEM = vedi qui sopra.

CSLM = CLSM = confocal scanning laser microscopy = termine generico per il confocale a laser

CSOM = confocal scanning optical microscopy = vedi CSM.

CSM = confocal scanning microscopy = sistema confocale a raster (vedi testo, pag. 5).

DFM = dynamic force microscopy = AFM in cui il tip è oscillante; si misurano le interazioni dinamiche fra tip ed oggetto.

DSTEM = dedicated scanning trasmission electron microscopy = STEM a raster, dedicato all'osservazione di oggetti particolari.

DPC = differential phase contrast = un sistema confocale con rivelatore a 4 quadranti capace di trasformare le variazioni nell'altezza o nell'inclinazione della superficie dell'oggetto in differenze di luminosità (vedi testo, pag. 12).

EFM = electrostatic force microscopy /electric force microscopy = una variante di SPM in cui la sonda non tocca l'oggetto, ma rivela la distribuzione di cariche statiche in esso sulla base di variazioni della propria frequenza di risonanza o della deflessione del tip – tipica applicazione ai circuiti integrati.

EFOM = evanescent field optical microscopy = PSTM (vedi sotto) = STOM.

EFTEM = energy filter trasmission electron microscopy = una variante del TEM in cui l'immagine è costruita selezionando gli elettroni trasmessi in base al loro spettro di energia.

EM = electron microscopy = termine generico per SEM e TEM.

EPMA = electron probe microanalyser = variante di TEM in cui vengono rilevati i raggi X generati dall'oggetto sotto l'irraggiamento elettronico. La spettroscopia X consente analisi chimiche sull'oggetto. I primi strumenti commerciali risalgono al 1956. Vedi anche XSEM.

ESEM = environmental SEM = una variante di SEM capace di osservare oggetti in ambiente liquido a pressione normale, ma a temperatura di 0° C.

ESMA = Elektronen strahl–Mikroanalysatoren = vedi XSEM = X ray SEM.

ETEM = environmental trasmission electron microscopy = variante di TEM in cui l'oggetto è racchiuso in una camera a pressione diversa da quella dell'interno dello strumento.

FEG-SEM = field emission gun scanning electron microscopy = SEM operante con una sonda FEM – vedi sotto.

FEG-TEM = field emission gun trasmission electron microscopy = TEM operante con una sonda FEM – vedi sotto.

FEM = field emission microscopy = field electron microscopy = formazione di immagini in base all'emissione di elettroni da un elettrodo appuntito, sottoposto ad un forte campo elettrico capace di vincere l'energia di estrazione degli elettroni; poiché gli elettroni emergono radialmente dalla punta metallica, riportano l'immagine degli atomi superficiali di essa. Il campione è costituito dalla punta della sonda, di forma semisferica. Poiché il campo elettrico in prossimità della punta è molto forte, il campione può essere solo quello capace di non essere degradato da quel campo.

FFM = friction force microscopy = lateral force microscopy = variante di AFM in cui la sonda tocca l'oggetto e viene misurata la sua deviazione laterale, legata alla forma o alla composizione dell'oggetto. Vedi LFM.

FIB-SEM = focused ion beam scanning electron microscopy = un fascio di ioni, prodotti da una sorgente metallica liquida, viene focalizzato sull'oggetto in uno spot fino a pochi **nm**; il SEM raccoglie gli ioni e gli elettroni secondari e ne forma un'immagine.

FIB-TEM = focused ion beam trasmission electron microscopy = come sopra, ma all'interno di un TEM.

FIM = field ion microscopy = come nel FEM (vedi sopra), ma con elettrodo raffreddato e sottoposto ad un campo di almeno 20 kV: se lo strumento contiene gas inerte a bassa pressione, le molecole del gas si ionizzano a contatto coll'elettrodo e sono spinte lontano contro un rivelatore; l'immagine riporta la struttura degli atomi superficiali dell'elettrodo.

FLIM = fluorescence lifetime imaging microscopy = microscopia in fluorescenza in cui l'irraggiamento è modulato con una frequenza sinusoidale e la radiazione fluorescente viene misurata in base allo sfasamento subito ("frequency domain FLIM"); in un'altra versione, l'irraggiamento è pulsato (laser ad impulsi) e viene misurato il ritardo nell'emissione fluorescente ("time domain FLIM").

