

CHIMICA DELLE SUPERFICI ED INTERFASI

DOTT. GIULIA FIORAVANTI

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA
LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA CHIMICA
LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE CHIMICHE

TECNICHE MICROSCOPICHE

TECNICHE MICROSCOPICHE

- **MICROSCOPIA OTTICA**

- MICROSCOPIO OTTICO
- MICROSCOPIO CONFOCALE
- MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

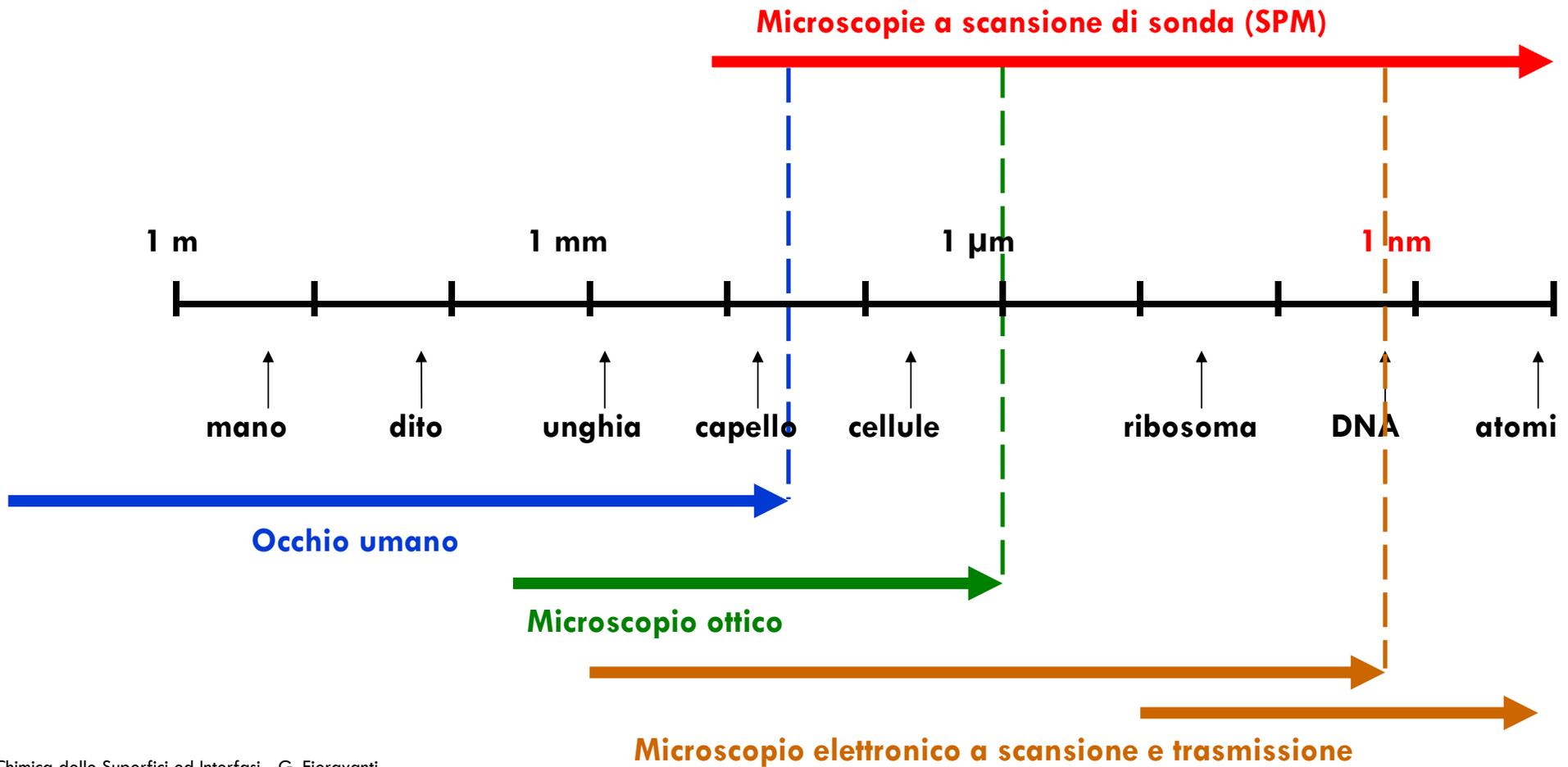
- **MICROSCOPIE ELETTRONICHE**

- TEM: TRASMISSION ELECTRON MICROSCOPY
- SEM: SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

- **MICROSCOPIE A SCANSIONE DI SONDA**

- STM: SCANNING TUNNEL MICROSCOPY
- AFM: ATOMIC FORCE MICROSCOPY

COSA SIAMO IN GRADO DI VEDERE?

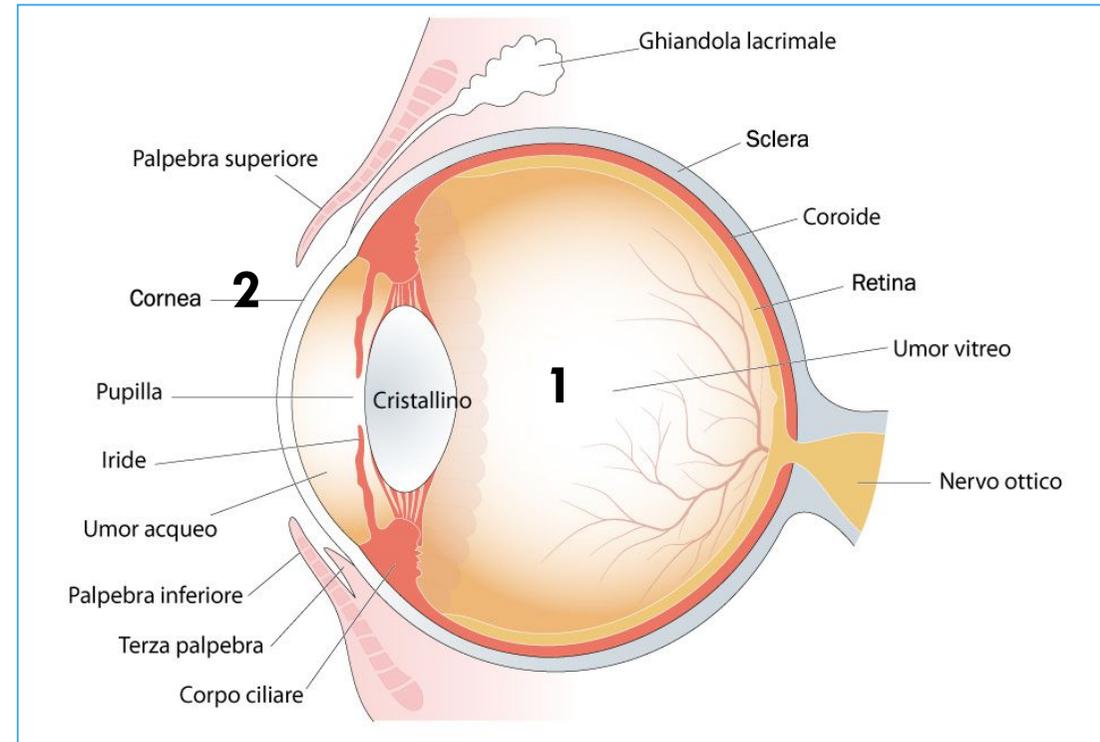


L'OCCHIO UMANO

1. **BULBO OCULARE:** QUASI SFERICO,

DIAMETRO ≈ 2.3 cm

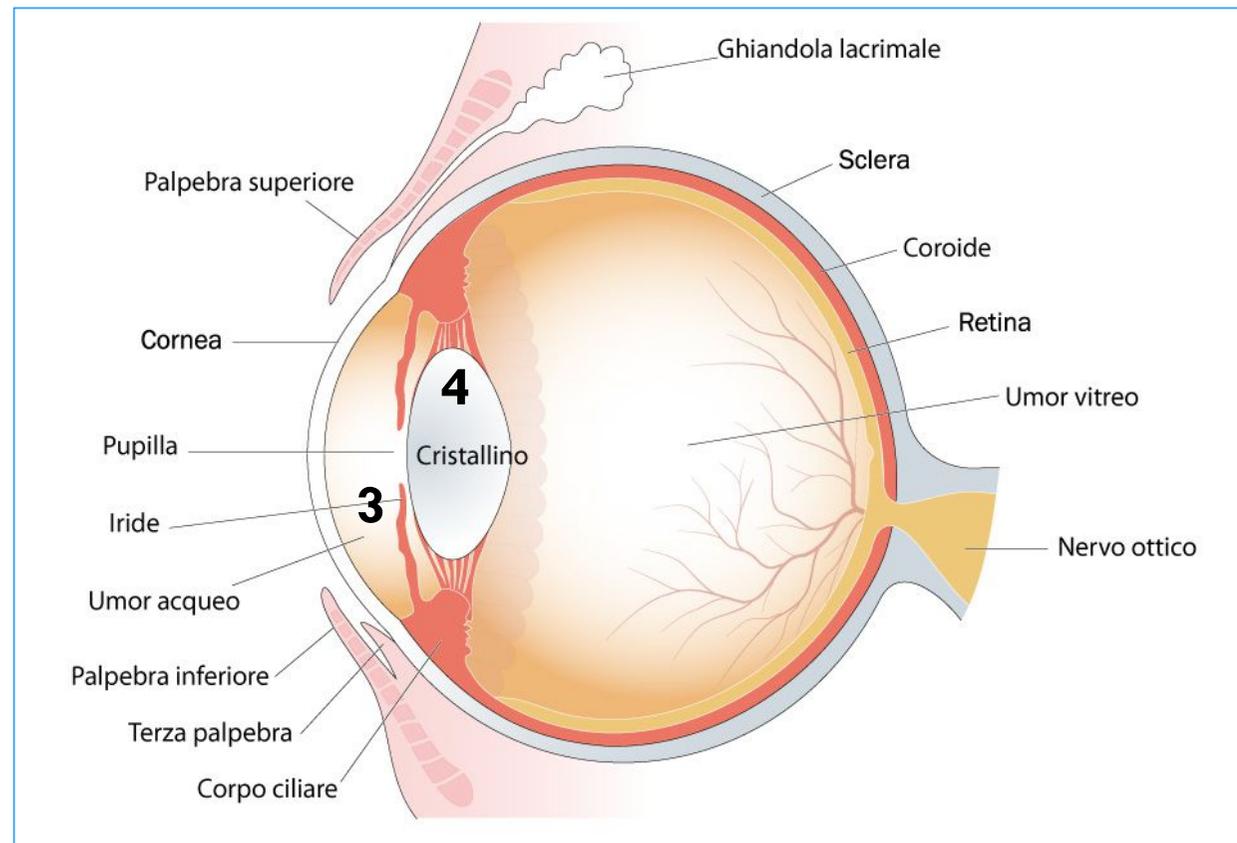
- **COROIDE:** MEMBRANA SCURA CHE ASSORBE LA LUCE DISPERSA
- **RETINA E MACCHIA LUTEA:** L'OCCHIO TENDE A RUOTARE IN MODO CHE L'IMMAGINE SI FORMI IN CORRISPONDENZA DELLA PARTE CENTRALE DELLA MACULA (FOVEA CENTRALIS)



2. **CORNEA:** RICOPRE UNA **PROTUBERANZA** TRASPARENTE POSTA **SULLA SUPERFICIE DEL BULBO OCULARE**, DEVIAMENTE GRAN PARTE DELLA LUCE.

L'OCCHIO UMANO

- IRIDE:** VARIA DI DIMENSIONI E **DETERMINA LA QUANTITÀ DI LUCE CHE ENTRA NELL'OCCHIO** ATTRAVERSO LA PUPILLA (COME IL DIAFRAMMA DI UNA MACCHINA FOTOGRAFICA).
- CRISTALLINO:** LENTE CON LUNGHEZZA FOCALE VARIABILE REGOLATA DAI MUSCOLI CILIARI.
 - RAGGIO DI CURVATURA GRANDE PER LA MESSA A FUOCO DI OGGETTI LONTANI
 - LA LUNGHEZZA FOCALE DIMINUISCE PER METTERE A FUOCO OGGETTI PIÙ VICINI



L'OCCHIO UMANO

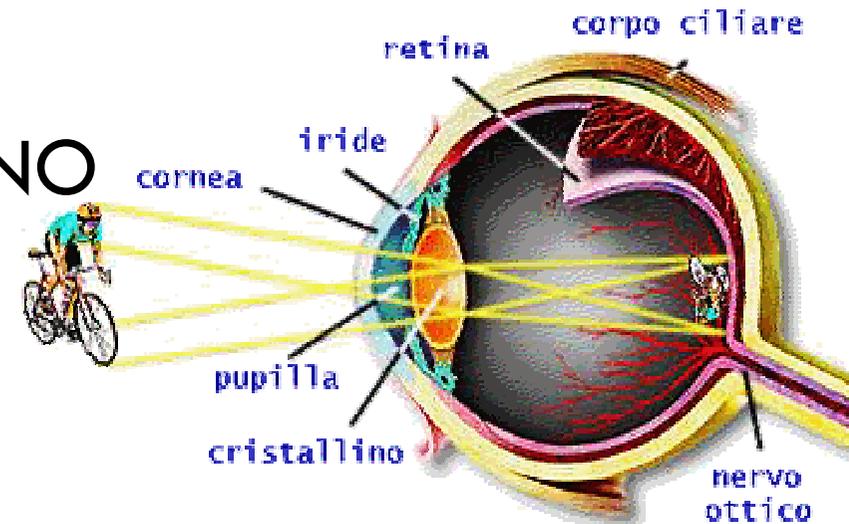
CARATTERISTICHE DELL'OCCHIO UMANO:

- CAMPO VISIVO 180°
- CAMBIO DI MESSA A FUOCO RAPIDO
- RISOLUZIONE PROSSIMA A QUELLA LIMITE IMPOSTA DALLA DIFFRAZIONE → 0.1 mm a 25 cm

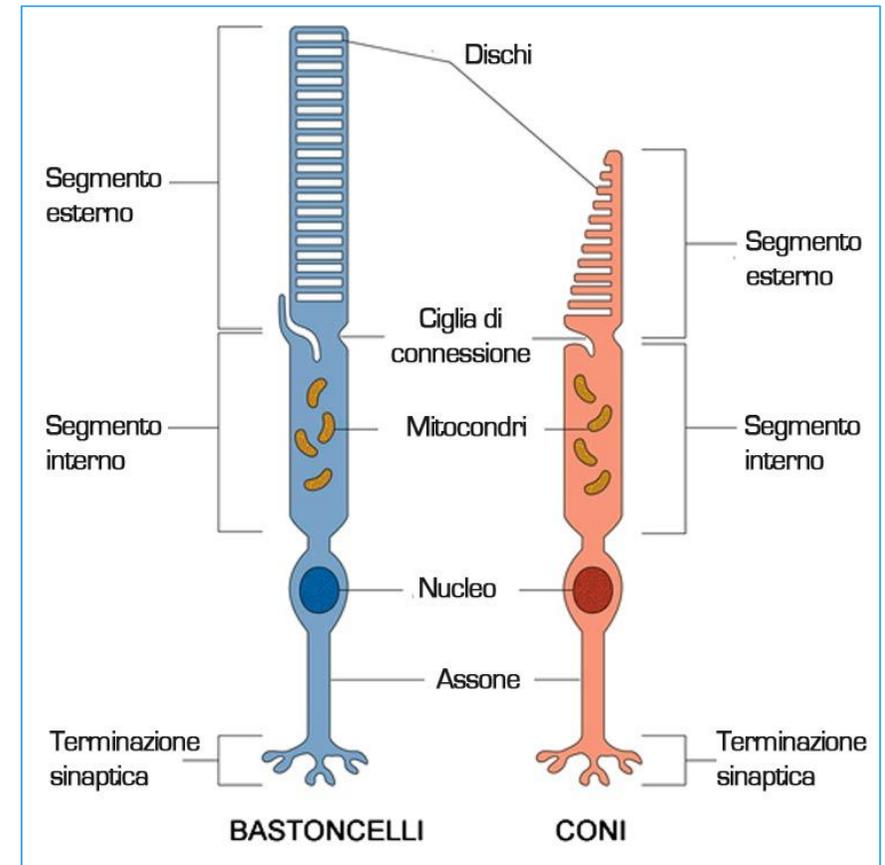
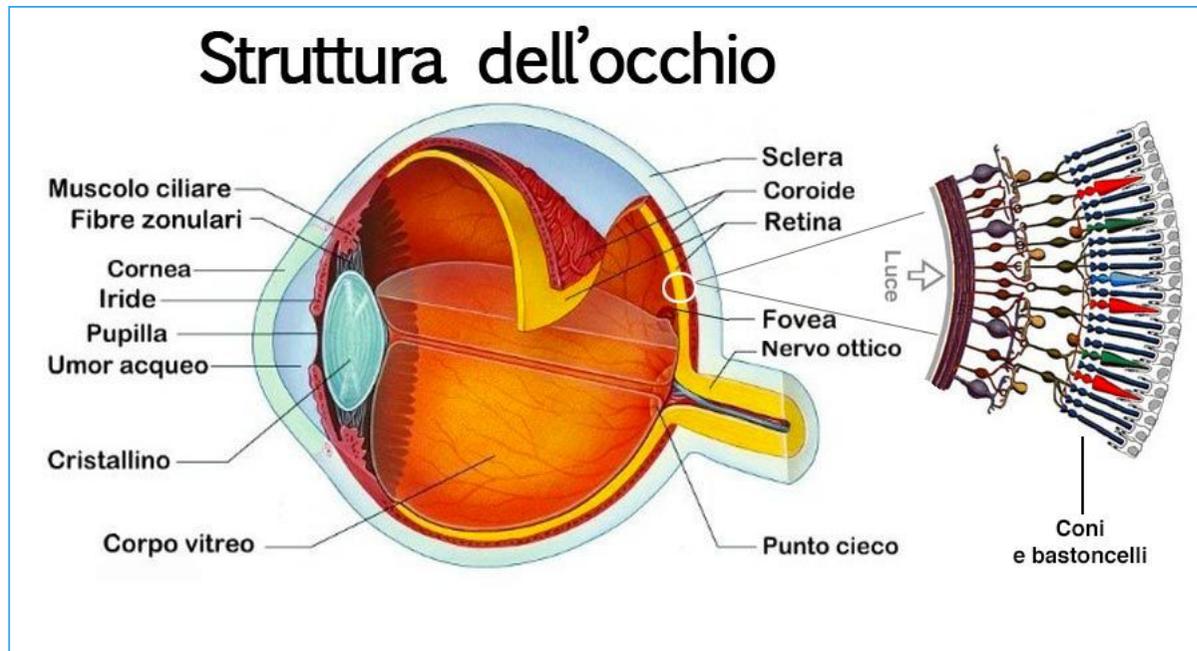
FUNZIONAMENTO:

UN SISTEMA DI LENTI FORMA UN'**IMMAGINE REALE E CAPOVOLTA** SU UNA SUPERFICIE SENSIBILE ALLA LUCE. LA RETINA CONTIENE I **FOTORECETTORI** DELL'OCCHIO CHE TRASDUCONO LA LUCE IN **POTENZIALI ELETTRICI** INVIATI ATTRAVERSO IL NERVO OTTICO.

