

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TITOLO DELL'ELABORATO

Misura delle proprietà meccaniche su scala nanometrica tramite
microscopia a forza atomica

Elaborato in

Biomateriali

Relatore

Giovanni Valdrè

Presentato da

Francesco Giunchi

Anno Accademico 2015/2016

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
2. MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA (AFM).....	5
2.1 Introduzione al microscopio AFM	5
2.2 Principio di funzionamento	5
2.3 Sistema di rilevamento deflessioni	7
2.4 Lo scanner	8
2.5 Il cantilever.....	9
2.6 Protezione dalle influenze esterne	9
2.7 Curva di forza di un cantilever	10
2.8 Modalità di scansione	11
2.9 Immagini AFM.....	13
2.10 Pro e contro delle analisi AFM.....	14
3. NANO-INDENTAZIONE	15
3.1 Microscopio AFM come nano-indentatore.....	15
3.2 Automatizzazione dell'elaborazione dati AFM.....	17
4. MODELLI MECCANICI DI CONTATTO	20
4.1 Modello di Hertz	20
4.2 Modello Derjaguin-Muller-Toporov	22
4.3 Modello Johnson-Kendall-Roberts.....	22
4.4 Modello Maugis-Dugdale.....	24
5. SVILUPPO SCRIPT SPERIMENTALI.....	25
5.1 Script per l'analisi puntuale delle proprietà nanomeccaniche	26
5.2 Script per l'imaging delle proprietà nanomeccaniche	29
6. MATERIALI E METODI	30
6.1 Setup strumentale	30
6.2 Campione	31
6.3 Calibrazione dello strumento.....	31
6.4 Misure sperimentali	32
7. RISULTATI E DISCUSSIONE	32
7.1 Imaging nanomeccanico di clorite + DNA.....	32
7.2 Misura puntuale sullo strato TOT della clorite.....	40
7.3 Misura puntuale sullo strato di tipo brucitico della clorite	42
7.4 Misura puntuale su DNA adsorbito sullo strato di tipo brucitico.....	45
7.5 Misura puntuale su DNA.....	47

8. CONCLUSIONI.....	49
9. BIBLIOGRAFIA.....	50

1. INTRODUZIONE

Il microscopio a forza atomica negli ultimi anni è diventato uno strumento fondamentale nelle scienze biomediche, e non solo, grazie alle sue particolari peculiarità, come ad esempio: la capacità di realizzare immagini topografiche in scala nanometrica della superficie del materiale in esame, che mostrano un vero profilo in tre dimensioni del campione, la possibilità di eseguire misure su di un campione lasciandolo nelle sue condizioni ambientali naturali, senza il bisogno di creare il vuoto o di trattare la superficie con particolari accorgimenti e infine l'elevata sensibilità della sonda dello strumento a forze di interazione sonda-campione anche nell'ordine dei pN. Nell'ultima decade però, il microscopio a forza atomica, non solo si è distinto come strumento di indagine topografica, ma sempre più spesso è utilizzato dai ricercatori come nano indentatore per misurare le proprietà meccaniche su scala nanometrica tramite la produzione di curve di forza puntuali, pratica utile soprattutto in campioni particolarmente disomogenei dal punto di vista nanomeccanico come possono essere i tessuti biologici. Un'interessante applicazione della misura delle proprietà meccaniche su scala nanometrica è la realizzazione di imaging che possano caratterizzare la superficie del campione a seconda della proprietà prescelta. Per realizzare un imaging o comunque per ottenere dati sulle proprietà meccaniche di un campione su scala nanometrica, occorre innanzitutto elaborare i dati grezzi forniti dallo strumento, processo che risulta difficile da svolgere manualmente soprattutto quando la mole di dati assume proporzioni considerevoli, in questi casi un approccio automatizzato all'elaborazione dei dati AFM diviene di vitale importanza per utilizzare lo strumento in analisi su larga scala e per limitare gli interventi dell'utente. Il processo di automatizzazione però presenta alcuni ostacoli nella sua realizzazione che spesso ne inficiano la robustezza. Un software che elabora autonomamente un set di curve di forza prodotte da un AFM dovrà gestire ogni eventuale anomalia presente nei dati grezzi come l'effetto del rumore elettronico e del drift termico, dovrà inoltre collocare nella maniera appropriata il contact-point e utilizzare un modello meccanico di

contatto per estrapolare le proprietà di interesse, il tutto in maniera ovviamente autonoma e senza interventi dell'utente sulle singole curve di forza. In questa tesi sono presentati due script sperimentali per l'elaborazione automatizzata dei dati AFM, entrambi realizzati e computati tramite Scilab. Il primo script presentato realizza misure puntuali; dato un set di curve appartenenti allo stesso punto, permette di mettere in relazione l'andamento delle varie proprietà meccaniche di interesse, compreso il modulo di Young, di ogni curva del data set. Il secondo script realizza due tipi di immagine della superficie analizzata: una mostra la variazione del modulo di Young in scala nanometrica, la seconda ricostruisce l'immagine del campione utilizzando la deviazione standard del modulo elastico come parametro.

Nel capitolo 2 viene presentato il microscopio a forza atomica; viene descritto dapprima il principio di funzionamento alla base dello strumento, seguito da una descrizione delle principali componenti, le varie modalità di analisi del campione ed infine i vantaggi e gli svantaggi derivanti dall'utilizzo dello strumento stesso.

All'interno del capitolo 3 è descritta e approfondita la tecnica di nanoindentazione tramite AFM e la conseguente elaborazione automatizzata dei dati.

Nel capitolo 4 trovano spazio i principali modelli meccanici di contatto, fondamentali per le misure delle proprietà meccaniche.

Il capitolo 5 è riservato alla descrizione minuziosa dei due script sviluppati in questo progetto di tesi sperimentale, alle problematiche affrontate nel processo di sviluppo dei software e alla loro risoluzione.

Il capitolo 6 descrive i materiali e i metodi seguiti durante le rilevazioni sperimentali su campioni di clorite.

Nel capitolo 7 viene dato spazio alle misure effettuate, ai risultati ottenuti tramite gli script sperimentali e alle dovute discussioni degli stessi.

Il capitolo 8 è dedicato alle conclusioni a cui si è giunti alla fine di questo progetto di tesi sperimentale.

2. MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA (AFM)

2.1 Introduzione al microscopio AFM

La microscopia a forza atomica (AFM), inventata nel 1986, è una tecnica facente parte della classe delle SPM, cioè delle microscopie a scansione di sonda, in grado di realizzare l'immagine superficiale di un campione utilizzando una sonda (o cantilever) che si muove lungo l'area da analizzare e che permette di rilevare le interazioni fra la superficie del campione e la punta della sonda stessa, in funzione della posizione di quest'ultima. Esistono diversi tipi di SPM suddivisi in base al tipo di interazione sonda-campione che verrà sfruttata per ricostruire la topografia del campione. La risoluzione raggiunta da questa branca della microscopia varia a seconda della tecnica utilizzata, ma in alcuni casi arriva a risoluzioni di livello atomico. Queste risoluzioni si devono soprattutto all'ausilio di attuatori piezoelettrici, che sorreggono il campione, e sono in grado di compiere movimenti lungo gli assi con elevatissima precisione.