FMM = force modulation microscopy = AFM in cui la sonda è a contatto con l'oggetto ma sottoposta ad una forza oscillante; si misura la variazione nell'ampiezza dell'oscillazione della sonda come effetto della variabile rigidità od elasticità dell'oggetto.

Four pi SOM = vedi "4 Pi SOM".

(F)PALM = variante di PALM (q.v.).

FSOM = far field scanning optical microscopy = microscopia convenzionale in cui l'obbiettivo concentra sul piano oggetto uno spot più piccolo possibile (almeno metà della lunghezza d'onda); l'immagine è ottenuta esplorando l'oggetto con un movimento di esso a raster e raccogliendo con una fotocellula la luce trasmessa o riflessa dall'oggetto. È stata questa una delle prime applicazioni del sistema a raster, applicato all'oggetto, ma con ottica convenzionale.

FTIRM = Fourier transform infrared microscopy = microscopia ad infrarosso in diascopia od episcopia con analisi spettrometrica della radiazione trasmessa o riflessa all'oggetto; l'esame può avvenire ad immagine totale o per raster.

GSD = ground state depletion microscopy = variante di STED (q.v.) in cui si restringe la zona di attivazione del fluocromo portandolo in uno stato metastabile "oscuro".

GSDIM = ground state depletion followed by individual molecole return = un misto di GSD, PALM, STORM e simili.

HAADFEM = high angle annular darkfield electron microscopy = TEM in cui l'immagine è creata dagli elettroni diffusi quasi-elasticamente con un angolo superiore a 3°; in quell'immagine si rivelano proprietà degli atomi dell'oggetto, come il numero atomico.

HREM = high resolution electron microscopy = TEM portato ai massimi limiti della sua risoluzione.

I2M = image interference microscopy = microscopia interferenziale a fluorescenza in cui l'oggetto è illuminato da facce opposte da due obbiettivi identici che producono immagini simili; l'interferenza fra queste due immagini consente una risoluzione assiale pari ad una frazione di lunghezza d'onda.

I3M/I5M = incoherent interference illumination microscopy = c.s. – una serie di immagini a diversa altezza consente di ottenere un'immagine in 3 D con risoluzione assiale anche migliore di 100 nm.

IRM = interference reflection microscopy = microscopia interferenziale in episcopia dedicata all'osservazione di piccoli oggetti in mezzo acquoso aderenti al copri oggetto: alle due superfici vetro-mezzo e mezzo-cellula si formano due onde riflesse che possono interferire formando un'immagine in contrasto interferenziale a tinta unita; se le due superfici si toccano, l'oggetto appare nero; quando la separazione è dell'ordine di 100–150 **nm**, si ha il massimo di luminosità.

IVEM = intermediate voltage electron microscopy = TEM dotato di una tensione di accelerazione di 300-400 kV, utile con oggetti di notevole spessore per la sua capacità di penetrazione.

LEED = low energy electron diffraction: vedi LEEM.

LEEM = low energy electron microscopy = variante del SEM, ma con tensioni di accelerazione di circa 10 kV; l'immagine finale è formata da elettroni riflessi di bassa energia, elettroni diffusi "elasticamene", che non perdono la propria energia cinetica. Il basso potere di penetrazione degli elettroni primari rende questa tecnica adatta allo studio della superficie dell'oggetto.

LEEPS = low energy electron point source microscopy = una forma di PPM (vedi sotto) con una sorgente di elettroni a bassa energia (minore di 200 kV).

LFM = laser feedback microscopy = variante sullo schema del sistema confocale: a mezzo di interferenza del laser con il fascio riflesso si ottiene una risoluzione in Z di circa 1 nm. Vedi a pag. 12.

LFM = laser force microscopy = variante di AFM (vedi testo a pag. 25) in modalità "non contatto"; si misurano le forze di Van der Waals; la sonda è vibrante (circa 50 kHz) e non tocca il campione; la grandezza misurata è la distanza sonda – oggetto che modifica la frequenza di risonanza della sonda e quindi l'ampiezza delle sue vibrazioni. La risoluzione ottenibile è di qualche **nm**. Vedi pag. 24.