I FOTORECETTORI SONO DI DUE TIPI: **CONI** (DEPUTATI ALLA VISIONE DEI COLORI «RGB») E ALLA VISIONE DISTINTA) E **BASTONCELLI** (SENSIBILI AL MOVIMENTO, IMPIEGATI PER LA VISIONE AL BUIO).



L'OCCHIO UMANO



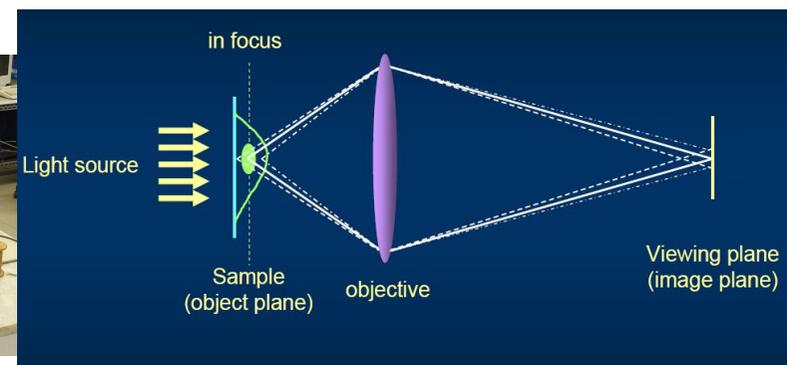
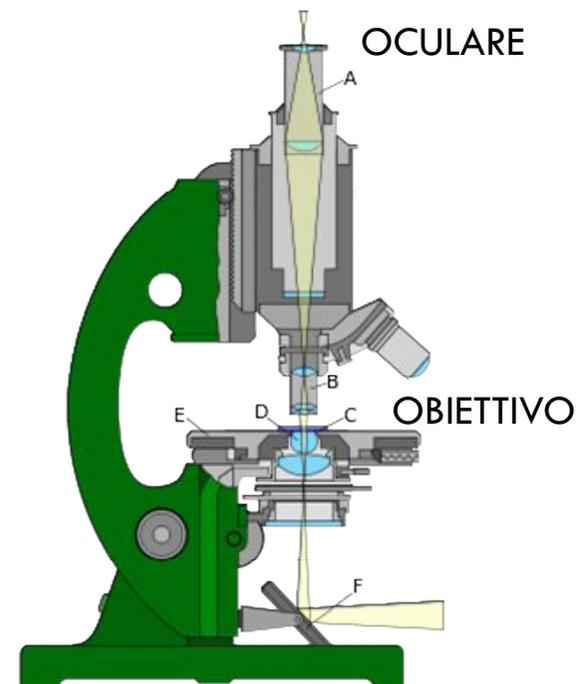
MICROSCOPIO OTTICO

IL MICROSCOPIO OTTICO È UNA TIPOLOGIA DI MICROSCOPIO CHE SFRUTTA LA LUCE CON LUNGHEZZA D'ONDA DAL VICINO INFRAROSSO ALL'ULTRAVIOLETTO, COPRENDO TUTTO LO **SPETTRO VISIBILE**.

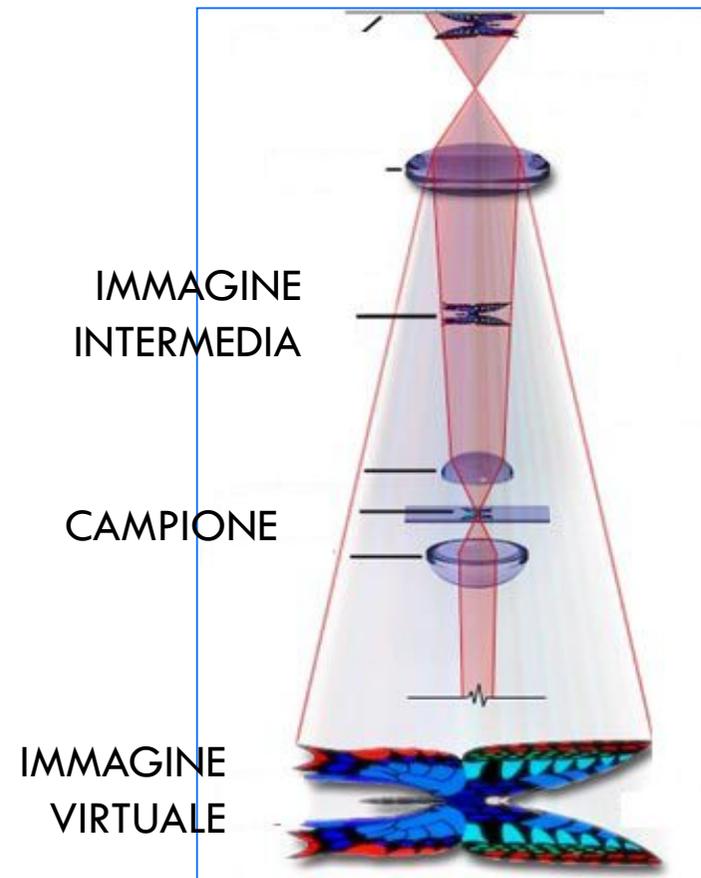
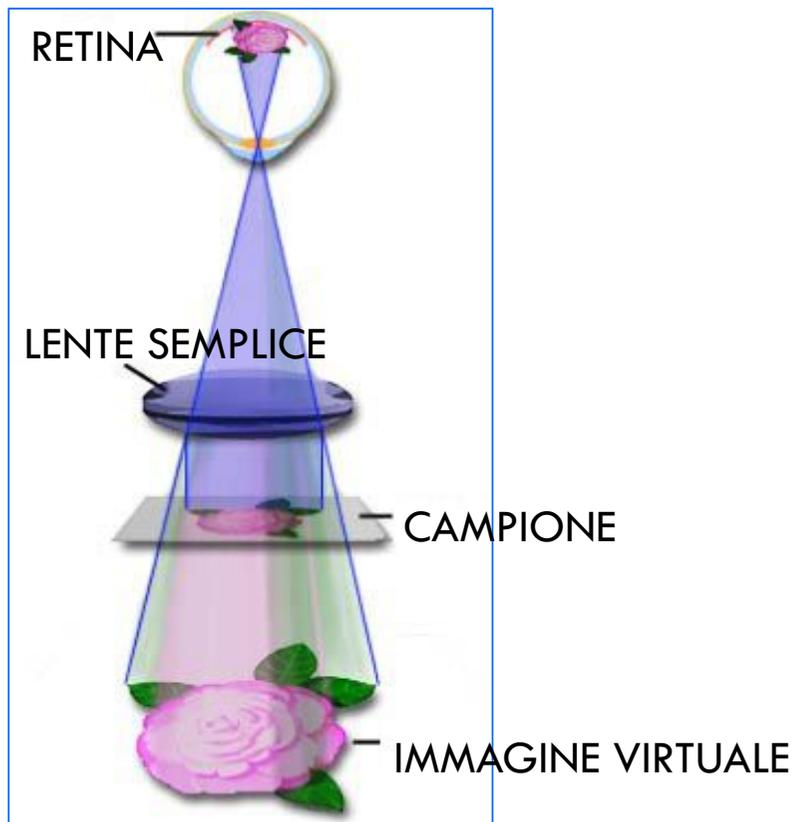
COSTITUITO DA **LENTI SFERICHE SOTTILI**, **SISTEMI OTTICI CENTRATI** (INSIEMI DI MEZZI AVENTI INDICI DI RIFRAZIONE DIVERSI, SEPARATI DA SUPERFICI SFERICHE O PIANE).

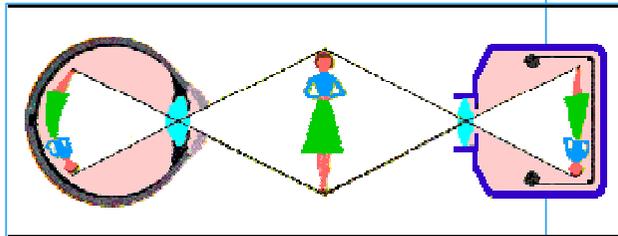
LA **LENTE A CUI APPOGGIAMO L'OCCHIO È DETTA OCULARE**, MENTRE ALL'ALTRA ESTREMITÀ DEL TUBO, VICINO ALL'OGGETTO DA OSSERVARE, TROVIAMO UN'ALTRA LENTE, L'**OBIETTIVO**.

- **LENTE OBIETTIVO**: IMMAGINE REALE INGRANDITA
- **LENTE OCULARE**: ULTERIORE INGRANDIMENTO



MICROSCOPIO OTTICO





1° lente



diaframma



2° lente



pellicola



macchina fotografica



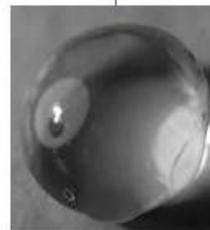
cornea



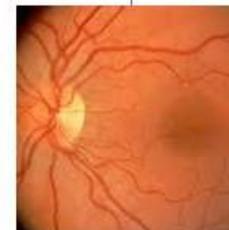
iride



crystallino



retina



occhio

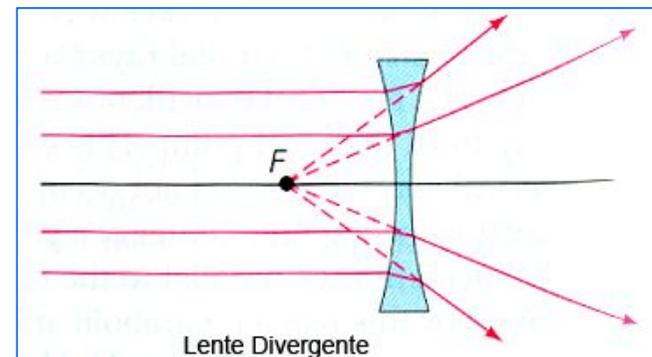
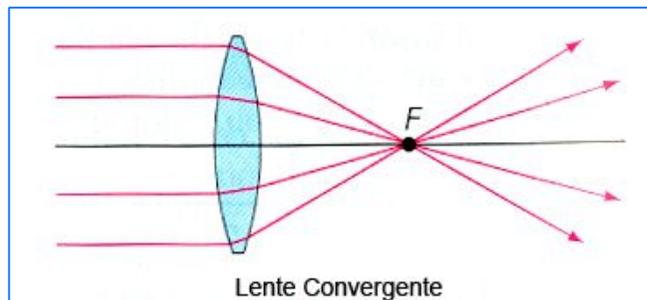


LENTI CONVERGENTI-DIVERGENTI

UNA **LENTE** È UN **ELEMENTO OTTICO** CHE HA LA PROPRIETÀ DI CONCENTRARE O DI FAR DIVERGERE I RAGGI DI LUCE.

IL **MICROSCOPIO SEMPLICE** È COSTITUITO DA UNA **LENTE CONVERGENTE** POSTA TRA L'OCCHIO E L'OGGETTO DA OSSERVARE. LA LENTE FORNISCE UN'IMMAGINE VIRTUALE DIRITTA E INGRANDITA DELL'OGGETTO.

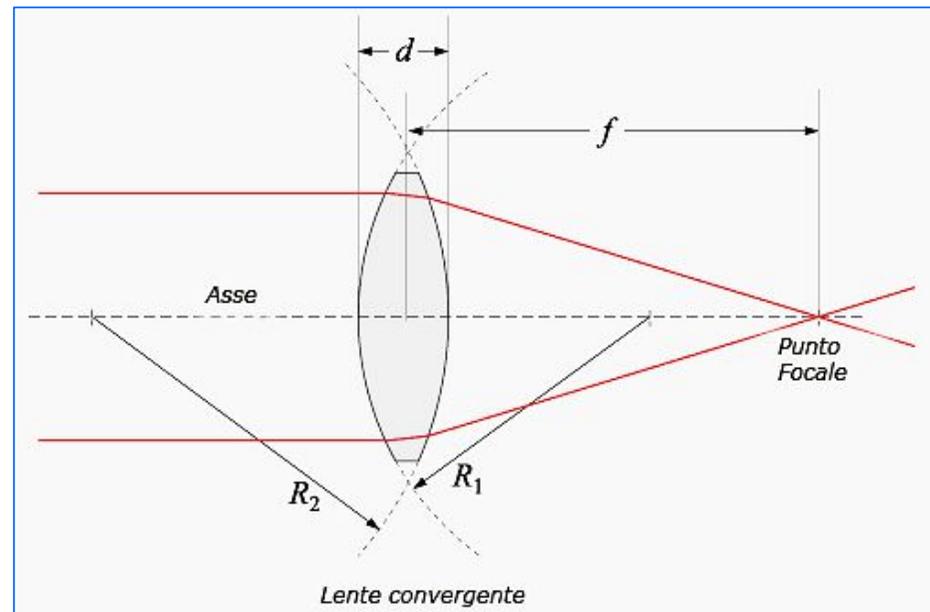
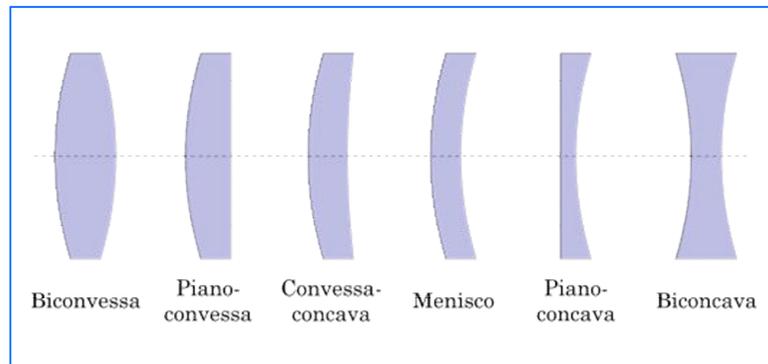
IL **MICROSCOPIO COMPOSTO** È COSTITUITO DA UN **SISTEMA DI DUE LENTI CONVERGENTI**. L'OGGETTO DA OSSERVARE VIENE POSTO DAVANTI ALL'OBIETTIVO CHE NE FORNISCE UN'IMMAGINE REALE, CAPOVOLTA E INGRANDITA.