2.2 Principio di funzionamento

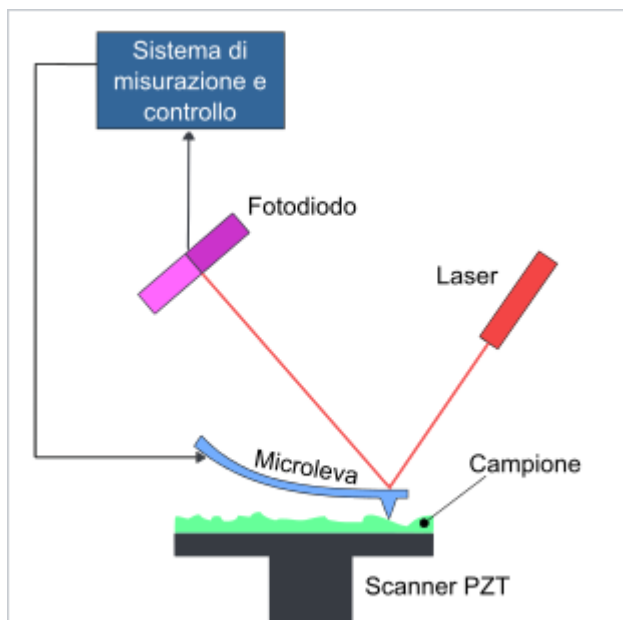


Figura 1: Schema del principio di funzionamento di un microscopio a forza atomica. Credits: wikipedia.org

Il microscopio a forza atomica (AFM) fu inventato nel 1986 da Gerd Binnig, Calvin F. Quate e Christopher Herber ed oltre ad essere un mezzo di indagine, nell'ultima decade ha riscosso successo come strumento di manipolazione della materia su scala nanometrica. Esso, come già menzionato, è composto da una microleva (cantilever), solitamente realizzata in silicio, che può essere posta nelle immediate vicinanze, o a contatto, con la superficie del campione prescelto e ne scandisce riga per riga

l'area selezionata per l'indagine (figura 1). La sonda è in grado di rilevare le forze di

interazione che si vengono a creare, a distanze ravvicinate, fra la punta del cantilever e la superficie del campione stesso. Queste forze producono una deflessione della sonda, che si piegherà in accordo con la legge di Hooke. Le forze di interazione sono solitamente nell'ordine dei nN-pN, e possiedono una componente normale alla superficie del campione ed una laterale. Quando si fa interagire la punta della sonda con la superficie del campione inizialmente e a grandi distanze, si noteranno forze attrattive punta-campione riconosciute appunto come forze di Van der Waals mentre per distanze relativamente più piccole si verranno a creare interazioni di respingimento, dette di repulsione ionica, di entità solitamente maggiore rispetto alle forze di tipo attrattivo. I movimenti della microleva vengono registrati tramite un punto laser, posizionato sull'estremità libera del cantilever e riflesso verso una matrice di fotodiodi (vedi figura 1). Scansionando il materiale con una sonda fisica a distanze così ravvicinate però, si corre il rischio di danneggiare il campione o la sonda, di conseguenza spesso viene utilizzato un meccanismo di retroazione che permette di regolare la distanza fra la sonda e la superficie indagata, mantenendo costante la forza di interazione creatasi fra di esse. Nel momento in cui la punta della sonda appropia la superficie del campione, la variazione della morfologia modifica l'andamento della deflessione della leva, perciò il sistema di feedback in retroazione sposta la sonda lungo l'asse z riportando il valore della deflessione a quello precedentemente stabilito dall'utente, quindi mentre la sonda si sposta lungo gli assi x e y, il segnale inviato al feedback è proporzionale alla distanza dal campione lungo z; questo permette, nella maggior parte dei casi, di utilizzare il segnale in retroazione per ricostruire il profilo e la morfologia del campione, generando un'immagine tridimensionale dell'area scansionata. La sonda scansiona l'area da analizzare muovendosi lungo una linea, e ritorna alla posizione iniziale seguendo lo stesso percorso, dopodiché si sposta alla linea successiva e il processo si ripete fino al completo scansionamento dell'area prescelta. Il segnale di retroazione opportunamente elaborato viene utilizzato per la ricostruzione della topografia e mostrato a video. È bene notare che il campione è posto sulla sommità di un cilindro, costruito in materiale piezoelettrico, che ne permette lo spostamento lungo gli assi con precisione elevata, fondamentale per la riuscita dell'analisi. Tipicamente il microscopio AFM crea un'immagine topografica

dell'area scansionata, che rappresenta il reale profilo tridimensionale del campione, ed essa può avere una dimensione massima indicativamente di $150\mu\text{m} \times 150\mu\text{m}$, ma lo strumento è in grado di lavorare in diverse modalità e quindi è in grado di realizzare tipologie di immagine che danno la possibilità di analizzare altre proprietà oltre che la sola morfologia. Per esempio, nella modalità a contatto intermittente, se viene preso in considerazione il segnale di fase, si possono creare immagini che permettono di discernere le differenti tipologie di materiale presenti sulla superficie, o ancora, se si utilizza la modalità Force-Volume si possono creare mappe che mostrano l'andamento di proprietà meccaniche su scala nanometrica.[5]

2.3 Sistema di rilevamento deflessioni

Per le rilevazioni delle deflessioni della sonda ci si affida ad un diodo laser che emana un fascio in direzione dell'estremità libera della leva, questo fascio riflesso viene direzionato verso un sensore ottico costituito da un fotodiode suddiviso generalmente in due o quattro settori (figura 2).

Questo dispositivo ottico, se suddiviso in quattro quadranti, è in grado di riconoscere sia la

componente normale delle forze di interazione, sia essa repulsiva o attrattiva, che la torsione della leva dovuta alla componente laterale della suddetta forza, mentre se sono presenti due settori il sistema rileva la sola componente normale. Il sistema oltre ad essere in grado di consentire la costruzione dell'immagine topografica viene anche utilizzato per il controllo dell'analisi, quando il suo segnale viene posto in retroazione in un apposito sistema di controllo che gestisce il porta-campione. La deflessione della leva ci fornisce dati fondamentali perché essa si deforma linearmente in accordo con la legge di Hooke, quindi conoscendone il modulo elastico (noto perché sappiamo il

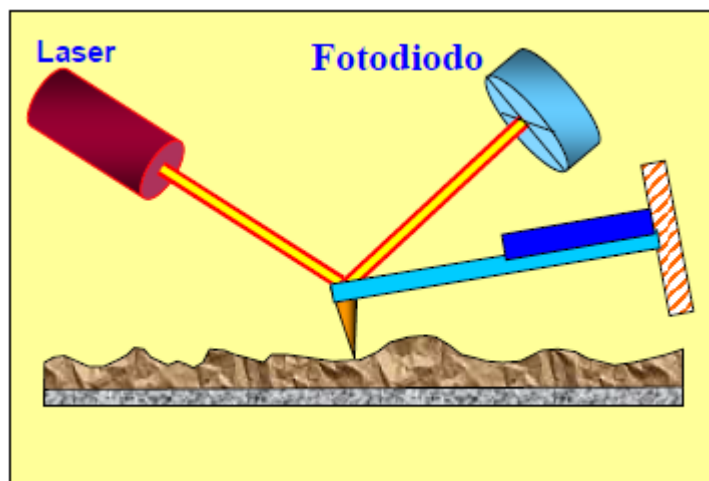


Figura 2: Sistema di rilevamento deflessioni, in questo caso ci si avvale di un punto laser proiettato sull'estremità libera della sonda e riflesso verso una matrice di fotodiodi divisa in quattro settori. Credits: [5]

materiale con cui è costruita la leva), la geometria e l'entità della deflessione, possiamo ricavare i valori delle forze di interazione, che usualmente si pongono nell'ordine dei nano newton. [5]

2.4 Lo scanner

Un componente fondamentale per la riuscita della scansione in un microscopio a forza atomica è il porta-campione anche detto scanner (figura 3). Lo scanner si utilizza per consentire il controllo della posizione della sonda lungo gli assi x e y e soprattutto della distanza punta-campione, anche con precisione pari a frazioni di angstrom. Esso è di forma tipicamente tubolare ed è costruito in materiale piezoelettrico, materiale molto particolare che ha la caratteristica di cambiare dimensioni se sottoposto a differenza di potenziale. Ricevendo in retroazione il segnale amplificato del fotodiode che