LFM = lateral force microscopy = variante di SPM-AFM in cui la sonda è a contatto con l'oggetto. Si misurano le forze di attrito fra i due, oltre alla topografia della superficie esplorata – vedi SFFM e pag. 24, primo paragrafo.

LM = light microscopy = microscopia ottica convenzionale.

LRM = Licht Raster Mikroskops (in tedesco) = vedi testo a pag. 3.

LSCM = laser scanning confocal microscopy = sistema confocale.

LSM = laser scan microscopy = termine generico, simile a LRM, che indica genericamente la formazione dell'immagine microscopica per scansione del piano oggetto con un fascio laser che lo esplora secondo un raster di linee parallele.

LVEM = low voltage electron microscopy = SEM o TEM con bassa tensione di accelerazione, minore di 5 kV. Se l'immagine prodotta è visibile su uno schermo luminescente, la si può ulteriormente ingrandire tramite un microscopio ottico normale. Nel caso del SEM, la bassa accelerazione consente di operare su oggetti delicati e non metallizzati.

MFM = magnetic force microscopy = una forma di SPM (vedi sotto) che rivela i nano-campi magnetici emanati dalla superficie del campione; la sonda viene rivestita da uno strato ferromagnetico che interagisce col campione (vedi testo a pag. 27).

MOM = magneto-optical microscopy = microscopia convenzionale in radiazione polarizzata per studiare a livello microscopico l'effetto magneto-ottico di Kerr<sup>13</sup>.

MRFM = magnetic resonance force microscopy = variante di SPM ultrasensibile in cui si rivela il comportamento di spin degli elettroni e quindi la struttura molecolare del campione.

MRM = magnetic resonance microscopy = un'applicazione della "risonanza magnetica" (MRI = magnetic resonance imaging) in campo microscopico. Prevede l'uso di magneti superconduttori e può produrre immagini tridimensionali, come la MRI.

NSOM = SNOM = near-field scanning optical microscope = una forma di microscopia a "near field" (vedi a pag. 14) con scansione dell'oggetto. Può essere associata ad un esame AFM (vedi a pag. 25).

OAM = one Ångström microscopy = TEM con risoluzione migliore di 1 Å = 0.1 nm.

OBIC = optical beam induced current = SOM in cui si misura la fotocorrente emessa dall'oggetto irradiato. Vedi a pag. 4.

OIM = orientation imaging microscopy = esame di materiali policristallini in base alla microscopia in radiazione polarizzata od alla microscopia elettronica per raccolta degli elettroni retrodiffusi.

OSM = optical scanning microscopy = indicazione generica per ogni tipo di esame microscopico di un oggetto per scansione a raster.

PAINT = point accumulation for imaging in nanoscale topography = tecnica di fluorescenza in salsa PALM, STORM e simili.

PAL-M = photoactivated localization superresolution microscopy = sistema confocale basato su fluorromi altamente selettivi, che consente di attivare la fluorescenza su singole molecole.

PEEM = photoemission electron microscopy = tecnica elettronica che forma l'immagine di un oggetto sulla base degli elettroni emessi dal medesimo dopo eccitazione da parte di radiazione ottica o UV.

PEM = photoelectron microscopy = X ray photoemission microscopy = c.s., ma per irraggiamento a raggi X.

PFM = photonic force microscopy = una variante di SPM in cui la sonda è costituita da una particella otticamente intrappolata.

PFM = piezoforce microscopy = vedi subito sotto.

PFM = piezoresponse force microscopy = una variante di SPM in cui la sonda porta una forte tensione elettrica che analizza la risposta di materiali ferroelettrici e piezoelettrici.

PLSM = photoactivation localization superresolution microscopy = variante di sistema confocale in fluorescenza basato sull'eccitazione altamente localizzata dell'oggetto.

PPM = point projection microscopy = sistema di formazione di immagini ingrandite di oggetti, senza l'uso di lenti: una sorgente puntiforme di elettroni o raggi X produce un'ombra di un oggetto su uno schermo distante; le dimensioni dell'ombra, e quindi l'ingrandimento, dipendono dal rapporto fra distanza dello schermo e distanza dell'oggetto dalla sorgente.