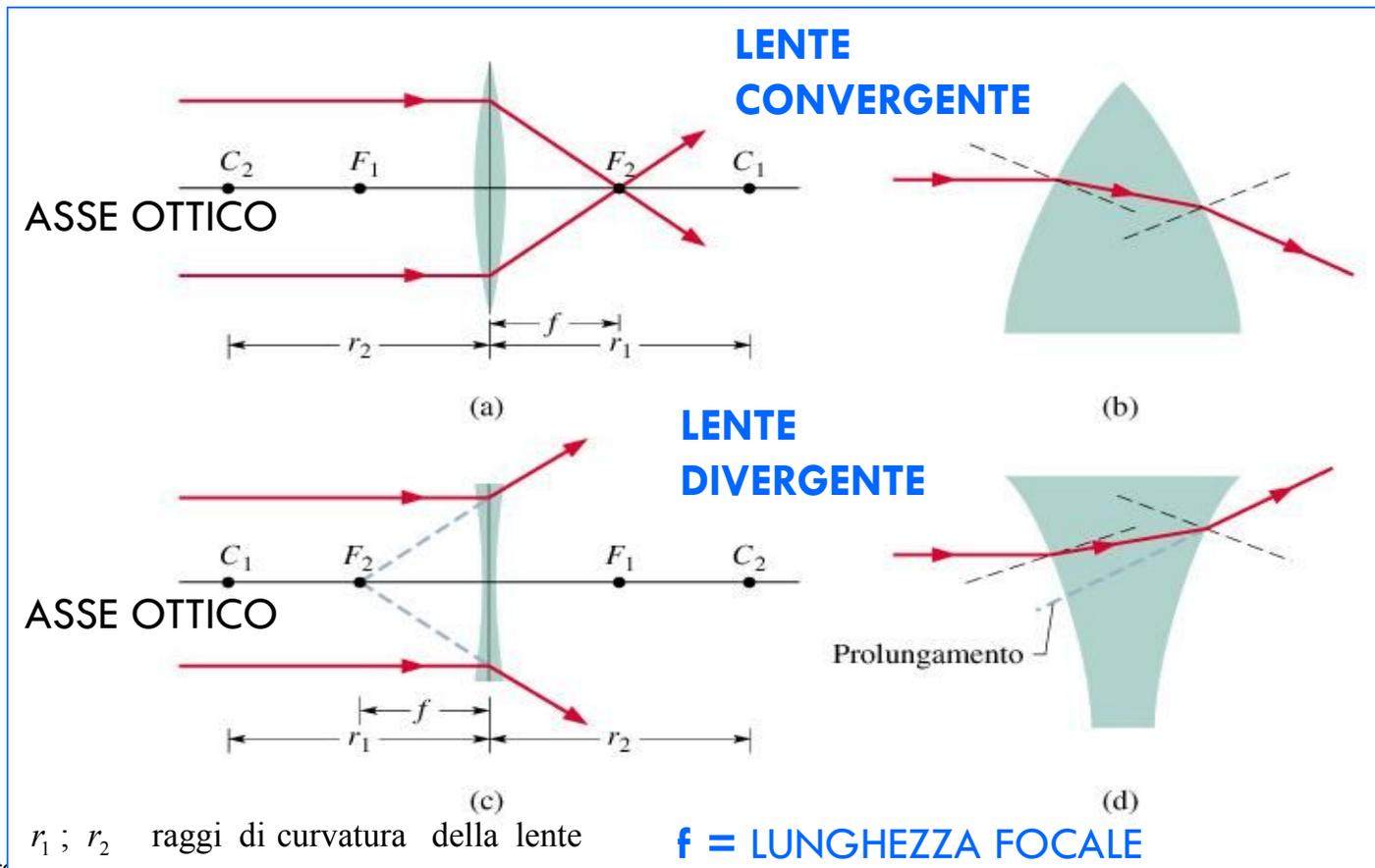
LENTI CONVERGENTI-DIVERGENTI

SE LA LENTE È **BICONVESSA O PIANO-CONVESSA** UN FASCIO DI RAGGI PARALLELI ALL'ASSE CHE ATTRAVERSA LA LENTE VIENE "**FOCALIZZATO**" (CIOÈ VIENE FATTO CONVERGERE) SU UN PUNTO DELL'ASSE A UNA CERTA DISTANZA OLTRE LA LENTE, NOTA COME DISTANZA FOCALE. QUESTO TIPO DI LENTE È DETTA **POSITIVA**.

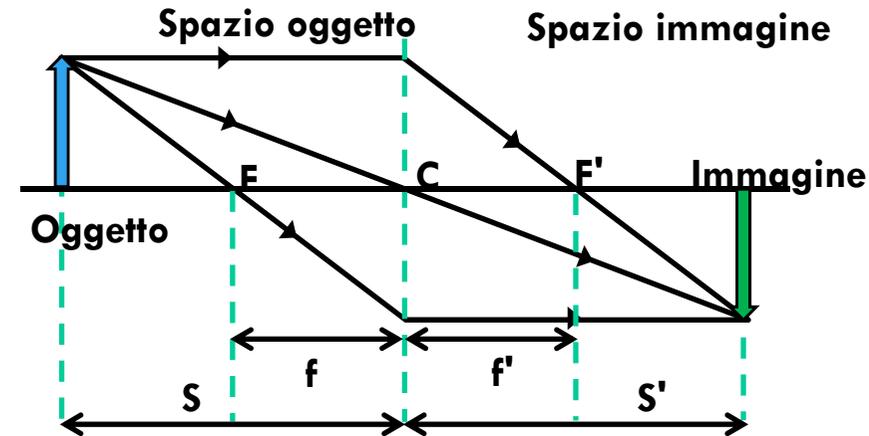
SE LA LENTE È **BICONCAVA O PIANO-CONCAVA**, UN FASCIO COLLIMATO È FATTO DIVERGERE E LA LENTE È PERCIÒ DETTA **NEGATIVA**.



LENTI CONVERGENTI-DIVERGENTI



LENTI SOTTILI



DATE LE DISTANZE s TRA LENTE E OGGETTO E s' TRA LENTE E IMMAGINE, PER UNA LENTE DI SPESSORE TRASCURABILE VALE LA FORMULA (**EQUAZIONE PER LENTI SOTTILI**):

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{s} + \frac{1}{s'}$$

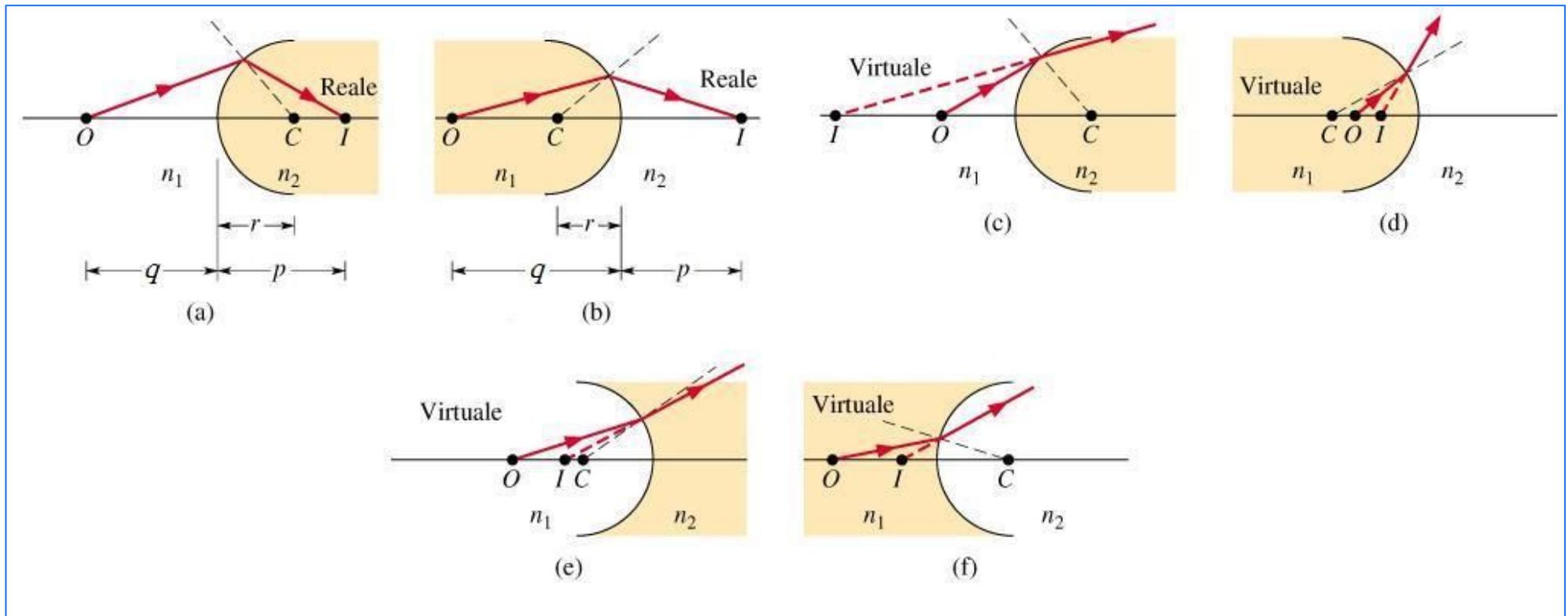
DA CUI DERIVA CHE SE UN OGGETTO È POSTO A DISTANZA s SULL'ASSE DELLA LENTE POSITIVA DI FOCALE f , SU UNO SCHERMO POSTO A DISTANZA s' SI FORMERÀ L'IMMAGINE DELL'OGGETTO.

QUESTO CASO, CHE VALE PER $s > f$ È ALLA BASE DELLA **FOTOGRAFIA**, E L'IMMAGINE COSÌ FORMATA È DETTA **IMMAGINE REALE**.

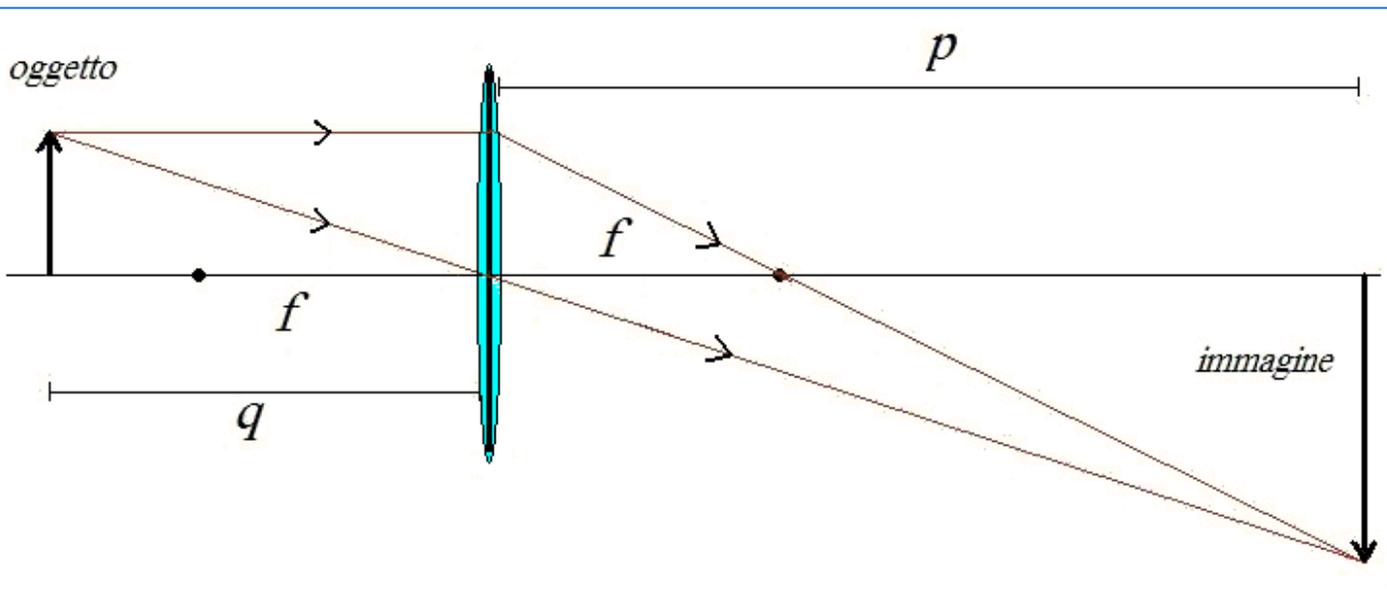
SI PARLA DI **IMMAGINE VIRTUALE** QUANDO, INVECE, SI HA A CHE FARE CON LENTI DI INGRANDIMENTO.

LEGGE DI SNELL

$$\frac{n_1}{q} + \frac{n_2}{p} = \frac{n_2 - n_1}{r}$$



FORMAZIONE DELLE IMMAGINI



$$\frac{1}{f} = \frac{n_2 - n_1}{n_1} \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right)$$

$$\frac{1}{f} = (n - 1) \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right)$$

IN ARIA $n_1 \approx 1$ ED $n_2 = n$ (CON $n > 1$)

n È L'INDICE DI RIFRAZIONE DEL MATERIALE CON CUI È COSTITUITA LALENTE.

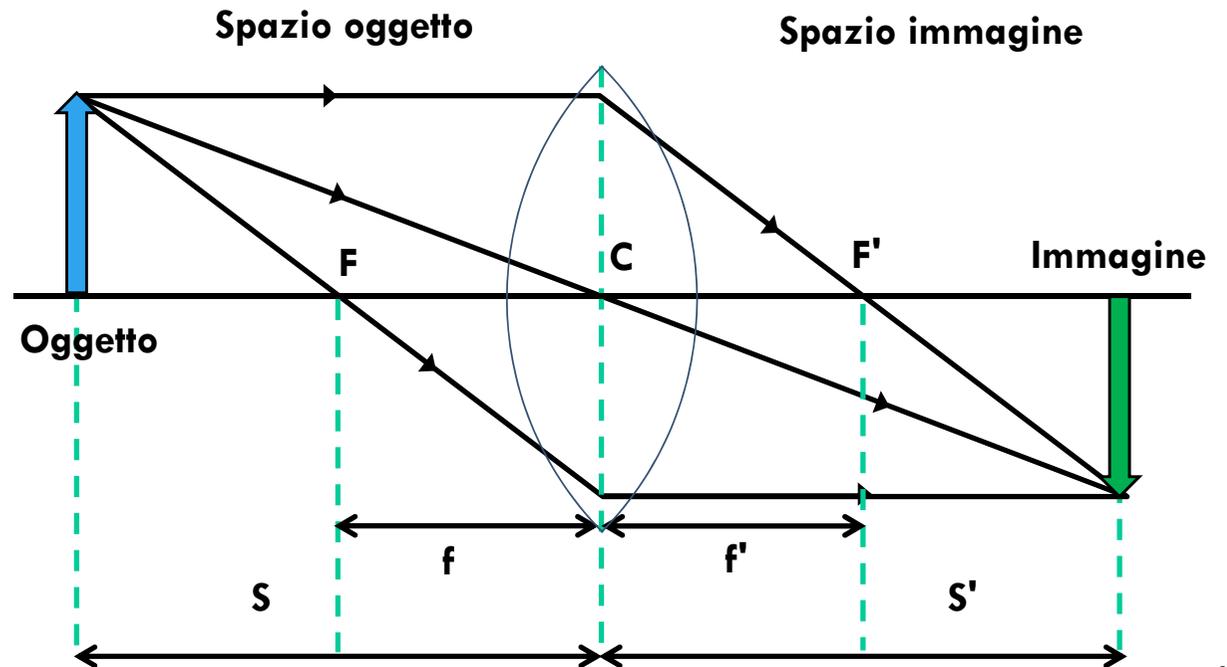
FORMAZIONE DELL'IMMAGINE

- ASSE FOCALE, CENTRO FOCALE, PUNTI FOCALI F ED F'
- **LUNGHEZZA FOCALE: f** DIPENDE DALL'INDICE DI RIFRAZIONE n E DAI RAGGI DI CURVATURA r_1 ED r_2

S = DISTANZA DELL'OGGETTO

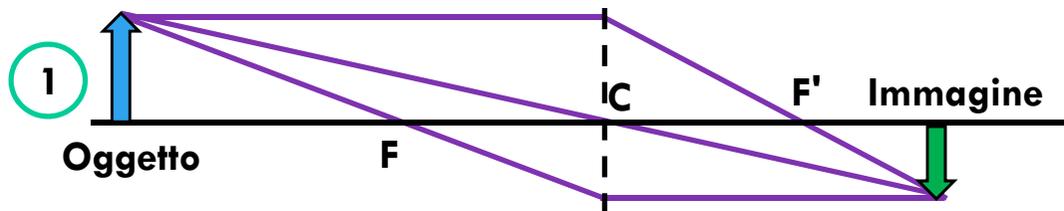
S' = DISTANZA DELL'IMMAGINE

$$\frac{1}{f} = (n - 1) \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} \right)$$

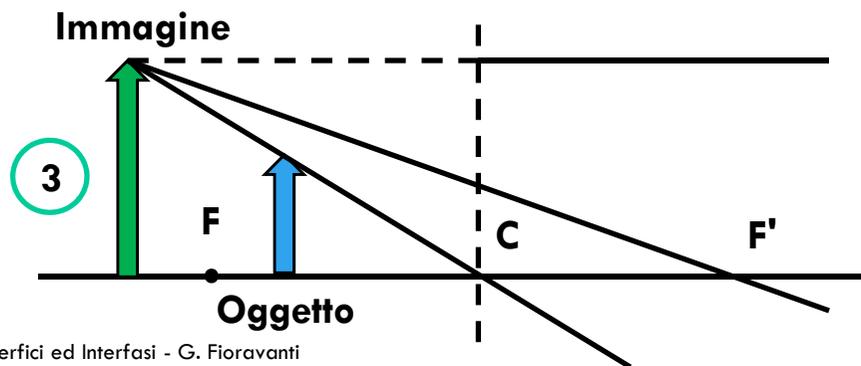


FORMAZIONE DELL'IMMAGINE

1. OGGETTO A DISTANZA $S > 2 f$; SPAZIO IMMAGINE CAPOVOLTO, RIMPICCIOLITO (**FOTOGRAFIA**)
2. OGGETTO A DISTANZA $f < S < 2 f$; SPAZIO IMMAGINE CAPOVOLTO, INGRANDITO
3. OGGETTO A DISTANZA $S < f$; SPAZIO OGGETTO DIRITTO, INGRANDITO (**LENTE DI INGRANDIMENTO**)