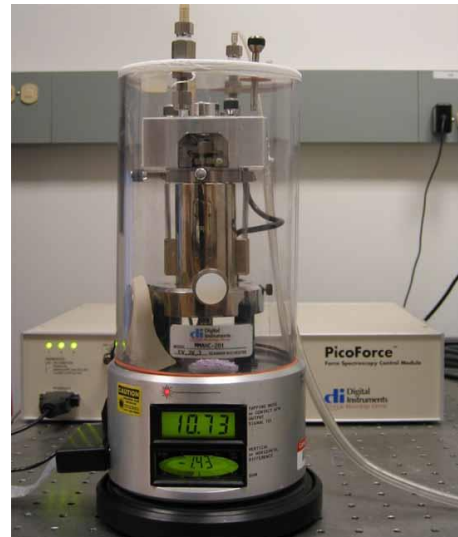


Figura 3: Microscopio AFM, notare lo scanner tubolare in materiale piezoelettrico posizionato al centro dello strumento

rileva le deflessioni della leva, è in grado di modificare il suo spessore e quindi spostare il campione lungo l'asse z con assoluta precisione. Il sistema di controllo ha il compito di gestire gli spostamenti lungo l'asse z del porta-campione, in modo tale da evitare contatti accidentali fra il materiale analizzato e la sonda che comprometterebbero l'analisi; gestisce inoltre gli spostamenti lungo gli assi x e y in modo tale da coprire tutta la superficie da analizzare ed infine gestisce le varie modalità di scansione possibili. Uno dei difetti dei materiali piezoelettrici è la possibile presenza di isteresi nella relazione che associa la variazione di quota in funzione della differenza di potenziale applicata, questo effetto è dovuto alla variazione di temperatura del sistema durante le acquisizioni, ciò comporta la probabile presenza di artefatti nell'immagine finale dovuti al drift termico. [5]

2.5 Il cantilever

Le sonde utilizzate in questo tipo di microscopia sono leve di dimensioni microscopiche, dotate di una punta acuminata sulla loro estremità libera ed ancorate ad una base di silicio all'altra estremità. Sono prodotte tramite fotolitografia. La punta della sonda può avere molteplici forme, esistono punte coniche, piramidali o smussate; il raggio di curvatura della punta di un cantilever varia in un range di 1-50 nm e l'angolo di apertura all'apice varia fra i 10° e i 20°, dimensioni che sono dipendenti dal tipo di punta e dalla tecnologia di realizzazione. Va ricordato che minore è il raggio di curvatura dell'apice e più alta sarà la risoluzione dell'immagine e quindi più precise saranno le informazioni che si potranno desumere da quest'ultima.

Mentre esistono diverse forme di nano-punta ne esistono solo due per la leva: rettangolare o triangolare a due bracci (figura 4 e 5). Ad ogni forma è associata una specifica costante elastica K che dipende anche dalle dimensioni caratteristiche della leva e dal suo modulo di Young; solitamente la costante elastica della leva giace in un intervallo di 10^{-3} -100 N/m. Le dimensioni più ricorrenti di un cantilever sono 100x10x2, espresse in μm . Va notato che è possibile posizionare sulla punta della sonda alcune specie chimiche di interesse così da farle interagire con la superficie del campione e valutarne il comportamento per estrapolare proprietà chimiche su scala nanometrica. È inoltre possibile la realizzazione di test di durezza su scala nanometrica e di questo argomento se ne parlerà approfonditamente in seguito.

[5] [8] [9] [18]

2.6 Protezione dalle influenze esterne

Durante un'analisi AFM sono molti i fattori esterni che possono influenzare negativamente la misura e portare alla formazione di artefatti. Uno di essi è la presenza di vibrazioni meccaniche nell'ambiente circostante, esse possono portare a risonanza

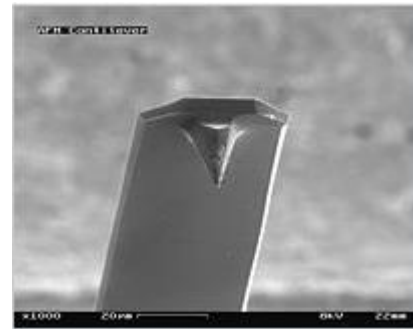


Figura 5: Sonda rettangolare di un AFM vista al SEM

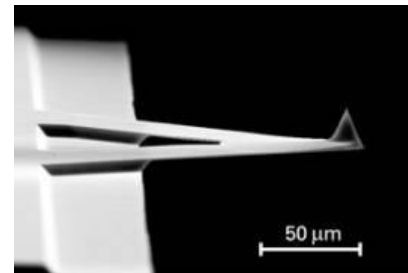


Figura 4: Altra sonda, questa volta con geometria triangolare a sbalzo

la sonda producendo variazioni nella distanza punta-campione e vengono osservate come rumore periodico nell'acquisizione della topografia. Per limitare l'influenza di queste vibrazioni meccaniche si costruiscono cantilever in materiali pesanti e con frequenza di risonanza molto elevata nell'ordine dei kHz. Un altro metodo efficace ed essenziale per smorzare le vibrazioni è quello di posizionare il microscopio al di sopra di una piattaforma elastica che funge da filtro fra lo strumento e l'ambiente riducendo le vibrazioni. Anche il rumore acustico produce vibrazioni in grado di eccitare la sonda, in questo caso si utilizzano schermature fisiche di vario tipo che isolano lo strumento, oppure si può porre il campione e il sistema di analisi sotto vuoto, ma questo comporterebbe la perdita di uno dei principali vantaggi dell'AFM rispetto al SEM e cioè l'assenza della necessità di creare il vuoto per analizzare il materiale. Infine anche la variazione della temperatura dell'ambiente esterno o il surriscaldamento dello strumento stesso durante la misura, provoca la comparsa di artefatti perché variare la temperatura di un solido produce su di esso deformazioni termoplastiche. Un metodo per la riduzione del fenomeno della deriva termica (anche detto drift) è quello di realizzare lo strumento in modo tale che le geometrie degli elementi che lo compongono portino a zero la somma della deriva di ogni singolo elemento. [5]

2.7 Curva di forza di un cantilever

La curva di forza è una curva che descrive l'andamento della deflessione a cui va incontro il cantilever durante l'avvicinamento alla superficie del campione e il successivo allontanamento, in funzione dello spostamento della sonda lungo l'asse z. L'analisi della superficie di un campione tramite microscopia AFM può produrre, per ogni punto del campione analizzato, una o più curve di forza. Lo strumento è in grado di acquisire curve di forza su ogni tipo di superficie e in ogni condizione ambientale, con risoluzione laterale pari a circa 25nm, verticale di un decimo di angstrom e riesce a rilevare forze nell'ordine di 1pN. Esaminando una curva di forza si nota che essa è divisa in due parti: una curva che descrive l'avvicinamento, ed una che descrive l'allontanamento dalla superficie (figura 6). Inizialmente, con la sonda molto lontana dalla superficie da esaminare, si nota che la deflessione del cantilever è costante e

perciò viene assunta come punto di deflessione pari a zero. Avvicinandosi al campione la punta della sonda verrà attratta improvvisamente verso il campione (jump-in), a causa delle forze attrattive di van der Waals. Continuando l'avvicinamento la deflessione cambia segno, la sonda entra in contatto con la superficie e viene respinta dal campione. A questo punto si ritira il cantilever e ci si aspetterebbe che la curva di forza “ripercorra” lo stesso cammino dell'andata, ma ciò non avviene a causa di deflessioni negative molto maggiori dovute alle forze di adesione che trattengono la punta della sonda al campione per un breve istante di tempo. Queste forze di adesione sono create dalle molecole d'acqua presenti sulla superficie a causa del fatto che le analisi AFM avvengono anche in condizioni ambientali comuni. Questa differenza di cammino fra l'andata e il ritorno nelle curve di forza viene chiamata isteresi del cantilever, e, oltre che dalle condizioni atmosferiche dell'ambiente in cui è svolta l'analisi, dipende anche dalle caratteristiche della sonda stessa e della sua punta. [4][5]