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> L'effetto Kerr (John Kerr, fisico scozzese) rende birifrangente un liquido sottoposto ad un campo magnetico.

PSTM = photon scanning tunneling microscopy = Photon STM = sinonimo di STOM o E-FOM = tecnica "near field" (SNOM o NSOM) applicata ad uno strumento SPM, che sfrutta l'effetto tunnel ottico (vedi a pag. 15). In sostanza, la sonda è costituita dall'estremità affusolata di una fibra ottica che viene immersa nell'onda evanescente che si propaga oltre la superficie del campione (trasparente) illuminato da sotto in condizioni di riflessione interna totale. La distanza sonda-campione si tiene intorno a 200–250 **nm**. La risoluzione nel piano oggetto è dell'ordine di un decimo di  $\lambda$ ; in asse Z può arrivare ad 1 **nm**. La tecnica si può applicare a campioni isolanti e viventi.

PTM = photon tunneling microscopy = vedi pag. 15.

RCM = reflection contrast microscopy = microscopia convenzionale in episcopia e radiazione polarizzata mirata all'aumento del contrasto in oggetti poco riflettenti.

REM = Raster–Elektronenmikroskop = SEM.

REM = reflection electron microscopy = SEM dedicato alla rivelazione degli elettroni riflessi

RESOLFT = photoactivation localization superresolution microscopy = sistema confocale basato su fluocromi altamente selettivi, un misto di STED e GSD (q.v.).

RSOM = real time SOM = variante di sistema confocale con singolo disco rotante.

RTCM = real time confocal light microscopy = sistema confocale con laser ed uscita video.

SAM = scanning acoustic microscopy = vedi a pag. 4.

SAM = scanning Auger microscopy = SEM capace di raccogliere gli elettroni Auger<sup>14</sup> emessi dall'oggetto e di farne un'analisi spettroscopica.

SCM = scanning confocal microscopy = sistema confocale a raster.

SCM = scanning capacitance microscopy = variante del SPM in cui viene misurata la capacità fra sonda ed oggetto. L'oggetto è conduttore o semiconduttore. La sonda è conduttrice e lavora "a quota costante", non in contatto con l'oggetto. Una tensione DC viene applicata fra sonda ed oggetto. La risoluzione è dell'ordine di 10 **nm**. La tecnica è utilizzata nello studio dei semiconduttori a strati sottili poiché può dare misure sul drogaggio di essi.

SECM = scanning electrochemical microscopy = variante di SPM in cui la sonda tocca l'oggetto tramite una soluzione elettrolitica e viene misurata la corrente che attraversa la sonda.

SECPM = scanning electrochemical potential microscopy = altra variante di SPM simile alla precedente, in cui la grandezza misurata è il potenziale esistente fra sonda ed oggetto. Applicazione comune è lo studio di strati sottili e corrosioni su oggetti conduttori.

**SEM = scanning electron microscopy** = vedi testo a pag. 20.

SEPM = scanning electrical potential microscopy = variante di EFM (vedi sopra) in cui si esegue simultaneamente una misura topografica in AFM, una misura di potenziale in EFM ed una di capacità in SCM.

SERS = surface enhanced Raman microscopy = variante di microscopia Raman, ma con oggetto posto su un supporto metallico. La sorgente è un laser e l'emissione Raman è analizzata con uno spettroscopio.

SFEM = scanning field-emission electron microscopy = variante di SEM in cui la sorgente di elettroni è di tipo termoionico "freddo" (Schottky<sup>15</sup>).

SFFM = scanning friction force microscopy = variante di AFM in modalità "a contatto" a deflessione costante, in cui si misura la torsione del cantilever per attrito con l'oggetto. Tale torsione si distingue dalla normale deflessione a mezzo di una fotocellula a quattro quadranti (vedi LFM ed a pag.24, primo paragrafo).