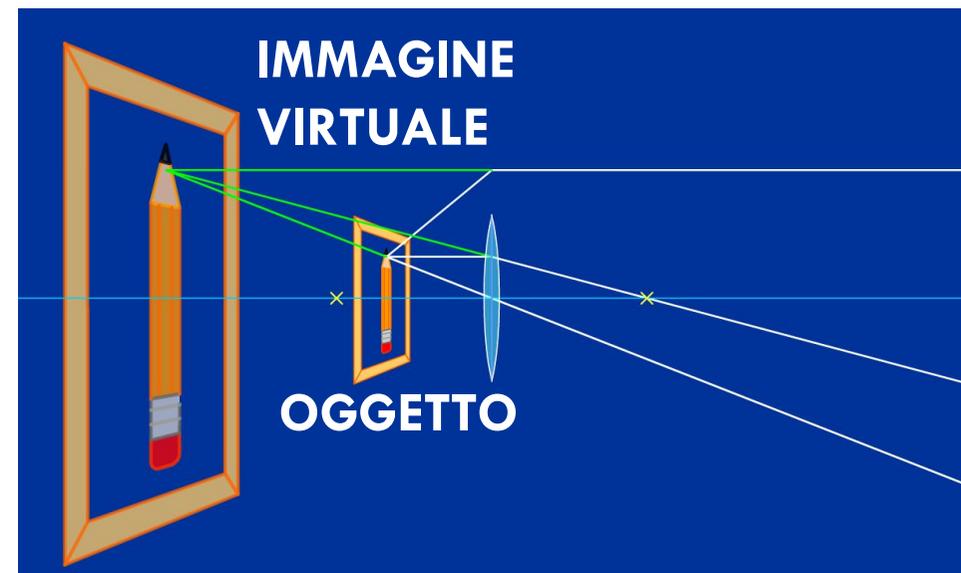
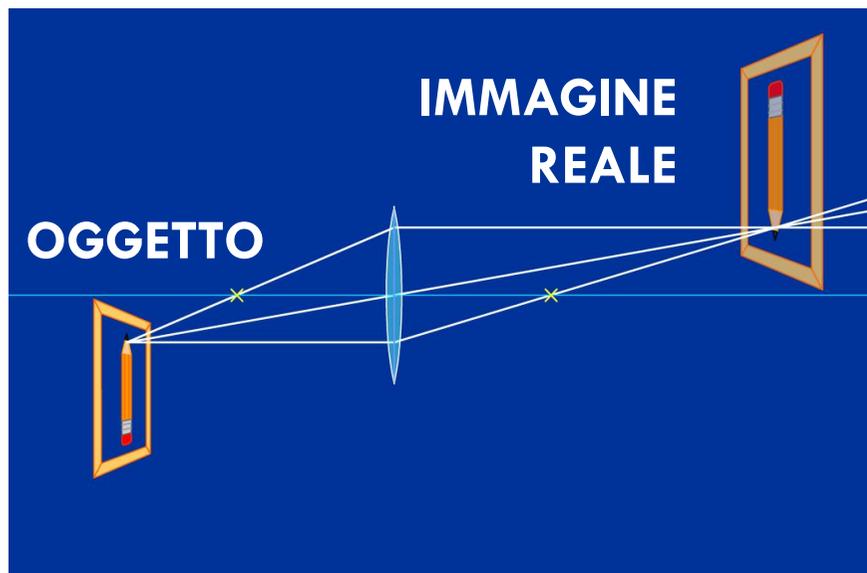


$$m = \frac{f}{S - f} = \frac{S' - f}{f} = \frac{S'}{S}$$



Si noti che se $S < f$, allora S' diviene negativo, e l'immagine si forma apparentemente dallo stesso lato dell'oggetto rispetto alla lente. Questo tipo di immagine, detta **IMMAGINE VIRTUALE**, non può essere proiettata su uno schermo, ma un osservatore vedrebbe attraverso la lente una immagine in quella posizione.

FORMAZIONE DELL'IMMAGINE



INGRANDIMENTO

SI DEFINISCE **INGRANDIMENTO** (MAGNIFICAZIONE) IL RAPPORTO TRA LE DIMENSIONI DELL'OGGETTO ORIGINALE, E QUELLE DELL'IMMAGINE OTTENUTA.

L'INGRANDIMENTO LINEARE IN CASO DI MICROSCOPI COMPOSTI È DATO DA:

$$M = m_o m_e \qquad m = \frac{f}{s-f} = \frac{s'-f}{f} = \frac{s'}{s}$$

DOVE m_o È L'INGRANDIMENTO DELL'OBIETTIVO, DIPENDENTE DALLA SUA LUNGHEZZA FOCALE f_o E DALLA DISTANZA d TRA IL PIANO FOCAL POSTERIORE DELL'OBIETTIVO E IL PIANO FOCAL DELL'OCULARE, ED m_e È L'INGRANDIMENTO DELL'OCULARE.

- **OBIETTIVO:** FORMA UN'IMMAGINE REALE INGRANDITA DELL'OGGETTO CON INGRANDIMENTO:

$$m_o = d / f_o$$

- **OCULARE:** FORMA UN'IMMAGINE VIRTUALE ULTERIORMENTE INGRANDITA CON:

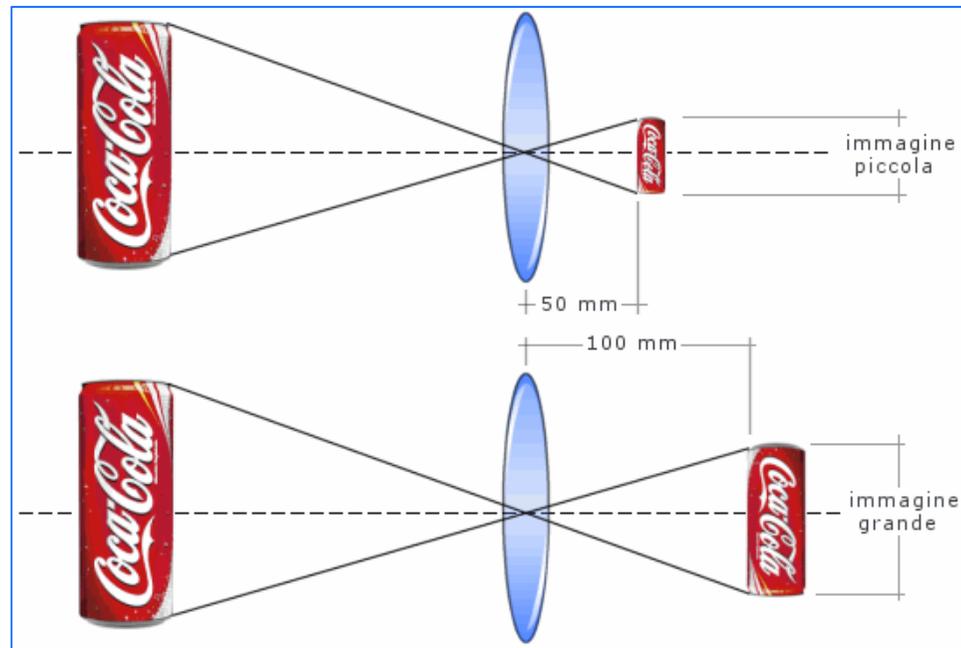
$$m_e = - s_e' / s_e \approx - s_e' / f_e$$

Ingrandimento oculare: solitamente 10x

Ingrandimento obiettivo: solitamente 4x, 25x, 40x, 100x.

FOTOGRAFIA

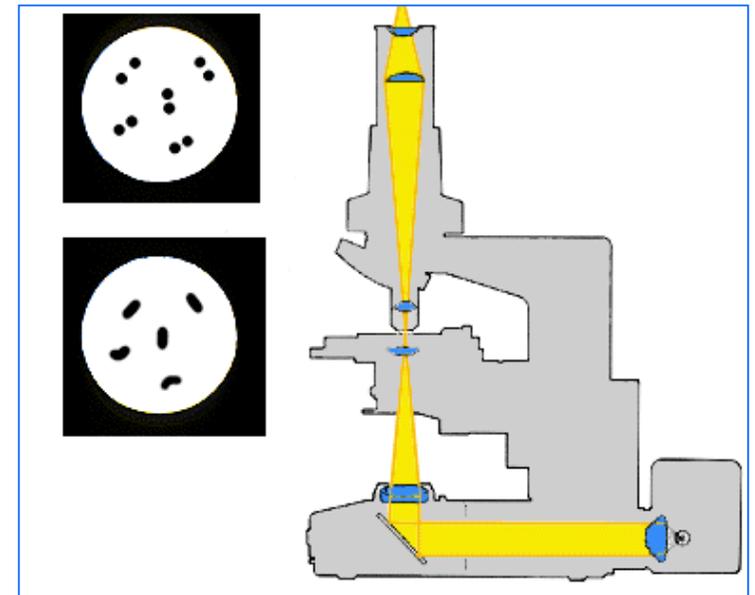
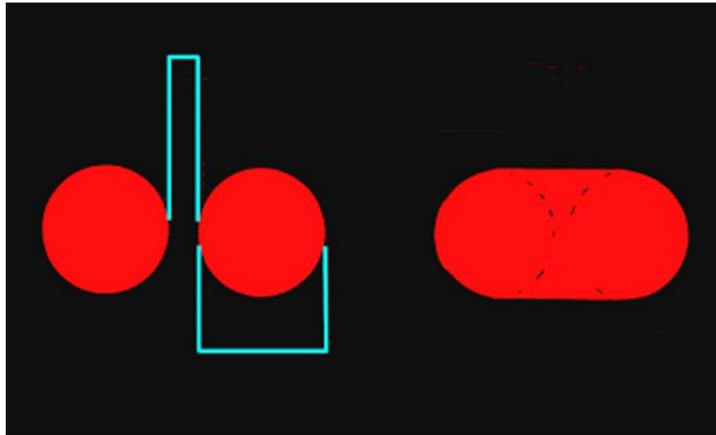
LE DIMENSIONI DELL'IMMAGINE PRODOTTA DALL'OBIETTIVO SUL PIANO PELLICOLA SONO DIRETTAMENTE PROPORZIONALI ALLA LUNGHEZZA FOCALE DELL'OBIETTIVO. AD ESEMPIO, UN OBIETTIVO 100 mm RIPRODURRÀ SUL PIANO PELLICOLA UN'IMMAGINE LINEARMENTE DOPPIA DI QUELLA FORMATA DA UN 50 mm.



LIMITI DEL MICROSCOPIO

ANCHE IL MICROSCOPIO HA DEI LIMITI: NON BASTA INFATTI INGRANDIRE PER POTERE RISOLVERE DUE OGGETTI VICINI.

L'INGRANDIMENTO ECCESSIVO PORTA ALL'INGRANDIMENTO A VUOTO: GLI OGGETTI RISULTANO PIÙ GRANDI MA NON MEGLIO RISOLTI.



LIMITE DI RISOLUZIONE E POTERE DI RISOLUZIONE

IL **POTERE RISOLUTIVO** DI UN MICROSCOPIO È LA **CAPACITA' DI RICONOSCERE COME DISTINTI DUE PUNTI ESTREMAMENTE VICINI TRA LORO.**

LA **DISTANZA MINIMA** ALLA QUALE DUE PUNTI SONO VISTI COME DISTINTI SI CHIAMA **LIMITE DI RISOLUZIONE.**

- **MICROSCOPIO OTTICO: LIMITE DI RISOLUZIONE DI 0,2 μm .** IL POTERE DI RISOLUZIONE DEL MICROSCOPIO OTTICO È SUPERIORE A QUELLO DELL'OCCHIO UMANO.
- **AD OCCHIO NUDO, L'UOMO HA UN LIMITE DI RISOLUZIONE DI CIRCA 100 μm .**

Un sistema visivo per consentire la visione nitida di un'immagine non deve solo ingrandire: **infatti, non è vantaggioso ingrandire l'immagine di un oggetto se non si ha un relativo aumento del potere di risoluzione!** Se ciò non avviene l'immagine appare sfuocata, cioè scarsamente nitida e interpretabile.

POTERE DI RISOLUZIONE

IL POTERE DI RISOLUZIONE È L'INVERSO DEL LIMITE DI RISOLUZIONE: MAGGIORE È IL LIMITE DI RISOLUZIONE DI UN SISTEMA VISIVO MINORE È IL SUO POTERE RISOLUTIVO.

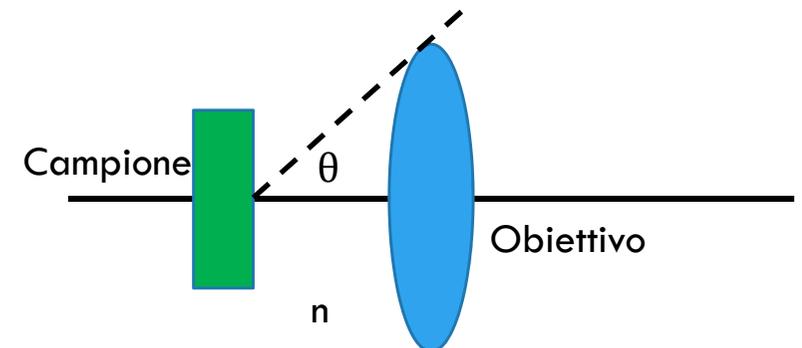
LA DISTANZA MINIMA ALLA QUALE DUE PUNTI SONO VISTI COME DISTINTI SI CHIAMA **LIMITE DI RISOLUZIONE**. DI SOLITO, IN UN MICROSCOPIO COMPOSTO, **LA RISOLUZIONE È DETERMINATA DAL SISTEMA DI LENTI PIÙ VICINO ALL'OGGETTO (OBIETTIVO)**.

n = INDICE DI RIFRAZIONE DEL MEZZO INTERPOSTO TRA L'OBIETTIVO E L'OGGETTO

θ = ANGOLO SOTTESO DALLALENTE DELL'OBIETTIVO

POTERE RISOLUTIVO:

$$\frac{1}{d} = \frac{2 n \sin \theta}{\lambda}$$

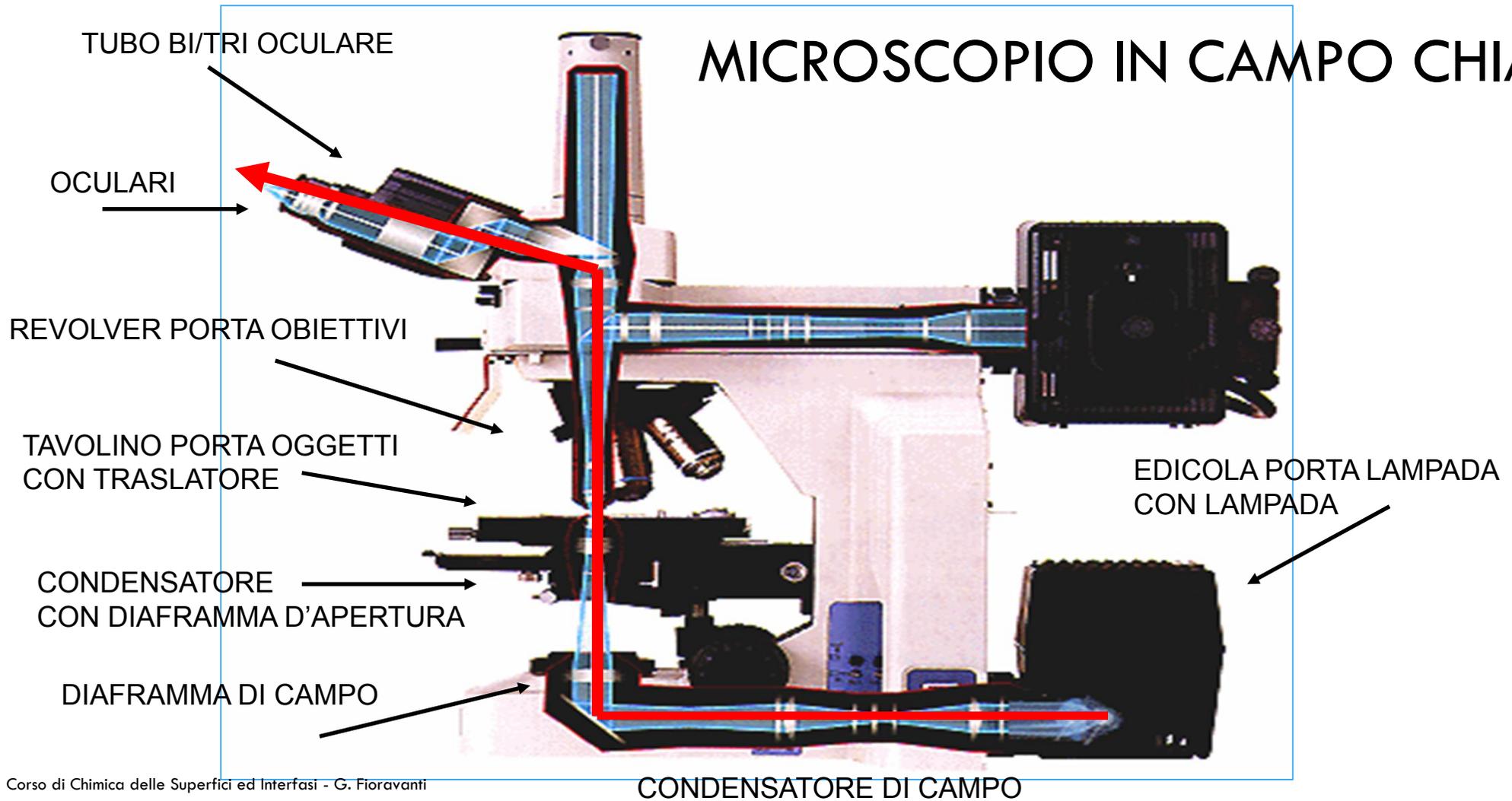


INGRANDIMENTO MASSIMO E POTERE SEPARATORE

- SE L'ANGOLO SOTTESO DALL'OBIETTIVO È 90° , QUAL È LA MINIMA SEPARAZIONE RISOLVIBILE TRA OGGETTI POSTI IN ARIA E ILLUMINATI CON LUCE VERDE ($\lambda = 500 \text{ nm}$)?
 - 250 nm
- QUAL È LA MINIMA DISTANZA CHE PUÒ ESSERE RISOLTA USANDO UN MICROSCOPIO CON $M=400$ O $M=1000$ (OCCHIO UMANO = 0.1 mm)?
 1. $M = 400$ $0.1 \text{ mm}/400 = 250 \text{ nm}$
 2. $M = 1000$ $0.1 \text{ mm}/1000 = 100 \text{ nm}$

INGRANDIMENTI MAGGIORI DI 400 NON PERMETTONO DI DISTINGUERE UN NUMERO MAGGIORE DI PARTICOLARI.