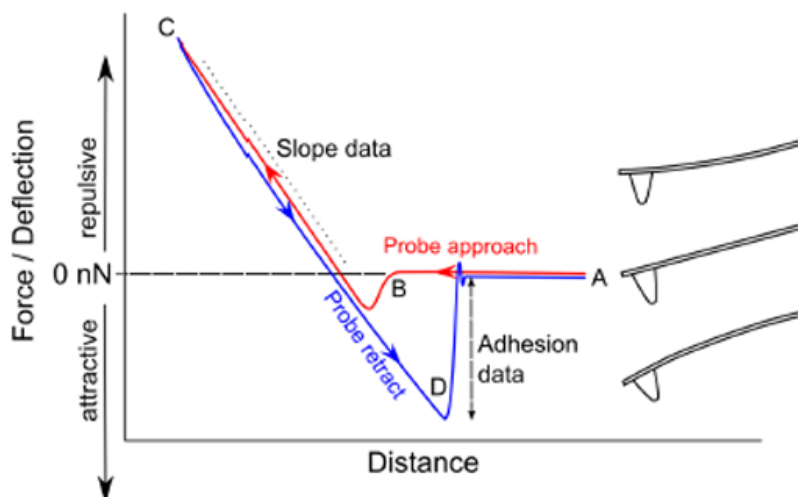


Figura 6: Curva di forza, sull'asse delle ordinate è riportata la deflessione subita dalla leva mentre sull'asse delle ascisse è riportato lo spostamento lungo z dello scanner. La curva di approccio è riportata in rosso mentre la curva di ritorno in blu.

2.8 Modalità di scansione

Le metodologie utilizzate in microscopia AFM per l'acquisizione di immagini topografiche e non solo, vanno suddivise in due gruppi: le modalità in cui è previsto un contatto con il campione e quelle in cui invece punta e campione non vengono mai a contatto.

Nella modalità a contatto (contact-mode) la punta e la superficie del campione rimangono sempre a contatto. La forza di interazione che si viene a creare fra la punta della sonda e la superficie del campione è bilanciata dalla deflessione elastica della leva, perciò per questo tipo di analisi si prediligono leve con costante elastica piccola in modo tale da renderle molto sensibili alle forze di interazione scongiurando il rischio di un'eccessiva penetrazione nel campione stesso che potrebbe danneggiarsi. La modalità a contatto inoltre può essere eseguita mantenendo costante la forza di interazione punta-campione o la loro distanza, ciò è possibile tramite un meccanismo di feedback gestito dal sistema di controllo a cui viene inviato il segnale di analisi.

La modalità in assenza di contatto si suddivide in due tipologie: statica e dinamica. Nella modalità statica il cantilever viene mantenuto ad una distanza costante dalla superficie del campione e viene registrata la conseguente deflessione, non è necessario quindi un sistema di feedback. Nella modalità dinamica invece la sonda è messa in vibrazione alla sua frequenza di risonanza e viene avvicinata al campione. Le forze di interazione punta-campione modificheranno ampiezza, fase e frequenza del movimento oscillatorio dando modo di stimarne l'intensità.

Una terza modalità di scansione viene chiamata "tapping mode". Come nella modalità precedente la sonda viene fatta oscillare alla sua frequenza di risonanza e man mano che ci si avvicina al campione variano le caratteristiche oscillatorie, infine, nell'estremità inferiore dell'oscillazione la punta entra a contatto con il campione e si verifica la massima diminuzione di ampiezza e il cantilever viene ritirato. Si viene a creare una scansione ad altezza media costante, ma con il vantaggio di diminuire le forze a cui è sottoposta la sonda scongiurando il rischio di danneggiarla. Inoltre si può sfruttare il segnale di fase per distinguere i diversi materiali che possono comporre la superficie analizzata.

Vi è infine la modalità chiamata force-volume, molto differente dalle altre. Questa modalità suddivide l'area da scansionare in una matrice di punti, per ogni punto realizza una o più curve di forza. Questa modalità non produce un'immagine topografica, bensì caratterizza il campione secondo le sue proprietà chimico-fisiche superficiali che variano su scala nanometrica da punto a punto. Con la necessaria

elaborazione dei dati forniti dalle curve di forza è anche possibile realizzare un mapping delle proprietà meccaniche di interesse; un software che permette la realizzazione in automatico di una mappa in scala di grigi della variazione del modulo di Young sulla superficie analizzata è anche l'oggetto di questa tesi. [5]

2.9 Immagini AFM

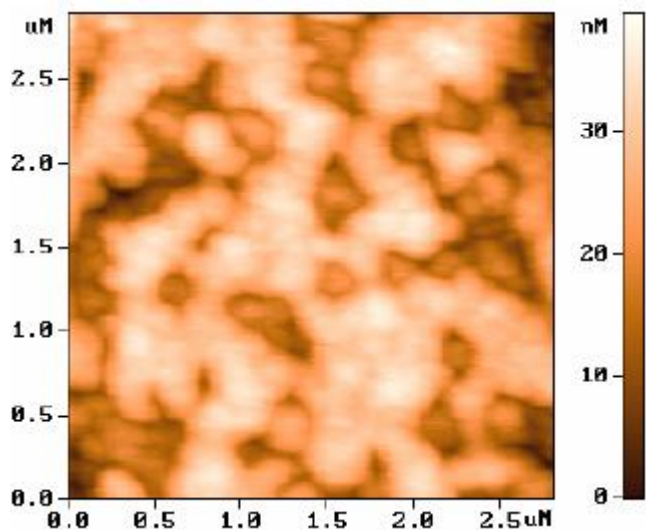


Figura 7: Esempio di immagine bidimensionale in scala di colore. Credits: [5]

Le informazioni ottenute durante la scansione di una superficie vengono memorizzate in una matrice; ovviamente è il tipo di interazione registrata a dare un significato fisico al dataset. Tipicamente vengono utilizzati i dati presenti nel segnale posto in retroazione al meccanismo di feedback per ricostruire l'immagine morfologica del campione. La rappresentazione

dell'immagine su di un monitor viene affidata a software grafici che possono realizzare una visuale in 3d della superficie, oppure un'immagine bidimensionale a scala di colore in cui i singoli pixel vengono colorati in funzione dell'altezza topografica (si vedano figure 7 e 8 a titolo di esempio). Le immagini prodotte hanno una massima estensione indicativamente di $150\mu\text{m} \times 150\mu\text{m}$ e non vengono visualizzate in tempo reale, ma occorre attendere che lo strumento completi la scansione; queste tempistiche variano ampiamente a seconda della modalità ed ai parametri scelti per la scansione. Come già accennato il microscopio AFM è in grado di generare varie tipologie di immagine, topografiche e non; se viene analizzato il segnale di fase in tapping mode si possono distinguere qualitativamente i diversi materiali che compongono la superficie, oppure prelevando curve di forza si possono realizzare mappe della variazione di proprietà meccaniche. I dataset utilizzati per comporre l'immagine della superficie del campione spesso sono soggetti ad artefatti, per questo il software interno dello strumento permette un filtraggio che migliora la

qualità del risultato finale, si può ad esempio sottrarre una costante o un piano inclinato perché spesso il campione può presentare un'inclinazione della superficie, oppure le diverse aree scansionate possono trovarsi ad inclinazioni differenti o anche il drift termico porta il campione ad essere inclinato rispetto alla superficie di scansione. Si possono inoltre eliminare le distorsioni dovute ad imperfezioni dello scanner ed infine è possibile filtrare elettronicamente il segnale ricevuto con le più disparate tecniche di filtraggio. [5]