SFM = scanning force microscope = sinonimo di AFM, variante SFFM (vedi qui sopra) – indica genericamente i sistemi a SPM in cui si misurano le forze attrattive o repulsive fra sonda ed oggetto. Il termine deriva dal fatto che è possibile rivelare forze simili a quelle interagenti fra

<sup>15</sup> L'effetto Schottky consiste nell'emissione termoionica di elettroni accresciuta da un forte campo elettrico nei pressi di una punta conduttrice.

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> Un elettrone Auger è quello emesso dalle orbite esterne di un atomo quando questo è eccitato e perde un elettrone dalle orbite interne, rimpiazzato poi da un elettrone delle orbite intermedie.

singoli atomi. Vedi pag. 25.

ShFM = shear force microscopy = TDFM (transverse dynamic force microscopy) = variante di SPM in cui la sonda oscilla parallelamente alla superficie dell'oggetto per rilevare la forze che si esercitano fra le due parti. Tecnica dedicata allo studio di polimeri ed altre macromolecole organiche.

SHPM = scanning Hall<sup>16</sup> probe microscopy = variante di SPM in cui la sonda contiene un trasduttore di Hall miniaturizzato. La grandezza che si misura è il campo magnetico alla superficie del campione, a scala nanometrica.

SICM = scanning ion conductance microscopy = variante di SPM in cui la sonda è costituita da una micropipetta contenente un elettrolita. Si misura la conduttanza fra l'elettrodo e l'oggetto. La tecnica permette di studiare la morfologia di oggetti viventi o porosi immersi in una soluzione elettrolitica. La risoluzione ottenibile è di circa 10 **nm**.

SIM = scanning impedence microscopy = variante di SPM in cui la sonda è conduttrice e misura alcune proprietà elettriche dell'oggetto.

SIM = photoactivation localization superresolution microscopy = sistema confocale in fluorescenza basato su eccitazione localizzata. Sinonimo di PALM, PLSM, RESOLFT, STORM.

SIM = structured illumination microscopy = microscopia in fluorescenza in cui la risoluzione è aumentata sfruttando le differenze fra i punti dell'oggetto riguardo alla lunghezza d'onda emessa, il tempo d'estinzione, e simili.

SNOM = scanning near field optical microscopy = NSOM (vedi sopra e pag. 14).

**SOM** = **scanning optical microscope** = termine generico per indicare il microscopio ottico che esamina l'oggetto per punti e righe successive in modalità raster. Si può applicare ad un sistema convenzionale, confocale, near field, ecc.

SPAM = scanning photoacoustic microscopy = una forma di SOM (vedi qui sopra) in cui il piano oggetto viene esplorato da un fascio laser; si rilevano le piccole variazioni di temperatura nell'oggetto e le onde acustiche (di pressione) che ne derivano. Vedi pag. 3.

SPELEEM = spectroscopic photoemission low energy electron microscopy = SEM a bassa energia in cui vengono raccolti i fotoelettroni emessi dalla superficie del campione.

SPEM = saturated pattern excitation microscopy = microscopia in fluorescenza a tecnica confocale con variante STED (q.v.).

SPIM = metodo di microscopia ottica con illuminazione laterale di un oggetto, immerso in un liquido, a mezzo di un fascio laminare perpendicolare all'asse ottico.

SPLEEM = spin polarized low energy electron microscopy = variante del SPELEEM (vedi qui sopra) in cui viene misurata la polarizzazione dei fotoelettroni.

**SPM** = **scanning probe microscopy** = termine generico che indica la scansione a raster della superficie di un oggetto a mezzo di una "sonda" costituita dall'estremità di uno stilo appuntito di varie caratteristiche. Di solito indica sia l'STM che l'AFM (vedi pag. 23).

SPNM = scanning plasmon near field microscopy = è un derivato dello SNOM (near field microscopy) applicato ad un SPM = sia la sonda che l'oggetto sono conduttori. L'oggetto è illuminato da sotto da un fascio laser che vi crea dei plasmoni; si rilevano le alterazioni nel fascio riflesso. La risoluzione nel piano X - Y può arrivare a qualche nanometro. La distanza sondaoggetto è maggiore che in qualunque SPM e ciò riduce notevolmente le interazioni fra le due parti.