MICROSCOPIO IN CAMPO CHIARO



MESSA A FUOCO DEL MICROSCOPIO

SI OTTIENE SPOSTANDO IL PIATTELLO DEL PREPARATO RISPETTO AL SISTEMA RIGIDO OCULARE-OBIETTIVO.

IL PARTICOLARE RISULTA A FUOCO QUANDO DISTA DALL'OBIETTIVO UNA DISTANZA TALE PER CUI **L'IMMAGINE VIRTUALE SI FORMA NEL CAMPO VISIVO DELL'OCCHIO DELL'OSSERVATORE.**

DIPENDE ANCHE DAI **DIFETTI VISIVI DELL'OSSERVATORE.**

LA **PROFONDITÀ DI CAMPO** (SPESSORE DI CAMPIONE CHE È POSSIBILE METTERE A FUOCO CONTEMPORANEAMENTE) È **INVERSAMENTE PROPORZIONALE ALL'INGRANDIMENTO.**

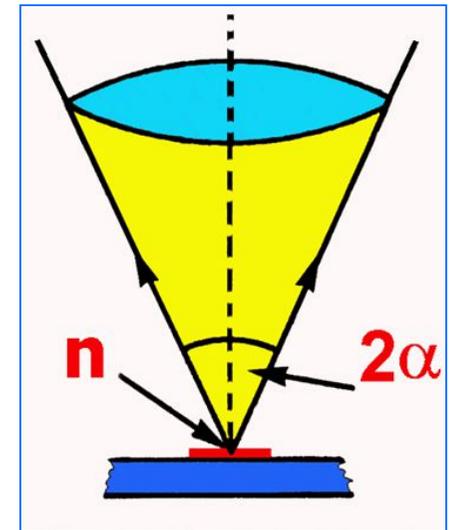
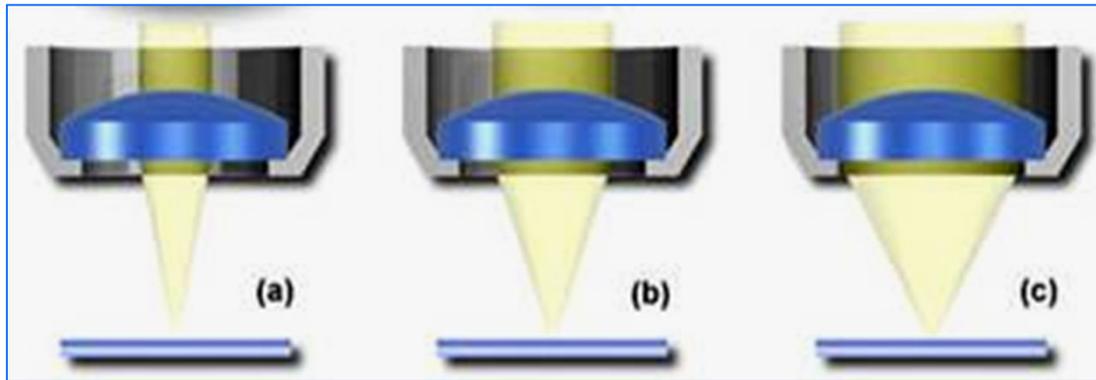
- **LENTE DEL CONDENSATORE:** FOCALIZZA LA LUCE INCIDENTE SUL CAMPIONE
- **DIAFRAMMA:** REGOLA L'INTENSITÀ LUMINOSA

APERTURA NUMERICA (NA)

L'APERTURA NUMERICA (NA) È UN PARAMETRO INDICATIVO DEL POTERE DI RISOLUZIONE DELL'OBIETTIVO, QUINDI, DELLA SUA CAPACITA' OTTICA.

NA INDICA LA MASSIMA AMPIEZZA DEL CONO DI LUCE CHE ENTRA NELL'OBIETTIVO.

$N.A. = n \sin \alpha$ (α sempre inferiore a 90°)



Maggiore è l'angolo con cui l'obiettivo è in grado di raccogliere la luce maggiore è il potere di risoluzione

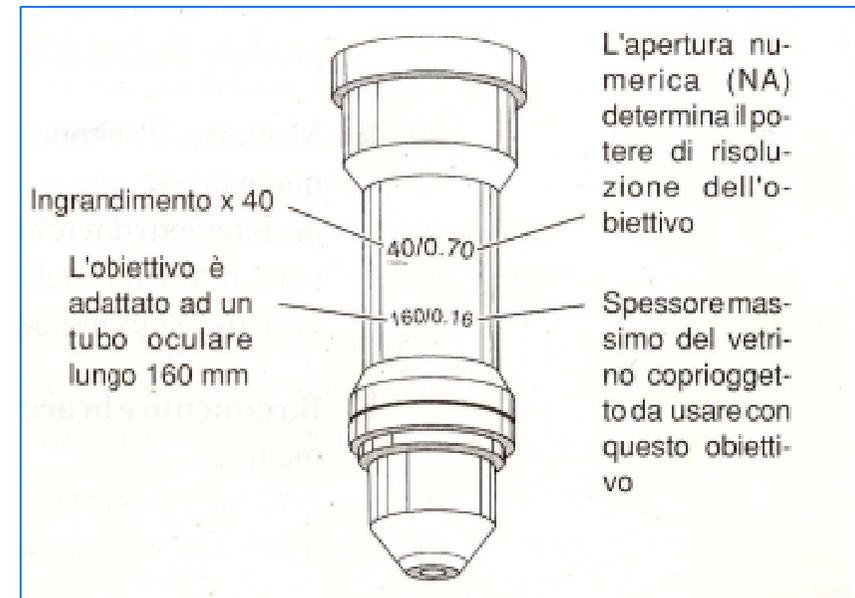
Maggiore è N.A. minore è la distanza di lavoro

RISOLUZIONE

$$R = 0,61 \lambda / N.A.$$



Obiettivo	NA	Limite di risoluzione in micrometri
4x (lente a scansione)	0,07	3,93
10x (lente a basso ingrandimento)	0,25	1,1
40x (lente ad elevato potere di ingrandimento)	0,65	0,43
100x (lente ad immersione)	1,25	0,25



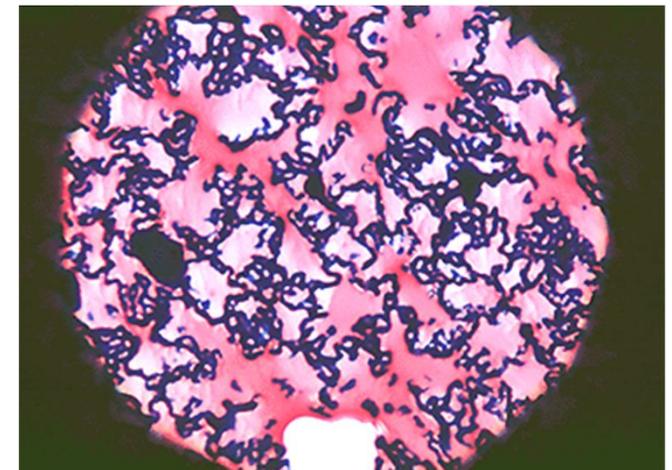
LIMITI DEL MICROSCOPIO OTTICO

I LIMITI SULLA RISOLUZIONE DI UN MICROSCOPIO OTTICO SONO LEGATI ALLA **LUNGHEZZA D'ONDA DELLA LUCE INCIDENTE** (VISIBILE).

INFATTI PER LA LUCE VISIBILE IL VALORE MEDIO DELLA LUNGHEZZA D'ONDA È DI CIRCA 500 nm (LUNGHEZZA D'ONDA COMPRESA TRA 400 E 700 nm CIRCA).

RISOLUZIONE MICROSCOPIO OTTICO: 0.25 μm .

LA CAPACITÀ DI RISOLUZIONE È LIMITATA, A SUA VOLTA DAL FENOMENO DELLA **DIFFRAZIONE**.



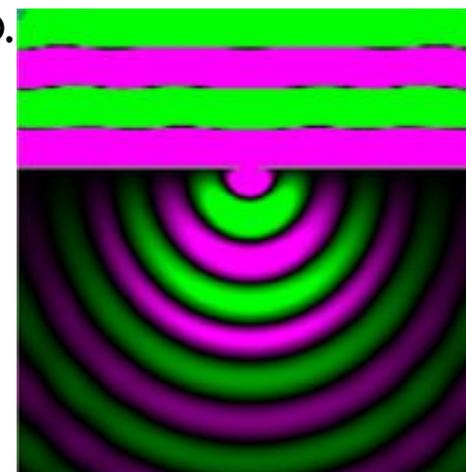
DIFFRAZIONE

QUANDO LA DISTANZA d TRA DUE PUNTI DI UN CAMPIONE DIVENTA CONFRONTABILE CON LA LUNGHEZZA D'ONDA λ DELLA LUCE CHE LO ILLUMINA, SUBENTRANO **EFFETTI DI DIFFRAZIONE**.

LA DIFFRAZIONE È UN FENOMENO FISICO CHE SI OTTIENE QUANDO ONDE INCONTRANO OGGETTI SUL LORO CAMMINO, ASSOCIATO ANCHE AL MEZZO NEL QUALE TALI ONDE SI PROPAGANO, E INVECE DI PROPAGARSI LINEARMENTE TENDONO A **DIVERGERE**.

QUESTO FENOMENO È **TIPICO DI OGNI GENERE DI ONDA**, COME IL SUONO, LE ONDE SULLA SUPERFICIE DELL'ACQUA O LE ONDE ELETTROMAGNETICHE COME LA LUCE O LE ONDE RADIO. GLI EFFETTI DELLA DIFFRAZIONE SONO PERÒ RILEVANTI SOLO SE UN'ONDA INCONTRA UN OSTACOLO LE CUI DIMENSIONI SONO COMPARABILI O MINORI RISPETTO ALLA PROPRIA LUNGHEZZA D'ONDA.

QUANDO CIÒ ACCADE, LE DUE IMMAGINI NON POSSONO ESSERE PIÙ ESSERE VISTE COME DUE IMMAGINI SEPARATE CIOÈ NON SONO PIÙ RISOLVIBILI (ESEMPIO DEI FARI DELL'AUTOMOBILE.)



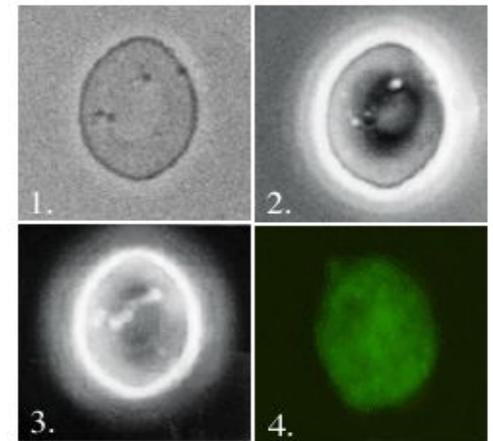
TIPI DI MICROSCOPI OTTICI

- **A CAMPO CHIARO:** IL CONTRASTO È OTTENUTO IN PRESENZA DI VARIAZIONI SIGNIFICATIVE DI **ASSORBIMENTO E RIFLESSIONE DELLA SUPERFICIE**.

A LUCE RIFLESSA: L'ILLUMINAZIONE IN QUESTO CASO È FRONTALE O LATERALE.

- **A CAMPO SCURO:** IL CAMPO SCURO DESCRIVE UNA TECNICA DI ILLUMINAZIONE UTILIZZATO PER MIGLIORARE IL CONTRASTO IN CAMPIONI NON COLORATI. FUNZIONA ILLUMINANDO IL CAMPIONE CON LUCE CHE NON SARÀ RACCOLTA DALLALENTE DELL'OBIETTIVO, E QUINDI NON FARÀ PARTE DELL'IMMAGINE. QUESTO PRODUCE IL CLASSICO ASPETTO DI **CAMPIONE CHIARO SU UNO SFONDO SCURO**, QUASI NERO, CON OGGETTI LUMINOSI SU DI ESSO.

A LUCE TRASMESSA: UTILIZZA LUCE TRASMESSA ATTRAVERSO IL CAMPIONE, PROVENIENTE DA UNA PICCOLA LAMPADINA INCORPORATA O INDIRIZZATA TRAMITE UNO SPECCHIO DA UNA SORGENTE ESTERNA. (DA SOTTO)



1. Campo chiaro
2. Contrasto di fase
3. Campo scuro
4. Fluorescenza

TIPI DI MICROSCOPI OTTICI

- **A CONTRASTO DI FASE:** È UN TIPO PARTICOLARE DI MICROSCOPIO CHE SI BASA SUL FENOMENO DELL'**INTERFERENZA LUMINOSA**.

IL PREPARATO VIENE ILLUMINATO DA UN FASCIO LUMINOSO SUDDIVISO IN DUE PORZIONI DI FASE DIFFERENTE E CON DIVERSO ANGOLO DI INCIDENZA.

IL CAMBIAMENTO ULTERIORE DI FASE DOVUTO ALLA PORZIONE DI LUCE CHE ATTRAVERSA IL CAMPIONE, ANDANDOSI A RICOMBINARE CON LA LUCE NON RIFRATTA RENDERÀ VISIBILI COMPONENTI TRASPARENTI MA DI INDICE DI RIFRAZIONE DIFFERENTE DA QUELLO DEL MEZZO (LUCE TRASMESSA).

MICROSCOPIO CONFOCALE

METODO CONFOCALE

IL SISTEMA CONSISTE DI UNA **SORGENTE DI LUCE FOCALIZZATA**, PER ESEMPIO UN LASER, CHE ILLUMINA L'OGGETTO ATTRAVERSO UN **BEAM SPLITTER**.

LA LUCE RIFLESSA VIENE RILEVATA DA UN FOTO-RIVELATORE. LA POSIZIONE DEL PUNTO ILLUMINATO VIENE QUINDI STIMATA AGGIUSTANDO LA POSIZIONE DELLA SORGENTE, IN MODO TALE DA **METTERE A FUOCO L'IMMAGINE DEL PUNTO ILLUMINATO**.

LA MICROSCOPIA CONFOCALE USA, PER ECCITARE LE MOLECOLE, UNA **SORGENTE LUMINOSA MOLTO INTENSA**, COME IL LASER.

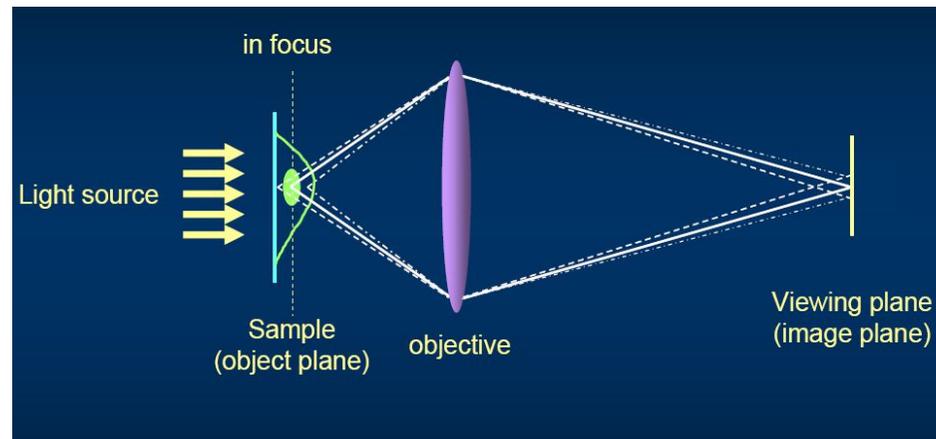
UN SISTEMA DI TOPOGRAFIA CONFOCALE CROMATICA HA TIPICAMENTE UNA DISTANZA DI LAVORO DI 6,5 mm, UNA RISOLUZIONE NELLA MISURA DELLA DISTANZA DI 20 nm SU UN INTERVALLO MASSIMO DI MISURA DI 0,9 mm E UNA IN DIREZIONE LATERALE DI 2 μm .