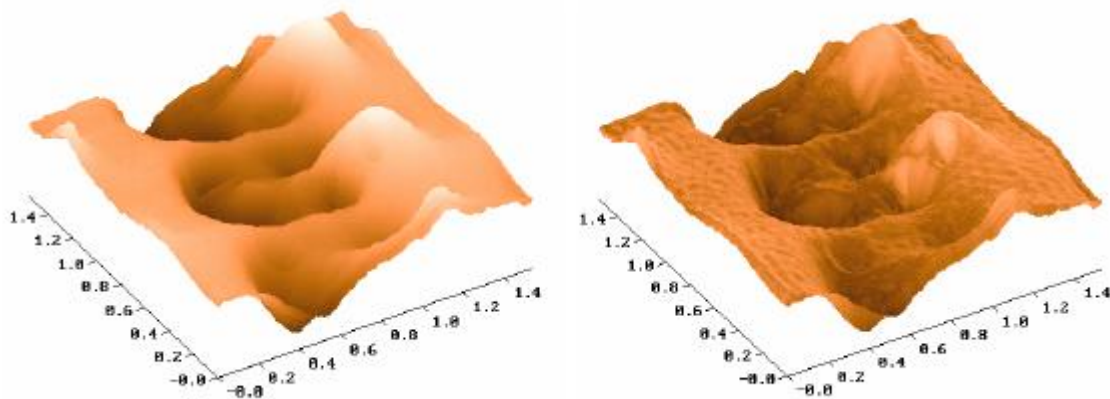


Figura 8: Esempio di immagini in tre dimensioni con diversi tipi di contrasto. Credits: [5]

2.10 Pro e contro delle analisi AFM

Uno dei principali vantaggi dell'AFM rispetto ad altre tecniche di microscopia (quali il SEM) è la possibilità di analizzare il campione in condizioni ambientali standard e inoltre quest'ultimo non ha bisogno di trattamenti particolari per essere reso analizzabile come la metallizzazione, mantenendo una maggior coerenza con le sue caratteristiche naturali, ambiente compreso. Ciò rende l'AFM un ottimo strumento per l'analisi di campioni biologici che mal digeriscono ambienti estremi come il vuoto. Inoltre l'immagine AFM non è una proiezione o un'immagine bidimensionale del campione, ma un reale profilo tridimensionale della superficie. Infine va ricordato che l'AFM non è solo in grado di fornire l'immagine morfologica del campione, ma anche altre tipologie di immagine.

Esistono però anche degli svantaggi nell'utilizzo di questa tecnica, innanzitutto l'AFM restituisce un'immagine piccola ($100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$) rispetto al SEM e lavora molto più

vicino al campione (vi entra anche in contatto). L'AFM non permette analisi real-time ma solitamente nell'ordine di alcuni minuti. Inoltre L'AFM è sensibile ai rumori elettronici, e richiede perciò un filtraggio o un'elaborazione dei dati successiva all'analisi. Infine anche il cantilever, se non perfetto, può portare ad artefatti di rilevazione. [1][2]

3. NANO-INDENTAZIONE

3.1 Microscopio AFM come nano-indentatore

La nano-indentazione è una tecnica analitica che permette di studiare varie proprietà meccaniche superficiali di un dato campione su scala nanometrica. Negli ultimi anni il microscopio a forza atomica si è ritagliato sempre più spazio come strumento per la nano-indentazione, soprattutto per misurare le proprietà meccaniche locali in materiali morbidi. Vari fattori hanno reso possibile il successo dell'AFM in questo tipo di analisi, come ad esempio le minime dimensioni della punta della sonda e l'ottimo controllo che si ha delle interazioni sonda-campione, inoltre rispetto al SEM, il microscopio AFM, come già detto, ha il grande vantaggio di poter mantenere il campione nel suo ambiente nativo. Infine la sensibilità della sonda a forze di interazione anche dell'ordine di 1pN, permette di analizzare le proprietà elastiche di materiali biologici molto delicati e che mostrano disomogeneità su scale microscopiche, ma permette anche lo studio del comportamento meccanico di singole molecole e delle interazioni fra le molecole stesse. A titolo di esempio si può riportare che, tramite AFM, si è riusciti a studiare il comportamento elastico di: batteri, cellule, cartilagine articolare e tessuto osseo.

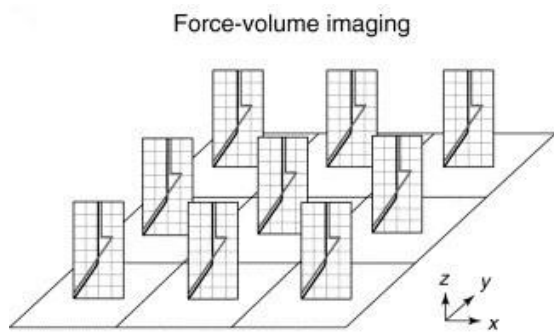


Figura 9: Immagine che dimostra la scelta del nome della modalità "force-volume", si realizzano curve di forza all'interno di un volume.

Per studiare le proprietà meccaniche superficiali tramite AFM lo strumento viene fatto lavorare in una modalità diversa da quelle utili per la ricostruzione dell'immagine topografica, tale modalità viene solitamente chiamata force-volume. Il microscopio scansionerà punto per punto la superficie da analizzare, per ogni punto la procedura è la stessa e si ripete. All'inizio

dell'analisi puntuale, la sonda è molto distante dal campione, e non vi sono interazioni a perturbarla (non-contact region). Man mano che l'avvicinamento progredisce si noterà una deflessione netta della sonda verso il campione (jump-in), che aumenta al diminuire della distanza dal campione. Ad un certo istante la punta della sonda tocca il campione (contact point), l'avvicinamento continua, si indenta il campione che si deforma elasticamente, la sonda a questo punto registrerà una deflessione contraria rispetto a prima dovuta allo sforzo di indentare il campione. Questa fase dell'analisi è chiamata approccio. A questo punto la sonda viene ritratta (fase di ritorno), e viene riportata nella posizione iniziale. Durante l'analisi bisogna prestare molta attenzione alle deformazioni a cui si sottopone il campione, si deve rimanere entro il limite elastico del materiale per non deformare plasticamente la superficie del campione e quindi produrre dati inutilizzabili. Inoltre se il campione viene analizzato in condizioni ambientali è molto probabile che oltre alle interazioni punta-campione, la sonda registrerà anche le forze di adesione che si vengono a creare fra la punta e la superficie del materiale, a causa del sottile film liquido presente sulla superficie stessa del campione. Solitamente queste forze di adesione sono molto più pronunciate nella fase di ritorno soprattutto nel momento in cui la punta si stacca dal campione (pull-off).

Per ogni punto del campione analizzato il microscopio AFM produce una serie di dati in cui lo spostamento in senso verticale della sonda è legato alla deflessione della sonda stessa (curve di forza). Questi dati crudi vanno ovviamente elaborati per estrapolare le proprietà di nostro interesse come il modulo di Young locale. Proprio la necessità di dover elaborare questi dati ostacola la consistenza dei dati stessi ottenuti tramite AFM

e ne preclude l'uso su analisi in larga scala. Molti dei problemi sono associati alla variabilità spaziale delle proprietà elastiche oppure alle sopracitate forze di adesione che producono artefatti nei dati raccolti. Come sopra menzionato, questa tecnica di microscopia infatti non fornisce direttamente i dati di cui si ha bisogno, ma fornisce dei data set in cui viene riportata la deflessione a cui va incontro il cantilever durante l'indagine, in funzione dello spostamento in senso verticale del cantilever stesso verso il campione (curva deflessione-spostamento). Sarà cura dell'utilizzatore estrapolare le proprietà meccaniche di suo interesse dai data set mediante apposite relazioni, tenendo presente però che si possono produrre molteplici curve di deflessione-spostamento per ogni singolo punto del campione analizzato, e queste curve possono contenere errori di vario tipo, da disturbi elettrici, a quelli termici oltre che varie modalità di interazione sonda campione tutt'altro che lineari. L'automatizzazione del processo di elaborazione dati è un valido aiuto per ottenere dalle curve deflessione-spostamento prodotte dallo strumento, le proprietà nanomeccaniche superficiali, e nell'ultima decade ha raggiunto un'importanza notevole soprattutto quando si ha a che fare con immagini superficiali grandi e quando si ripete più volte l'analisi di nano-indentazione su ogni singolo punto della superficie, producendo una mole considerevole di curve Forza-deformazione che sarebbe impensabile da trattare manualmente in tempi ragionevoli. Questo processo di automatizzazione però risulta essere piuttosto insidioso per motivazioni esemplificate in seguito, e nonostante le caratteristiche e i vantaggi dell'analisi delle proprietà nano meccaniche tramite AFM rispetto ad altre metodologie di indagine microscopica, ne precludono, al momento, l'utilizzo per analisi su larga scala, o comunque per essere definiti robusti questi software necessitano di numerosi interventi dell'utente. [1][2]