SPoM = surface potential microscopy = scanning surface potential microscopy = variante di SPM in cui si esplora il potenziale elettrico della superficie del campione. La sonda è conduttrice e tenuta ad un certo potenziale. Si misurano le forze elettrostatiche fra sonda e campione. In genere, si esegue prima una normale misura della topografia dell'oggetto; poi si ritorna ad una seconda scansione con la sonda polarizzata.

SSIM = saturated structured illumination microscopy = vedi SPEM e STED.

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> L'effetto Hall consiste nella creazione di un tensione fra le due facce di una lamina conduttrice immersa in un campo magnetico, in cui scorra una corrente elettrica. E. H. Hall lo scoprì nel 1879. L'effetto Hall consente di misurare campi magnetici anche molto deboli.

SSPM = scanning surface potential microscopy = vedi qui sopra: SPoM.

SRM = scanning resistance microscopy = scanning spreading resistance microscopy = varietà di SPM in cui si misura la conduttività del campione. La sonda è a contatto col campione, che poggia su una superficie conduttrice.

SSRM = scanning spreading resistance microscopy = SRM (vedi qui sopra).

STED = stimulated emission depletion microscopy = perfezionmento del sistema confocale in cui la fluoresenza è eccitata da un primo impulso laser e soppressa subito dopo da un secondo impulso di maggior lunghezza d'onda. La tecnica consente una risoluzione laterale assai maggiore di quella convenzionale (meno di 100 **nm** – si parla di "nanoscopia") poiché il secondo impulso sopprime la fluorescenza dalle zone periferiche della regione stimolata. La risoluzione assiale è anch'essa molto maggiore del solito – si parla di eccitazione di singole molecole. L'applicazione preferenziale è l'individuazione di complessi proteici. Gli inventori del sistema (E. Betzig, S. W. Hell e W. E. Moerner, 1999–2006) ne hanno ricavato il Nobel per la chimica.

STEM = scanning trasmission electron microscopy = scanning TEM = uno strumento che esegue simultaneamente esplorazioni del campione in scansione e raccoglie gli elettroni diffusi in trasmissione. Consente di ottenere risoluzioni fino a 0,1- 0,2 **nm**. Vedi a pag. 22.

SThM = scanning thermal microscopy = forma si SPM in cui una sonda resistiva (termocoppia), a contatto col campione, rileva le proprietà termiche di esso, per es. la conducibilità. Si applica in particolare a circuiti integrati, memorie digitali, testine di rilevamento.

**STM** = scanning tunneling microscopy = forma di SPM che sfrutta l'effetto tunnel<sup>17</sup>. La sonda deve essere conduttrice, a brevissima distanza dall'oggetto (anche meno di 1 nm). La corrente di tunnel misurata dipende esponenzialmente dalla distanza sonda-oggetto, per cui la risoluzione in asse Z è elevatissima, anche meno di 1 nm.

STEM = scanning trasmission electron microscopy = variante di SEM = vedi pag. 22.

STOM = scanning tunneling optical microscopy = PSTM (vedi sopra) = EFOM.

STORM = stochastic optical reconstruction microscopy = variante di PALM (q.v.).

STS = scanning tunneling spectroscopy = indicazione generica delle tecniche STM che consentono di acquisire ulteriori informazioni sul campione.

SXM = SPM dove X sta ad indicare una generica sonda.

STXM = scanning trasmission X ray microscopy = microscopia a raggi X che funziona a modalità raster. La sorgente è un tubo a raggi X classico oppure un sincrotrone. Il sistema di focalizzazione più usato è la piastra a zone di Fresnel (vedi pag. 17).

TDFM = transverse dynamic force microscopy = vedi sopra: ShFM.

**TEM** = transmission electron microscopy = vedi a pag. 20.

TEM-STEM = vedi pag. 22.

THETA = La tecnica SPIM (vedi) applicata alla fluorescenza.