MICROSCOPIA CONFOCALE

LA MICROSCOPIA CONFOCALE È UNA TECNICA OTTICA PRINCIPALMENTE UTILIZZATA PER LO **STUDIO TRIDIMENSIONALE DI STRUTTURE BIOLOGICHE (SEZIONAMENTO OTTICO)**.

SI OTTIENE UNA SERIE DI IMMAGINI DI PIANI PARALLELI, **SPOSTANDO IL FUOCO DELL'OBIETTIVO LUNGO L'ASSE DI PROPAGAZIONE DELLA LUCE**. ANCHE I PIANI SOVRASTANTI E SOTTOSTANTI EMETTONO LUCE, VI È UNA PERDITA DI NITIDEZZA DELL'IMMAGINE.

RIENTRA NELLE TECNICHE MICROSCOPICHE DI ANALISI DELLE SUPERFICI CHE FANNO PARTE DELLA PROSSIMA LEZIONE.

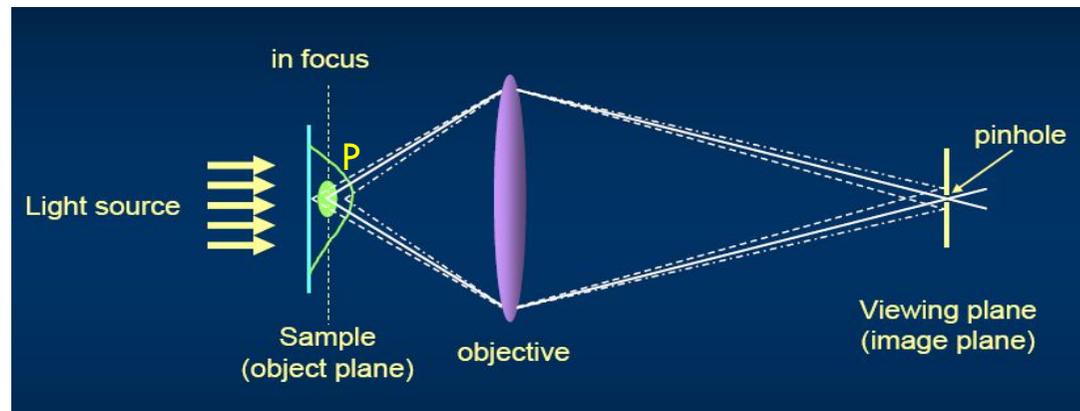


Microscopio a campo largo

MICROSCOPIA CONFOCALE

RIMOZIONE DELLE INTERFERENZE PROVENIENTI DAI PIANI ADIACENTI A QUELLO OVE SI È FOCALIZZATI, MEDIANTE L'USO DEL PINHOLE.

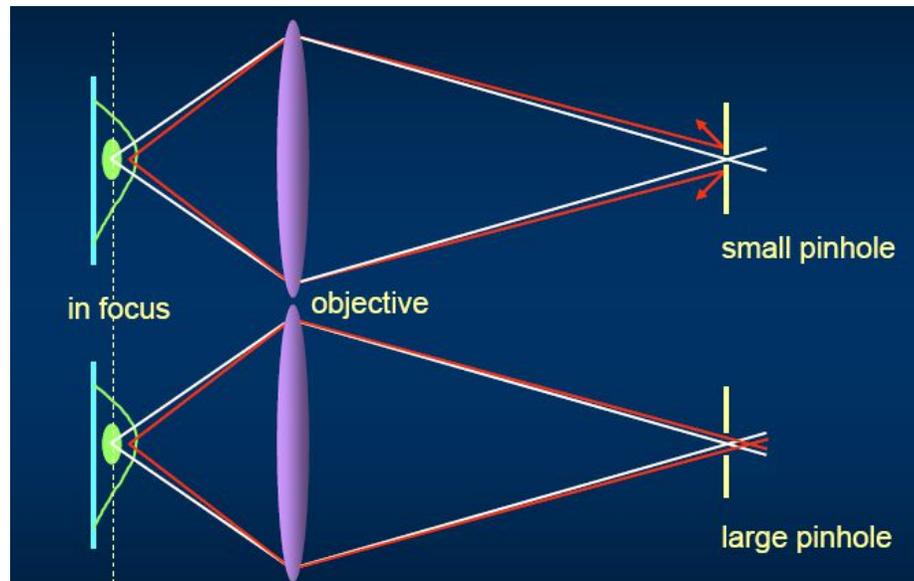
TRA LO SPECCHIO DICROICO ED IL FOTOMOLTIPLICATORE, IL FASCIO LUMINOSO ATTRAVERSA UN DIAFRAMMA, O PINHOLE, CHE IMPEDISCE ALLA LUCE PROVENIENTE DALLE ZONE FUORI FUOCO DI RAGGIUNGERE IL FOTOMOLTIPLICATORE. IN QUESTO MODO SOLO IL SEGNALE LUMINOSO RELATIVO AL PIANO DI FUOCO VIENE REGISTRATO E UTILIZZATO NELLA FORMAZIONE DELL'IMMAGINE FINALE. IL RISULTATO È UN'IMMAGINE POCO DISTURBATA DALLA DIFFUSIONE DELLA LUCE DELLE ZONE NON A FUOCO.



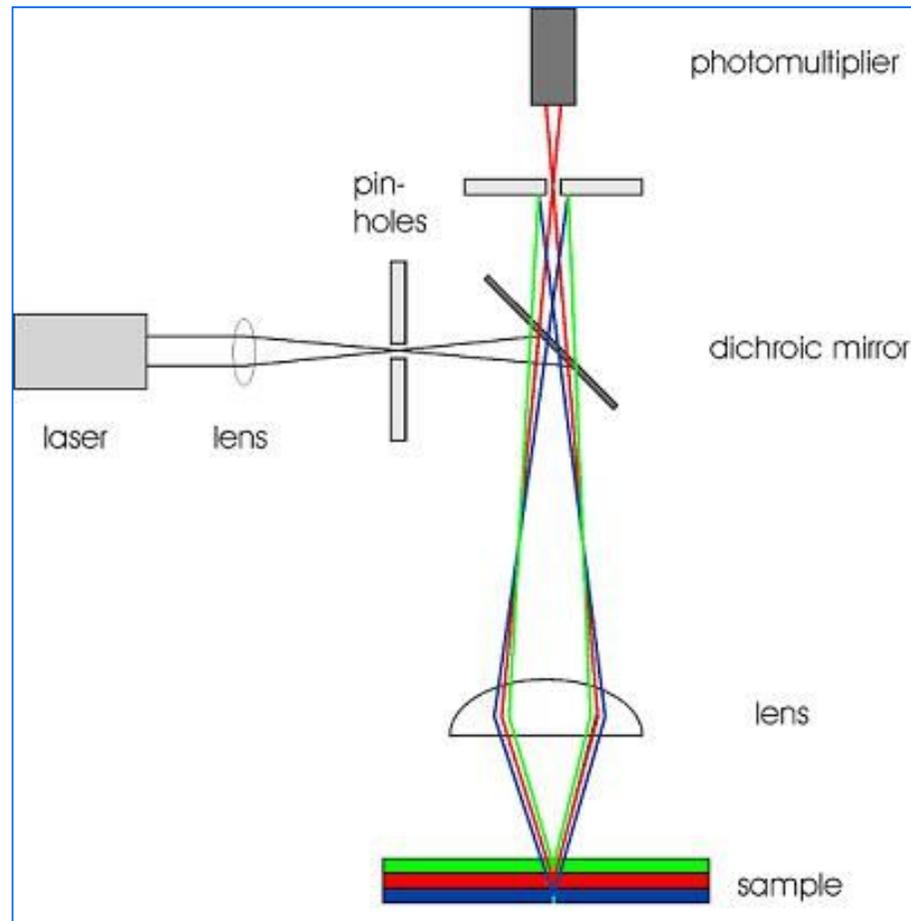
MICROSCOPIO CONFOCALE A SCANSIONE LASER

LE DIMENSIONI DEL PIN-HOLE DETERMINANO LA:

- DISCRIMINAZIONE TRA FOTONI PROVENIENTI DA I VARI PIANI FUORI FUOCO CONTRIBUENDO COSÌ IN MODO DETERMINANTE ALLA QUALITÀ DELL'IMMAGINE
- POSSIBILITÀ DEL SEZIONAMENTO OTTICO



MICROSCOPIO CONFOCALE A SCANSIONE LASER



SCHEMA DEL MICROSCOPIO CONFOCALE A SCANSIONE LASER

- LA SORGENTE LUMINOSA È COSTITUITA DA UNA **SORGENTE LASER** DI LUNGHEZZA D'ONDA OPPORTUNA
- L'OBIETTIVO FOCALIZZA IL LASER E ALLO STESSO TEMPO RACCOGLIE LA LUMINESCENZA EMESSA DAL CAMPIONE (STESSA APERTURA NUMERICA)
- UN SISTEMA DI SPECCHI GALVANOMETRICI REALIZZA LA SCANSIONE DEL SINGOLO PIANO DEL CAMPIONE
- UN SISTEMA DI MOVIMENTAZIONE SULL'ASSE Z PERMETTE IL SEZIONAMENTO OTTICO

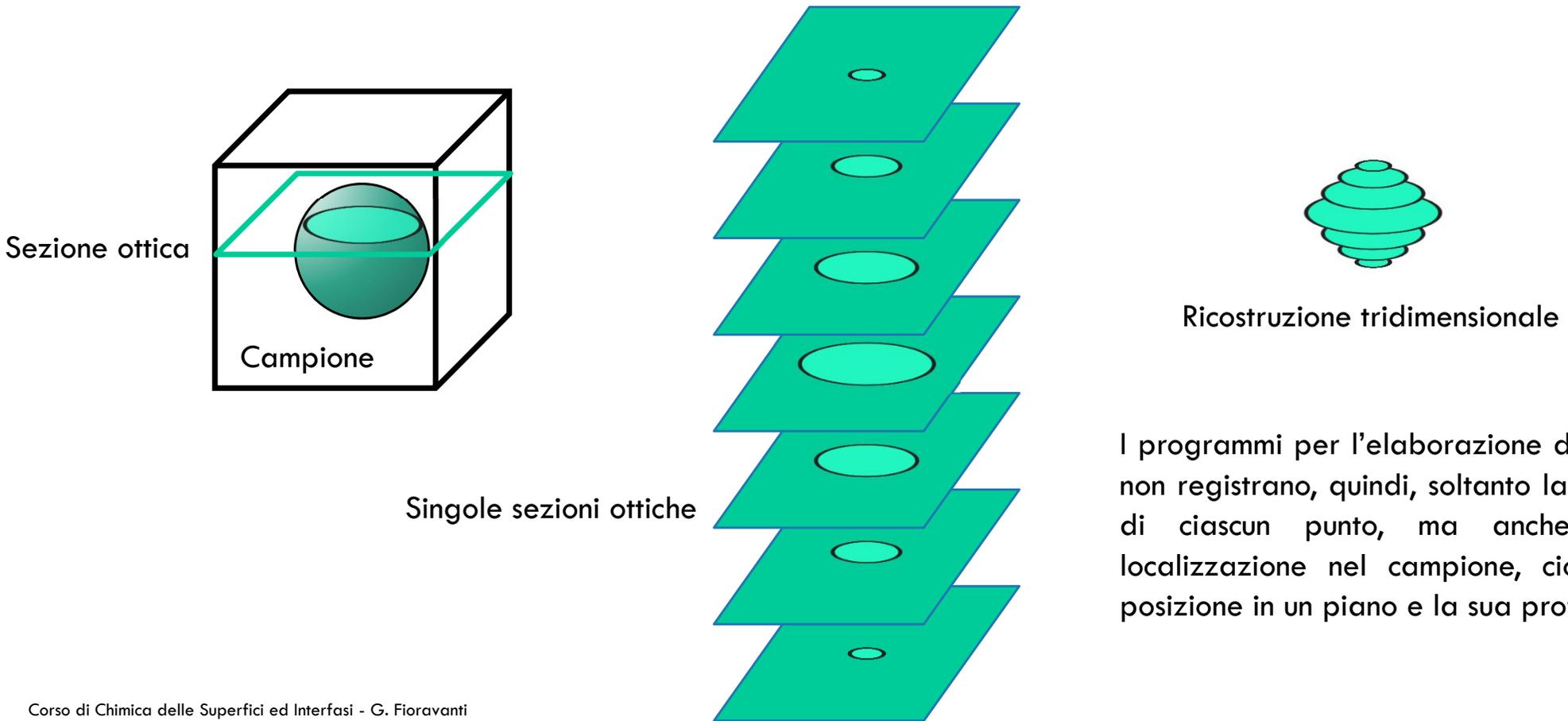
MICROSCOPIO CONFOCALE A SCANSIONE LASER

OLTRE AL PINHOLE PER LA LUCE EMESSA, VIENE UTILIZZATO ANCHE UN **PINHOLE PER LA LUCE DI ECCITAMENTO**, IN MODO DA ILLUMINARE SOLO UNA PORZIONE MICROSCOPICA DEL CAMPIONE, AUMENTANDO IL CONTRASTO.

SPOSTANDO LUNGO L'ASSE VERTICALE IL CAMPIONE DOPO OGNI SCANSIONE, È POSSIBILE ESEGUIRE UNA SERIE DI SCANSIONI SUCCESSIVE CORRISPONDENTI AI PIANI FOCALI VIA VIA PIÙ PROFONDI ALL'INTERNO DEL CAMPIONE.

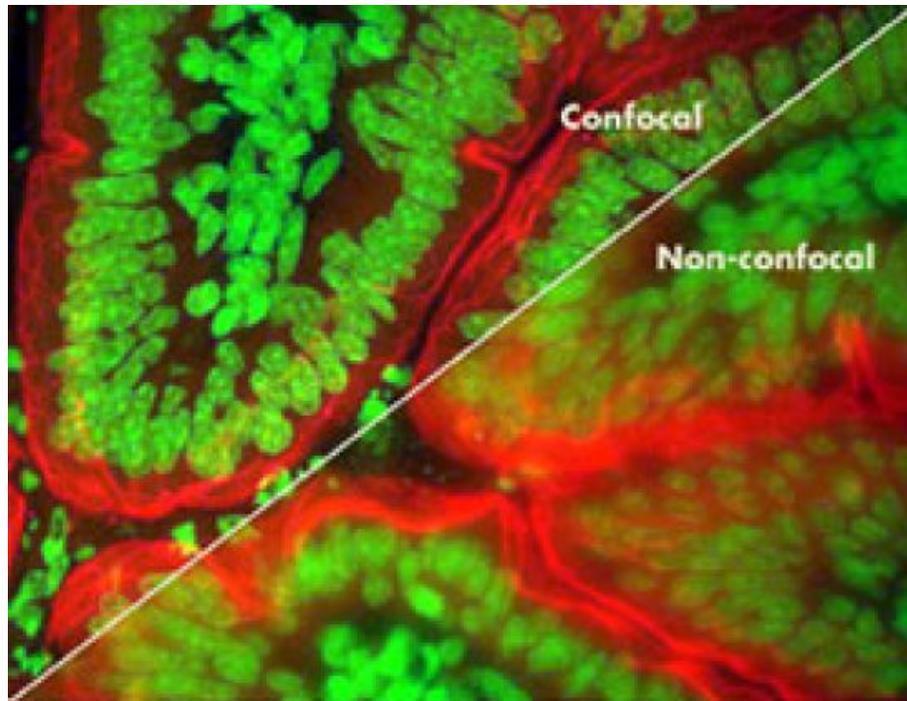
QUESTE SCANSIONI PRENDONO IL NOME DI **SEZIONI OTTICHE** E LA LORO SOVRAPPOSIZIONE ORDINATA, ESEGUITA VIA SOFTWARE, CONSENTE DI RICOSTRUIRE UN'IMMAGINE COMPLESSIVA DELL'INTERO VOLUME SCANDITO, IN CUI TUTTI I PIANI SONO CONTEMPORANEAMENTE A FUOCO.