3.2 Automatizzazione dell'elaborazione dati AFM

Come già accennato precedentemente, un approccio automatizzato per elaborare i dati crudi dell'AFM, è di vitale importanza per sfruttare a pieno le potenzialità dello strumento come sonda per le proprietà elastiche dei campioni che manifestano una disomogeneità delle stesse su scala micro e sub-microscopica, e può anche avere un potenziale notevole in applicazioni di bioingegneria, per realizzare, ad esempio, una mappa ad alta risoluzione delle proprietà elastiche di un tessuto. Inoltre

l'automatizzazione dell'elaborazione dei dati risulta necessaria quando la mole di dati cresce.

Il microscopio a forza atomica non permette di misurare direttamente la forza che il cantilever esercita sul campione e le conseguenti deformazioni, ma restituisce un dataset in cui la deflessione subita dalla sonda è messa in relazione con la posizione relativa lungo l'asse z dello scanner, quindi per convertire questi dataset crudi sarà necessario individuare, nella funzione, dei precisi punti di riferimento e delle specifiche porzioni della curva. Uno script che elabora i dati di deflessione e

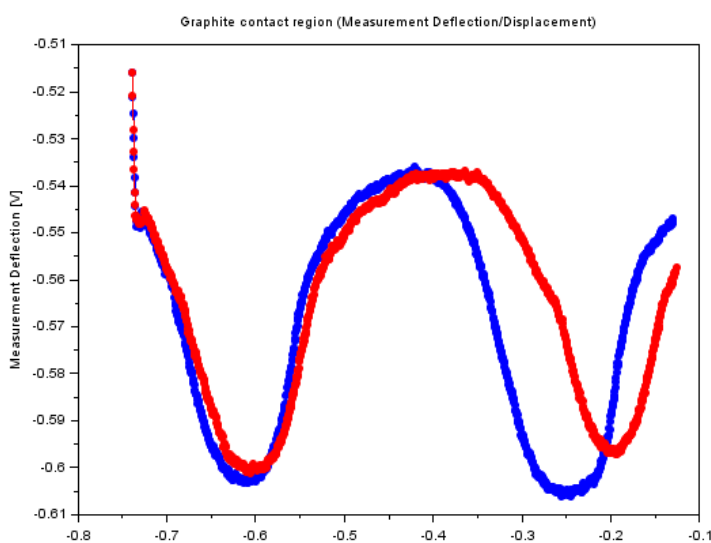


Figura 10: Curva di forza con la presenza di un forte rumore sinusoidale nella non-contact region. Sulle ordinate è riportata l'entità della deformazione mentre sulle ascisse lo spostamento dello scanner lungo z.

spostamento generati dall'analisi della superficie del campione deve innanzitutto individuare le regioni principali in cui solitamente si suddivide una curva di forza. È bene ricordare che nella maggior parte dei casi si preferisce utilizzare i dati della curva corrispondente all'avvicinamento della sonda al campione, con conseguente indentazione, piuttosto che i dati forniti dalla curva di ritorno, questo perché i dati di ritorno sono più soggetti ad artefatti soprattutto a causa delle forze di adesione dovute al naturale film liquido che ricopre la superficie di un campione analizzato in condizioni ambientali; al contrario invece se si ha la necessità di stimare le interazioni di tipo adesivo è opportuno prendere in considerazione i dati di ritorno in cui i suddetti fenomeni si palesano maggiormente. Il primo passo del processo è l'individuazione della porzione di curva in cui il cantilever non è perturbato dalle interazioni fra la punta della sonda e la superficie del campione. Questa porzione di curva prende il nome di non-contact region. Una precisa individuazione della non-contact region è fondamentale perché sostanzialmente essa è la porzione di curva che non porta informazioni di rilievo e

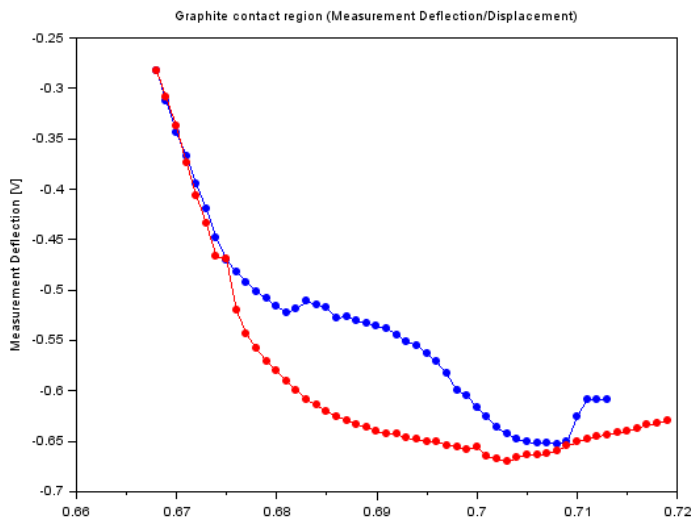


Figura 11: Esempio di curva di forza con una contact region fortemente non lineare e quindi difficilmente applicabile a modelli teorici di contatto.

definito come la regione di curva in cui si nota una deflessione negativa repentina del cantilever che si protende verso il campione sotto l'influenza delle forze di interazione di tipo attrattivo. Solitamente il jump-in viene localizzato tramite un studio della derivata prima o seconda della curva stessa previa applicazione di un filtraggio di tipo mediano. Infine si individua il contact point, cioè il punto esatto in cui la punta della sonda e la superficie del campione vengono a contatto; l'individuazione esatta di questo punto è da considerarsi di primaria importanza perché principalmente da esso dipende la bontà dei risultati che si otterranno dai modelli meccanici di contatto, infatti un errore di 50nm nel collocamento del punto di contatto può generare un errore nel calcolo del modulo elastico di un ordine di grandezza [3] e inoltre è proprio dal contact-point che inizia la porzione lineare della curva AFM che andrà appunto studiata e prende il nome di contact region. Esistono numerose procedure che permettono la localizzazione del contact-point, la più semplice e intuitiva è l'ispezione visiva da parte dell'utente della curva deflessione-spostamento, ma in un processo automatizzato va limitato al minimo l'intervento dell'utente quindi altre metodiche sono da preferire, come ricerche sequenziali ad esempio. Individuato il contact-point, si esegue un offset dei dati dello spostamento e si convertono i dati della curva deflessione-spostamento per ottenere le forze e le conseguenti deformazioni a cui va incontro il campione durante l'analisi. Una volta ottenuti questi dati si applicano al

spesso è soggetta a fenomeni di disturbo di tipo elettrico (vedi figura 10) perciò va eliminata dal dataset che si utilizzerà per il calcolo delle proprietà meccaniche. Ottenuta l'entità della non-contact region si procede con un offset della parte di dataset che contiene le deflessioni della sonda. Successivamente va individuato il jump-in

modello meccanico di contatto adeguato per ottenere il modulo di Young del materiale. I modelli di contatto sono molteplici, tra i quali, il modello di Hertz, il primo ad essere stato messo a punto ma anche il più semplicistico, il modello DMT meno grossolano del precedente, ma ancora ricco di ipotesi semplificative, infine i modelli JKR e MD, i più esaustivi e quelli con meno semplificazioni. Questi modelli verranno trattati nello specifico nel capitolo successivo.