TIRF e TIRFM = total internal reflection fluorescence microscopy = Osservazione di un oggetto che aderisce inferiormente ad un copri oggetto ed è illuminato da un fascio laser radente sotto l'"angolo critico". Il fascio illuminante può giungere da sotto, tramite un blocco di vetro su cui poggia l'oggetto ed il copri-oggetto, oppure da sopra, attraverso l'obbiettivo. Al contatto fra vetro (prisma o corpi oggetto) ed oggetto (di solito sospensione di cellule in acqua), il fascio illuminante viene riflesso totalmente all'interno del vetro ma, al di là della superficie di riflessione, si forma un'"onda evanescente", di spessore pari ad una frazione di lunghezza d'onda, che interessa le cellule che vi aderiscono. L'osservazione avviene di solito in fluorescenza e l'obbiettivo raccoglie la radiazione fluorescente. Il vantaggio è l'illuminazione e l'osservazione di uno strato sottilissimo dell'oggetto.

TSM = tandem scanning microscopy = tandem scanning reflected light microscopy = sistema confocale con disco di Nipkow con doppia serie di fori.

TUNA = tunneling atomic force microscopy = variante di AFM con sonda conduttrice tenuta ad un certo potenziale DC; si misura la conduttività elettrica del campione.

-

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> Vedi la nota 9 a pag. 25.

UHVREM = ultrahigh vacuum reflection electron microscopy = SEM in colonna a vuoto spinto  $(10^{-8} \text{ pascal})$ .

UHVSTM = ultrahigh vacuum scanning tunneling microscopy = variante di AFM o STM (vedi) in cui il campione è tenuto sotto vuoto per evitarne le contaminazioni. Questa tecnica consente risoluzioni a livello atomico.

VA-TIRFM = variable angle total internal reflection fluorescence microscopy = variante di TIRFM (vedi sopra) in cui può variare l'angolo d'incidenza del fascio eccitante; in questo modo si varia lo spessore dell'onda evanescente e quindi lo spessore dell'oggetto in cui avviene l'eccitazione della fluorescenza.

VEM = video enhanced microscopy = microscopia convenzionale in cui l'immagine viene elaborata (soprattutto riguardo al contrasto) trasformandola in segnali video analogici o digitali e sfruttando tutte le potenzialità dell'elettronica moderna.

VPSEM = variable pressure SEM = una variante di SEM in cui il campione è isolato in una piccola camera non a vuoto spinto, cioè con una pressione regolabile fino a meno di 100 Pascal<sup>18</sup>, circa 0,001 atm.

XCM = X ray contact microscopy = osservazione della replica di oggetti biologici molli, ottenuta da opportuni polimeri irradiati. La rigidità della replica consente l'osservazione con un SFM –AFM (vedi) senza il pericolo di risentire della deformazione dell'oggetto da parte della sonda. La risoluzione ottenibile risente della granulosità del polimero e può essere inferiore a 10 nm

XRM = X ray microscopy = microscopia a raggi X (vedi a pag. 16).

XSEM = X ray SEM = tecnica che prevede un sensore di raggi X all'interno di un SEM, capace di raccogliere la radiazione X emessa dall'oggetto sottoposto al bombardamento elettronico e trasformarla in immagine. Si parla di "microscopio analitico" in quanto lo spettro energetico dei raggi X prodotti rivela la natura degli atomi bombardati. Vedi testo, pag. 21.

XTEM = cross sectional TEM = un TEM (vedi) dedicato all'osservazione di fette ultrasottili di campioni inclusi in un mezzo passibile di sezionamento in un ultramicrotomo.

#### **BIBLIOGRAFIA**

Impossibile enumerare gli studi particolari sul nostro argomento.

Possiamo consigliare la bibliografia presente in:

- S. W. Hell Microscopy and its focal switch Nature Methods, vol. 6, n° 1, January 2009
- W. J. Croft Under the microscope World Scientific London, Singapore, 2006
- J. P. Robinson e J. Turek Microscope image processing and analysis in: Wiley Encyclopedia of electrical and electronic engineering Wiley & sons, 1999
- D. Evanko Microscopy begets nanoscopy Nature methods Nature publishing group Basingstoke (UK), 2009
- R. Schmidt et al. Spherical nanosized focal spot Nature methods Nature publishing group Basingstoke (UK), June 2008
- R. Heintzmann e M. G. L. Gustafsson Subdiffraction resolution in continuous samples Nature Photonics, vol. 3, July 2009.

.

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> 1 atmosfera = circa 100.000 Pascal.