MICROSCOPIA CONFOCALE



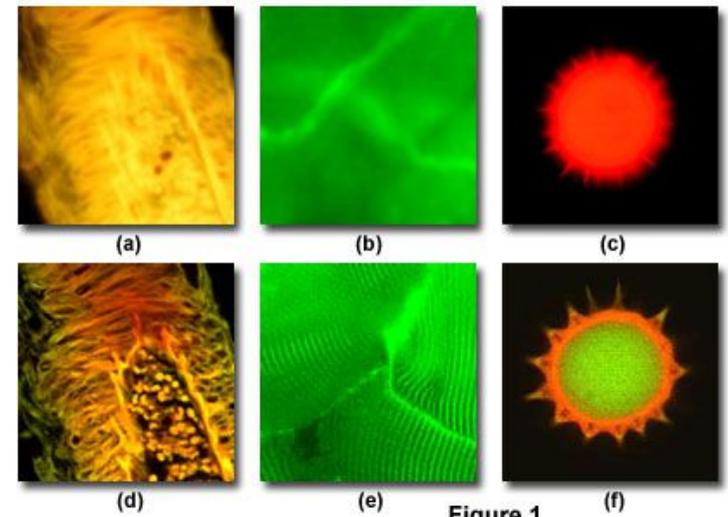
MICROSCOPIO CONFOCALE A SCANSIONE LASER

CONFRONTO TRA MICROSCOPIO CONFOCALE A SCANSIONE LASER E MICROSCOPIO A FLUORESCENZA A CAMPO LARGO.



Intestino di Ratto

Confocal and Widefield Fluorescence Microscopy



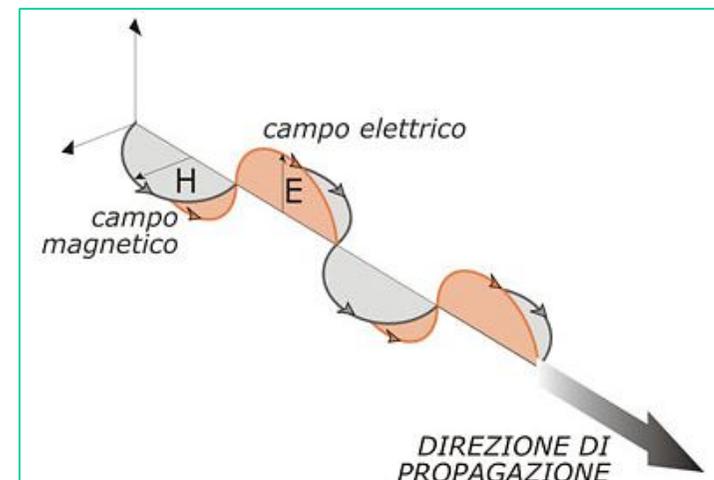
MICROSCOPIO A BIRIFRANGENZA

MICROSCOPIO POLARIZZATORE: BIRIFRANGENZA

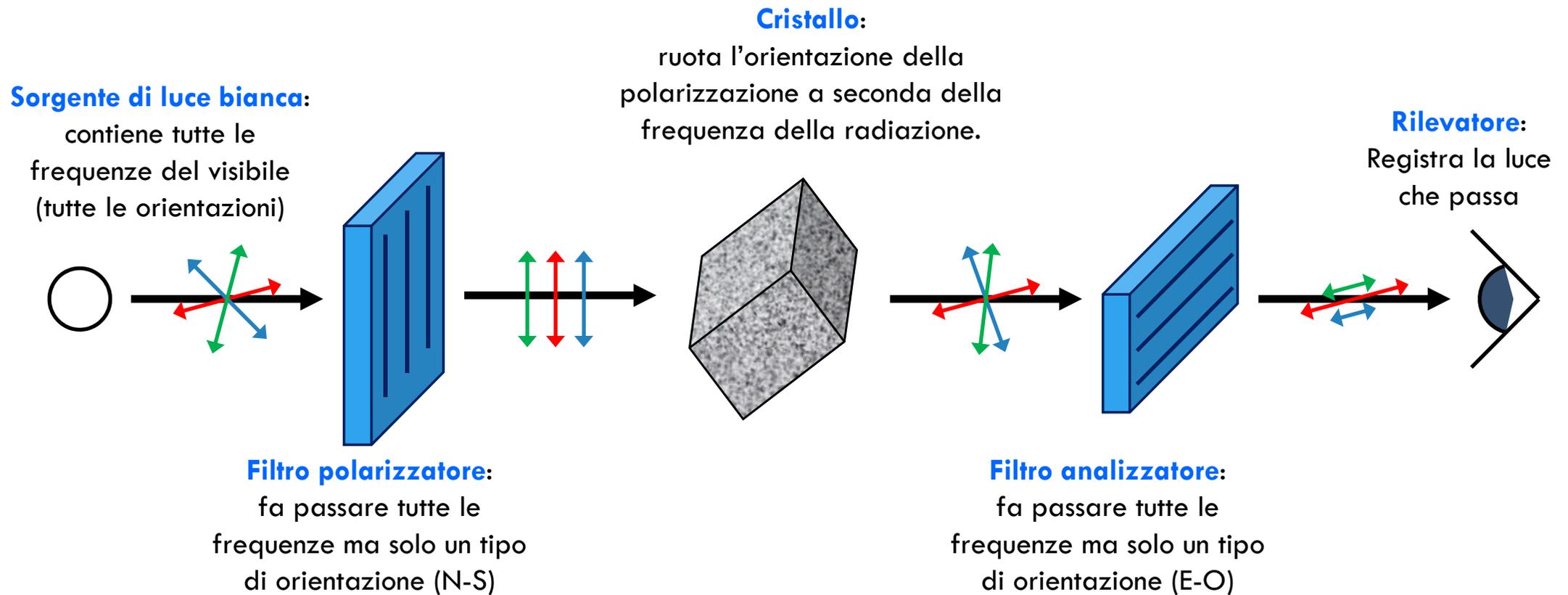
LA **BIRIFRANGENZA** È UN FENOMENO FISICO CHE CONSISTE NELLA SCOMPOSIZIONE DI UN RAGGIO DI LUCE IN **DUE RAGGI** E CHE AVVIENE QUANDO ESSO ATTRAVERSA PARTICOLARI **MEZZI ANISOTROPI**, A SECONDA DELLA **POLARIZZAZIONE DELLA LUCE**.

UN MATERIALE BIRIFRANGENTE, A CAUSA DELLA SUA STRUTTURA CRISTALLINA, PRESENTA **INDICI DI RIFRAZIONE DIFFERENTI NELLE DIVERSE DIREZIONI DI PROPAGAZIONE DEI RAGGI LUMINOSI** E DELLA DIREZIONE DI VIBRAZIONE DEL CAMPO ELETTRICO.

Nota: La radiazione elettromagnetica (luce) che si propaga nello spazio, è composta da due campi vettoriali: il campo elettrico e il campo magnetico B , perpendicolari fra loro e perpendicolari alla direzione di propagazione dell'onda.

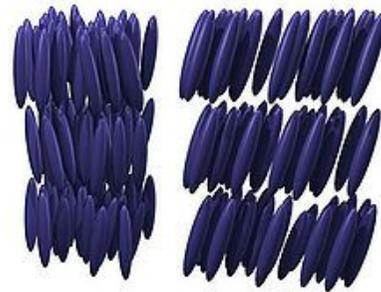
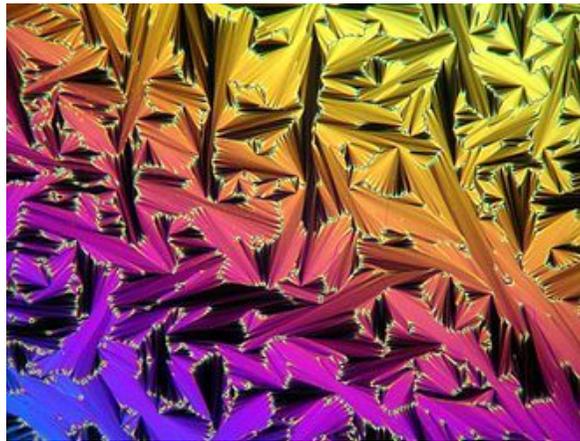


MICROSCOPIO POLARIZZATORE: BIRIFRANGENZA



BIRIFRANGENZA

IL CRISTALLO DI **CALCITE** È APPOGGIATO SU UN FOGLIO BIANCO CHE PORTA STAMPATA LA PAROLA CALCITE; LA SCRITTA RISULTA DOPPIA, SFALSATA IN VERTICALE, ED È CONSEGUENZA DELLA BIRIFRANGENZA.

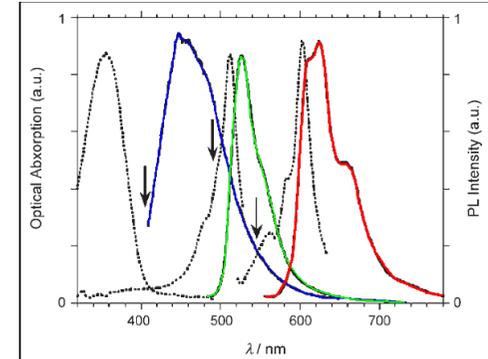


Birifrangenza cristalli liquidi smectici



MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

MICROSCOPIO A FLUORESCENZA



IL **MICROSCOPIO A FLUORESCENZA** SI UTILIZZA CON DEI CAMPIONI TRATTATI IN MODO DA ESSERE IN GRADO DI EMETTERE LUCE DI UNA SPECIFICA LUNGHEZZA D'ONDA (QUINDI DI UN UNICO COLORE) QUANDO **ECCITATI CON LUCE DI UNA LUNGHEZZA D'ONDA INFERIORE** (MA FREQUENZA SUPERIORE).

IL FENOMENO DI EMISSIONE SI VERIFICA SE NELLA CELLULA SONO PRESENTI DELLE SOSTANZE FLUORESCENTI OPPURE SE IL CAMPIONE VIENE TRATTATO CON COMPOSTI FLUORESCENTI IN GRADO DI EMETTERE LUCE UNA VOLTA ECCITATI (FLUOROCROMI).

SI UTILIZZA UNA **SORGENTE DI LUCE UV**.

FLUORESCENZA: FENOMENO DI EMISSIONE DI LUCE A LUNGHEZZA D'ONDA λ MAGGIORE (ν' MINORE).



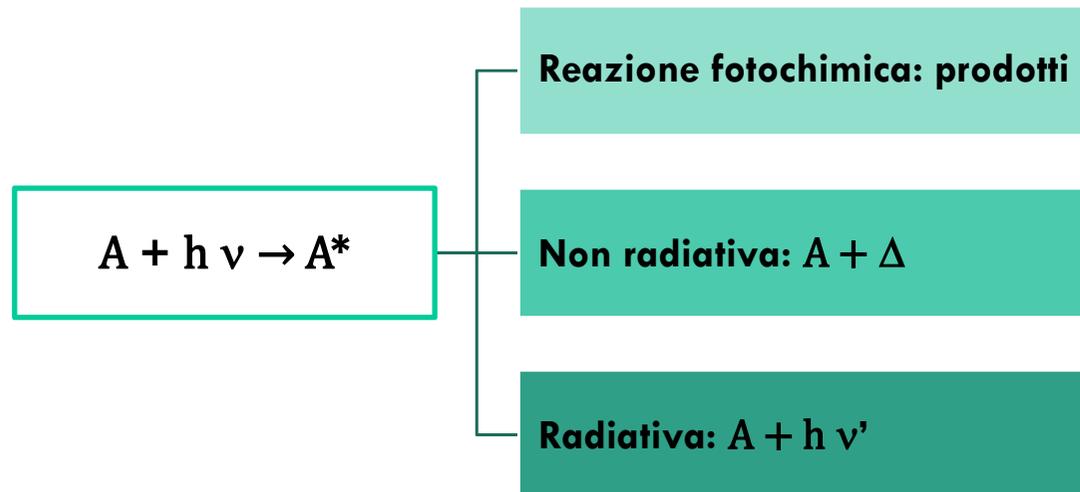
FOTOCHIMICA



Eccitazione chimica: CHEMILUMINESCENZA

LA **FOTOCHIMICA** È LA SCIENZA CHE STUDIA GLI EFFETTI DELLA LUCE (FOTONI) SULLA MATERIA.

L'INTERAZIONE DELLA RADIAZIONE ELETTROMAGNETICA (UV-VIS) CON LA MATERIA PORTA ALLA FORMAZIONE DI UNA **SPECIE ECCITATA** (AD ENERGIA MAGGIORE DELLO STATO FONDAMENTALE) CHE POI PUÒ SEGUIRE DIVERSI PROCESSI DISSIPATIVI, IN COMPETIZIONE TRA LORO.



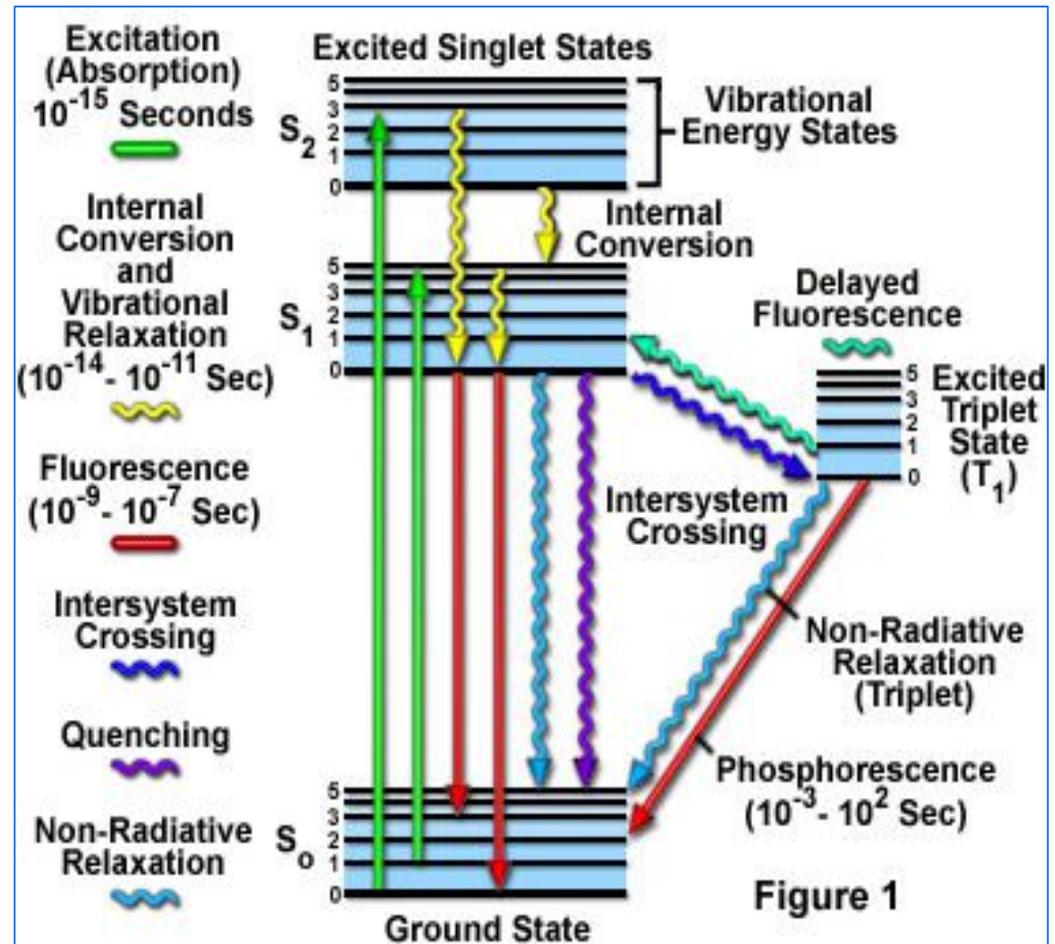
LUMINESCENZA:
fluorescenza o
fosforescenza.

DIAGRAMMA DI JABLONSKI

IL **DIAGRAMMA DI JABLONSKI** RIASSUME LE TRASFORMAZIONI ENERGETICHE CHE SI VERIFICANO PER ASSORBIMENTO DI UNA RADIAZIONE.

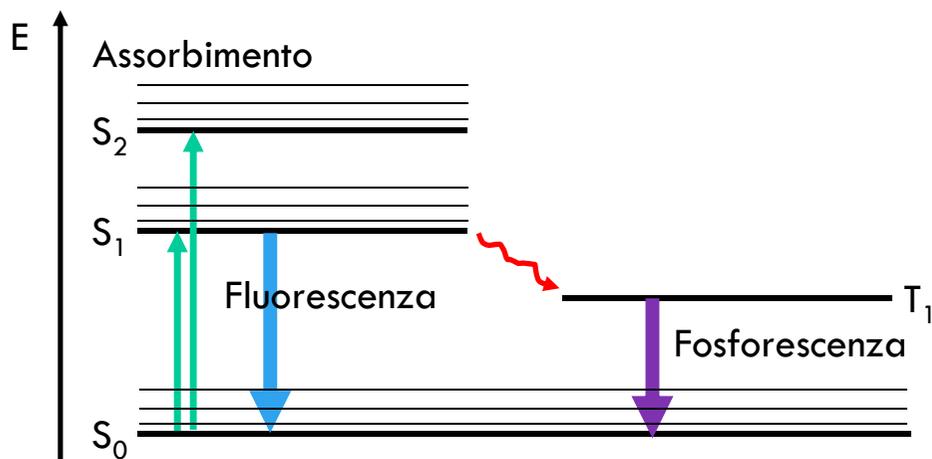
LO STUDIO DEI PROCESSI DEGLI STATI FOTOECCITATI RICHIEDE LO STUDIO DEGLI STATI ECCITATI DAL PUNTO DI VISTA **QUANTOMECCANICO**.