4. MODELLI MECCANICI DI CONTATTO

4.1 Modello di Hertz

I modelli meccanici di contatto hanno lo scopo di teorizzare e prevedere il comportamento del sistema sonda-campione e dell'andamento della curva di Forza-deformazione, durante un'analisi di nano-indentazione tramite microscopia AFM. Il classico problema di una superficie indentata da un oggetto rigido è stato trattato in prima istanza da Hertz nel 1881. Il modello di Hertz restituisce buoni risultati quando viene applicato a dati forniti dall'analisi di materiali elastico lineari, quando non viene deformato plasticamente il campione e soprattutto nei casi in cui le forze di interazione di tipo adesivo fra la sonda e la superficie del campione sono minime se non nulle. Sono preferibili anche alcune geometrie della punta del cantilever, si ottengono risultati migliori se vengono utilizzate punte sferiche, cilindriche o coniche.

Per quanto riguarda il formulismo, ricordiamo che la costante elastica del campione K , se indentato con una punta sferica di raggio R , è data da:

$$K = \frac{4E}{3(1 - \nu^2)} \quad (1)$$

In cui E è il modulo di Young del campione e ν il suo coefficiente di Poisson. Va specificato che tutte le relazioni presentate in seguito sono da considerarsi valide per indentazioni con sonde dalla punta sferica.

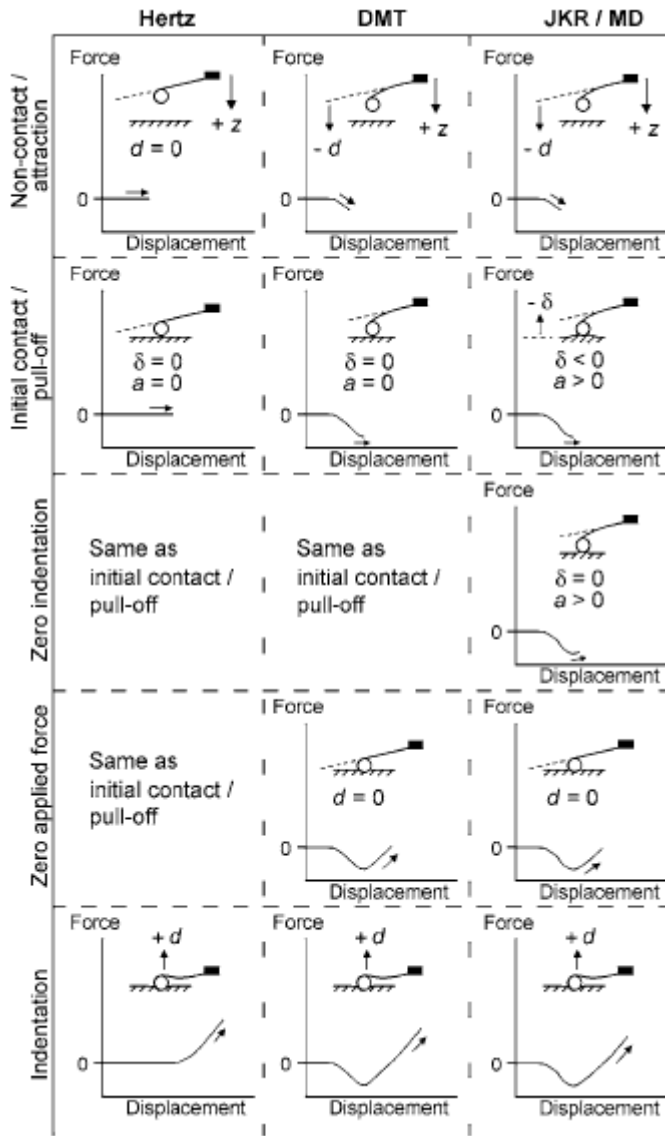


Figura 12: Schema del comportamento del sistema sonda-campione teorizzato dai vari modelli. Modificata da: [2]

dal campione e torna indietro) vengono ipotizzate uguali a zero la deformazione del campione, la deflessione del cantilever e la forza normale applicata al campione (vedi figura 12). Secondo il modello di Hertz si osserverà una deflessione positiva della sonda solo nel momento in cui essa inizierà ad indentare la superficie. Se dovessero essere presenti delle forze attrattive però, il contatto fra sonda e superficie avviene sotto l'influenza di queste forze perciò nella realtà, prima del contatto iniziale si rileverà una deflessione della sonda verso il campione (negativa secondo convenzione), per questo il modello non è applicabile a data set derivanti da analisi in presenza di forze di adesione o di grandi forze di interazione sonda-campione. [2]

Il modello di Hertz prevede le seguenti relazioni che legano forza, indentazione e raggio di contatto:

$$\delta = \frac{a^2}{R} \quad (2)$$

$$a = \left(\frac{F_n R}{K} \right)^{1/3} \quad (3)$$

In cui δ è l'indentazione subita dal campione, R è il raggio della punta del cantilever, e F_n è la forza normale applicata sul campione e a rappresenta il raggio di contatto.

Nel modello di Hertz, dato dalle equazioni (2) e (3), nell'area di non contatto si ipotizza che il cantilever non subisca alcuna deflessione.

Nel punto di contatto iniziale (sia esso il contact point iniziale quando la sonda va verso il

campione sia nel momento del pull off cioè quando la sonda si stacca

4.2 Modello Derjaguin-Muller-Toporov

Il modello DMT è così chiamato in onore dei suoi ideatori Derjaguin, Muller e Toporov. È un modello che restituisce buoni risultati se applicato in analisi di materiali piuttosto rigidi in cui sono presenti deboli forze di adesione e piccoli raggi di curvatura della punta della sonda.

Il modello in questione fornisce le seguenti relazioni:

$$\delta = \frac{a^2}{R} \quad (4)$$

$$a = \left[\frac{R}{K(F_n + F_{ad})} \right]^{1/3} \quad (5)$$

$$F_{ad} = 2\pi\gamma R \quad (6)$$

δ è la deformazione subita dal campione, a è il raggio di contatto, R è il raggio della punta della sonda, K la costante elastica del campione, F_n la forza normale esercitata dal cantilever sulla superficie del campione, F_{ad} sono le forze adesive presenti durante l'analisi e infine γ è l'energia libera di superficie espressa in J/m^2 .

Il modello DMT, a differenza del più semplicistico Hertz, prevede che quando la sonda è in prossimità del campione si rilevi una deflessione negativa della stessa che quindi protende verso il campione. Si arriverà perciò al contatto iniziale con un valore negativo di deflessione piuttosto che nullo come in precedenza, ma ancora nullo è il valore del raggio di contatto. Successivamente si verifica una fase di “forza applicata zero” in cui la forza normale si equivale alle forze di attrazione perciò il cantilever rileva una deflessione pari a zero e un raggio di contatto ovviamente positivo. Solo nel momento in cui il campione verrà sottoposto ad indentazione si registrerà una variazione della deflessione che da un valore nullo passerà a valori positivi (figura 12).
[2] [11]

4.3 Modello Johnson-Kendall-Roberts

Il modello JKR (Johnson-Kendall-Roberts) è una variante del classico modello di Hertz che prevede l'esistenza di forze adesive e l'influenza di un'energia libera di

superficie posseduta dal campione. Questo modello a differenza del precedente DMT va applicato nei casi in cui si ha a che fare con materiali soffici, raggi di curvatura della punta del cantilever elevati e forti interazioni adesive.