- **SINGOLETTO: SPIN ANTIPARALLELO**
- **TRIPLETTO: SPIN PARALLELO**



FLUORESCENZA E FOSFORESCENZA

SOLO GLI STATI S_1 E T_1 VIVONO ABBASTANZA A LUNGO PER POTER DARE LUOGO A FENOMENI DI LUMINESCENZA (O A REAZIONI FOTOCHIMICHE).



IL TERMINE **FLUORESCENZA** SIGNIFICA EMISSIONE DI ENERGIA RADIANTE DURANTE UNA TRANSIZIONE **DALLO STATO PIÙ BASSO DI SINGOLETTO S_1 ALLO STATO FONDAMENTALE DI SINGOLETTO S_0 .**

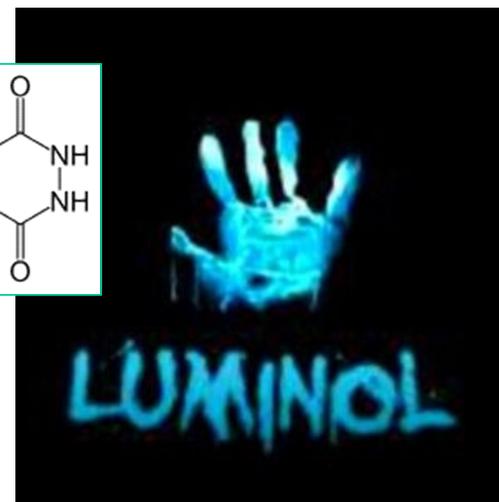
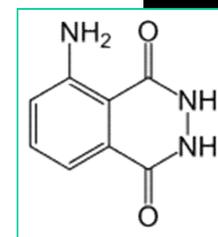
LA **FOSFORESCENZA** DI MOLECOLE ORGANICHE IMPLICA L'EMISSIONE DURANTE UNA TRANSIZIONE DELLO STATO ECCITATO PIÙ BASSO DI **TRIPLETTO T_1 ALLO STATO FONDAMENTALE DI SINGOLETTO S_0 .**

FLUORESCENZA E FOSFORESCENZA

OGNI PROCESSO DI DECADIMENTO HA UN SUO TEMPO CARATTERISTICO:

- **FLUORESCENZA: 10^{-6} - 10^{-9} s.** LA FLUORESCENZA È UN FENOMENO **VELOCE ED INTENSO, CHE CESSA NEL MOMENTO IN CUI ALLONTANO LA SORGENTE LUMINOSA.**
- **FOSFORESCENZA: 10^{-2} - 10^2 s.** LA FOSFORESCENZA È UN PROCESSO PIÙ DIFFICILE DA OSSERVARE (PROIBITO DALLE REGOLE DI SELEZIONE), MA **PERDURA ANCHE DOPO LA CESSAZIONE DELLO STIMOLO LUMINOSO.**

Esempio **CHEMILUMINESCENZA:** Il **LUMINOLO**, (nome IUPAC 5-ammino-2,3-diidro-1,4-ftalazindione) è un composto chimico utilizzato dalla Polizia Scientifica per rilevare tracce di sangue. Nella ricerca forense del sangue il Luminol vien attivato con un ossidante (ossigeno dall'acqua ossigenata) usando come catalizzatore il ferro presente nell'emoglobina.

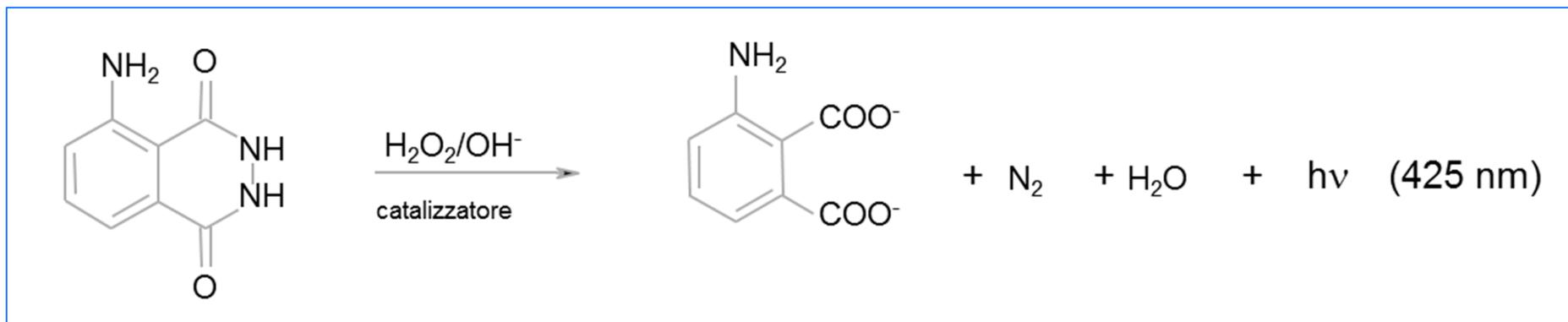


LUMINOLO

LA REAZIONE DI OSSIDAZIONE VIENE EFFETTUATA IN AMBIENTE ALCALINO CON H_2O_2 ED IN PRESENZA DI CATALIZZATORE (FERRICIANURO, IONI METALLICI ECC).

IL PRODOTTO DI REAZIONE È LO **IONE FTALATO** RESPONSABILE DELL'EMMISSIONE LUMINOSA.

L'EFFICIENZA QUANTICA DEL LUMINOLO È CIRCA 1% CON RIVELABILITÀ INTORNO A 10^{-16} MOLI.



FLUORESCENZA

SONO FLUORESCENTI LE MOLECOLE CON **SISTEMI AD ELEVATA CONIUGAZIONE**

- STRUTTURE CON MOLTI ELETTRONI π CONIUGATI
- STRUTTURE PLANARI CON ANELLI AROMATICI

L'INTENSITÀ DI FLUORESCENZA DIPENDE DA:

- CONCENTRAZIONE DI FLUOROFORO
- EFFICIENZA DELL'ASSORBIMENTO DI RADIAZIONE (ϵ)
- EFFICIENZA DELL'EMISSIONE RADIATIVA (RESA QUANTICA, Φ)



Figura : particolare di un dipinto del seicento in luce visibile



Figura : lo stesso particolare ripreso in fluorescenza ultravioletta

$$\Phi = \text{resa quantica} = \frac{\text{fotoni emessi}}{\text{fotoni assorbiti}}$$

FLUORESCENZA

UTILE PER ESALTARE E RENDERE PIÙ LEGGIBILI SCRITTE SBIADITE DAL TEMPO SU DOCUMENTI E MANOSCRITTI ANTICHI.

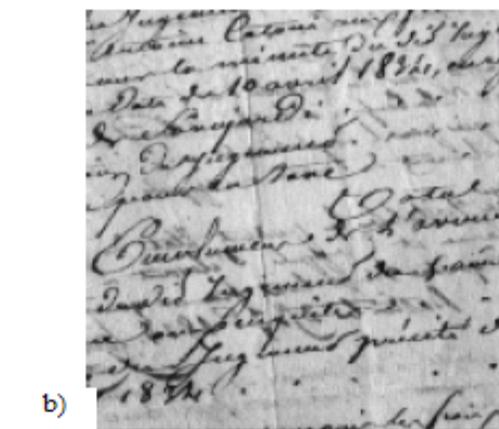
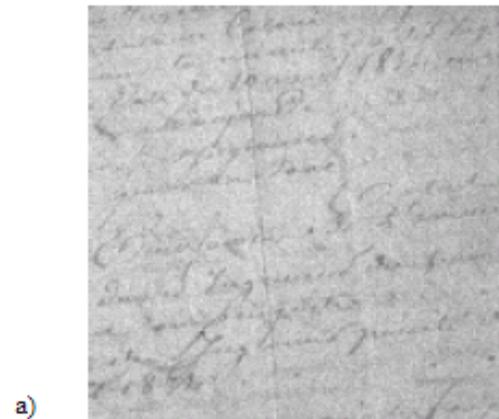


Figura : ripresa in luce visibile (a) e in fluorescenza UV (b) di una scritta su un antico documento. L'inchiostro ormai sbiadito è penetrato all'interno della carta e viene messo in risalto dalla fluorescenza della carta stessa

SISTEMI FLUORESCENTI

CdSe **QUANTUM DOTS**:

- DIMENSIONI DI 5-10 nm
- TUNABILITÀ DELLA EMISSIONE ATTRAVERSO IL CONTROLLO DELLA DIMENSIONE DEL DOT
- ALTO RENDIMENTO QUANTICO
- ELEVATE SEZIONI D'URTO PER ASSORBIMENTO ($\sigma = 10^{-15} \text{ cm}^{-2}$)

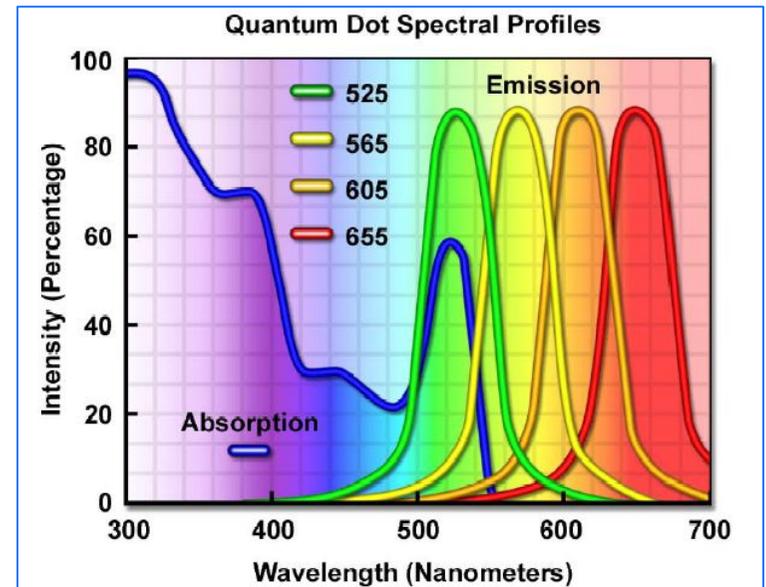
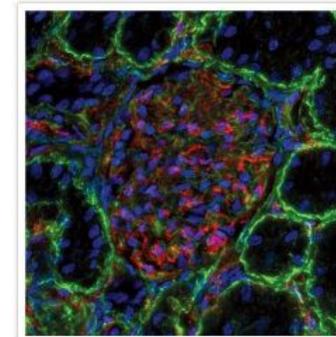
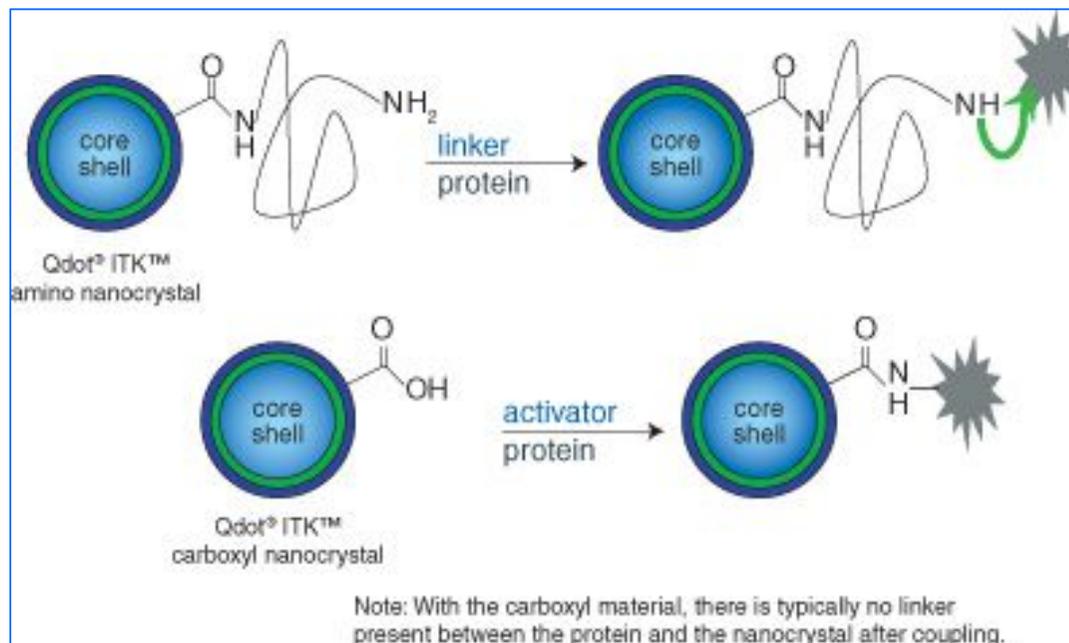


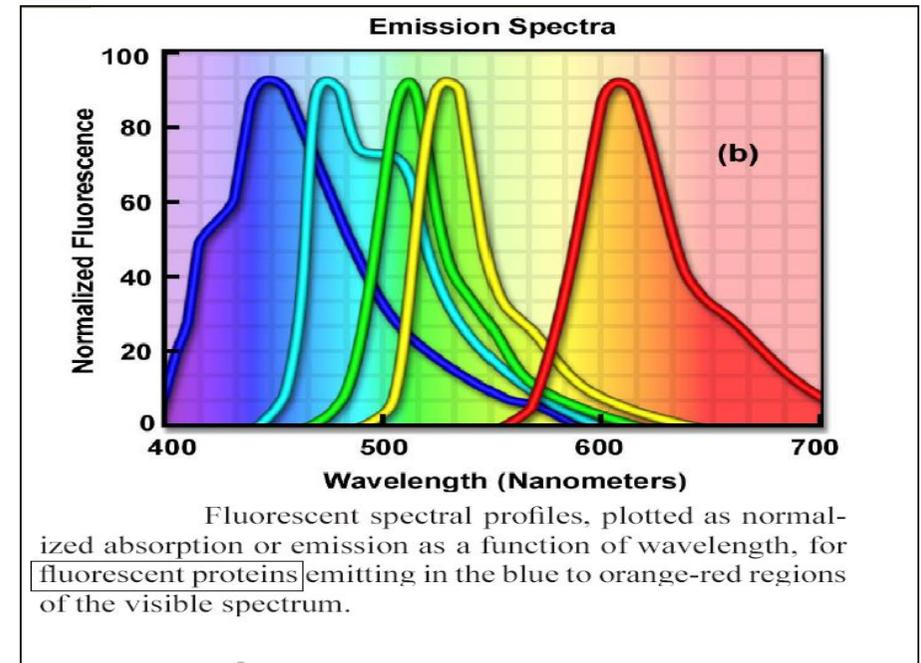
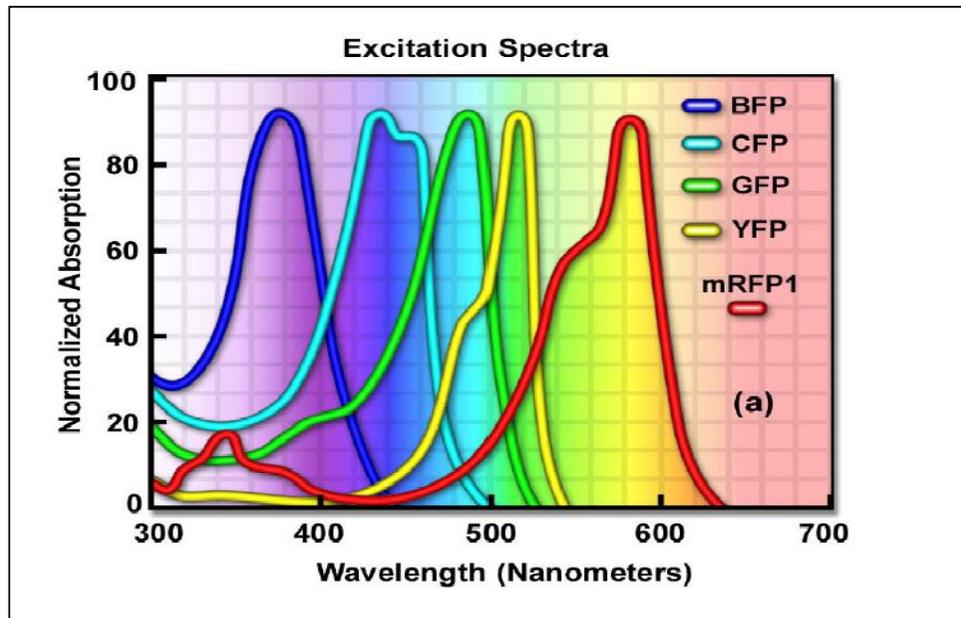
Figure 15. Anatomy and spectral profiles of quantum dot conjugates. The cadmium selenide core is encapsulated with zinc sulfide, and then a polymer coating is applied followed by a hydrophilic exterior to which the biological conjugate is attached (left). The absorption profile displays a shoulder at 400 nanometers, while the emission spectra all feature similar symmetrical profiles.

APPLICAZIONI QUANTUM DOTS

MARCATORI OTTICI IN BIOLOGIA (NANOPARTICELLE BIOLOGICAMENTE ATTIVE DI 10-15 nm)



PROTEINE FLUORESCENTI



Prodotti naturali (**GFP= Green Fluorescent Protein**)

Lo studio dell'evoluzione di proteine in ambiente acquoso è reso possibile dalla fusione con una proteina fluorescente verde (GFP) estratta da una medusa