Le relazioni presentate da questo modello sono le seguenti:

$$\delta = \frac{a^2}{R} - \frac{4}{3} \sqrt{\frac{a F_{ad}}{RK}} \quad (7)$$

$$a = \left[\frac{R}{K} (\sqrt{F_{ad}} + \sqrt{F_n + F_{ad}})^2 \right]^{1/3} \quad (8)$$

$$F_{ad} = \left(\frac{3}{2} \right) \pi \gamma R \quad (9)$$

δ è sempre la deformazione a cui è soggetto il campione, a è il raggio di contatto, F_{ad} è la forza adesiva caratteristica che si sviluppa fra le due superfici a contatto, γ è l'energia di interfaccia espressa in J/m^2 .

Analogamente al modello DMT questo modello prevede una deflessione negativa della sonda poco prima che la stessa entri in contatto col campione (figura 12). La differenza fondamentale fra il modello DMT ed il JKR si palesa nella trattazione delle interazioni in gioco al punto di contatto. Infatti mentre il modello precedente al punto di contatto suppone che il campione non subisca alcuna deformazione, è importante notare invece che nel punto di contatto (o di separazione) l'indentazione per il modello JKR vale:

$$\delta_0 = \left(-\frac{1}{3} \right) \left(\frac{F_{ad}^{2/3}}{K^{2/3} R^{1/3}} \right) \quad (10)$$

Secondo il modello JKR il campione al contatto iniziale subisce una deformazione negativa, ovvero si protende verso la sonda. Ciò avviene soprattutto in analisi di materiali che possiedono grande compliance che vengono localmente deformati da forze adesive o attrattive. Nel momento in cui il contatto è avvenuto ma ancora non si registrano deformazioni positive, la deflessione della sonda rimane negativa e il raggio di contatto risulta positivo (altra variazione rispetto al modello DMT in cui il raggio di

contatto è nullo in questa situazione). Proseguendo con l'avvicinamento la deflessione compensa la forza normale esercitata sulla superficie del campione, in questa situazione il modello in questione è analogo al precedente, deflessione del cantilever ovviamente nulla. Come il modello DMT, il modello JKR prevede deflessione positiva nel momento in cui il campione viene deformato. [2] [10]

4.4 Modello Maugis-Dugdale

Il modello Maugis-Dugdale è stato creato per colmare il gap di applicabilità che intercorre fra il modello DMT, applicabile a materiali rigidi e in presenza di basse forze di adesione, e il modello JKR, applicabile a materiali soffici e in presenza di forze di adesione considerevoli. Anche in questo modello, come nel precedente JKR, è prevista una deformazione negativa della superficie analizzata (campione che protende verso la sonda) ma è di difficile applicabilità ad un approccio automatizzato a causa della mancanza di relazioni dirette fra forza normale esercitata ed indentazione.

A differenza dei modelli trattati fin ora, il modello MD fa uso di un parametro adimensionale λ descritto come segue:

$$\lambda = 2\sigma_0 \left(\frac{R}{\pi K^2 \gamma} \right)^{1/3} \quad (11)$$

σ_0 corrisponde al valore della massima forza attrattiva secondo il potenziale di Lennard-Jonnes. Il parametro λ è utilizzato per discriminare la regione di applicabilità di un modello a seconda delle condizioni sperimentali, con $\lambda < 0,1$ è auspicabile utilizzare il modello DMT per l'elaborazione dei dati, con $\lambda > 5$ si consiglia di utilizzare il modello JKR, se invece λ cade nell'intervallo fra 0,1 e 5, si possono utilizzare le equazioni proposte dal modello MD:

$$\begin{aligned} & \left(\frac{\lambda \bar{a}^2}{2} \right) \left[(m^2 - 2) \tan^{-1} \sqrt{m^2 - 1} + \sqrt{m^2 - 1} \right] + \\ & + \left(\frac{4\lambda^2 \bar{a}}{3} \right) \left[\sqrt{m^2 - 1} \tan^{-1} \sqrt{m^2 - 1} - m + 1 \right] = 1 \quad (12) \end{aligned}$$

$$\bar{F}_n = \bar{a}^3 - \lambda \bar{a}^2 \left[\sqrt{m^2 - 1} + m^2 \tan^{-1} \sqrt{m^2 - 1} \right] \quad (13)$$

$$\bar{\delta} = \bar{a}^2 - \left(\frac{4\lambda^2 \bar{a}}{3} \right) \sqrt{m^2 - 1} \quad (14)$$

Nelle relazioni il termine m corrisponde al rapporto $m=c/a$, in cui a è il raggio di contatto definito come negli altri modelli, mentre c è il raggio dell'area in cui la forza σ_0 esercita la sua influenza. Inoltre raggio di contatto, forza esercitata e deformazione sono espressi in forma adimensionale, le relazioni che legano queste grandezze alle loro forme dimensionali sono le seguenti:

$$\bar{a} = a \left(\frac{K}{\pi \gamma R^2} \right)^{1/3} \quad (15)$$

$$\bar{F} = \frac{F}{\pi \gamma R} \quad (16)$$

$$\bar{\delta} = \delta \left(\frac{K^2}{\pi^2 \gamma^2 R} \right) \quad (17)$$

Il comportamento della sonda e del campione teorizzato dal modello è il medesimo descritto dal modello JKR da cui differisce solo numericamente. [2] [12] [13] [14]

5. SVILUPPO SCRIPT SPERIMENTALI

Gli script sviluppati in questa tesi sono due, entrambi realizzati e computati tramite Scilab, un linguaggio di programmazione di alto livello, basato sul linguaggio di programmazione C e completamente open source. Il primo script presentato realizza misure puntuali; dato un set di curve appartenenti allo stesso punto, permette di mettere in relazione l'andamento delle varie proprietà meccaniche di interesse,

compreso il modulo di Young, di ogni curva del data set, inoltre all'utente è permesso di selezionare una curva di particolare interesse e di essa verranno mostrati nel dettaglio ulteriori informazioni. Il secondo script realizza due tipi di immagine della superficie analizzata: una mostra la variazione del modulo di Young in scala nanometrica, la seconda ricostruisce l'immagine del campione utilizzando la deviazione standard del modulo elastico come parametro. Di seguito verranno descritti i due software nello specifico.

5.1 Script per l'analisi puntuale delle proprietà nanomeccaniche

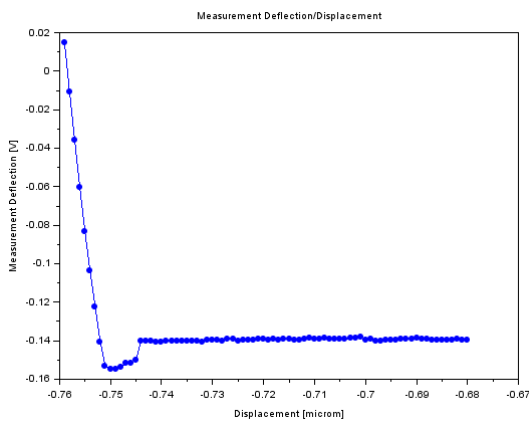


Figura 13: Curva di forza "cruda" ancora da elaborare

Lo script che realizza misure puntuali è denominato Plot. All'utente è richiesto l'inserimento dei seguenti input: il numero di curve che lo script sarà chiamato ad elaborare, il numero della curva scelta per essere analizzata più nel dettaglio, la costante elastica del cantilever utilizzato durante la misura, il coefficiente di conversione per convertire la deflessione, espressa in volt, in micrometri e il

filename, quest'ultimo è una stringa che permette al software di capire quali sono i file salvati nel pc che andranno elaborati. Solitamente il software proprietario del microscopio salva i data set con questa dicitura: "filename001.dat" in cui la maschera numerica indica, in ordine crescente di acquisizione, le curve deflessione-spostamento. Una volta inseriti gli input, all'utente non resta che eseguire l'applicazione ed attendere l'elaborazione dei risultati che richiede tempistiche computazionali differenti a seconda del numero di curve da elaborare

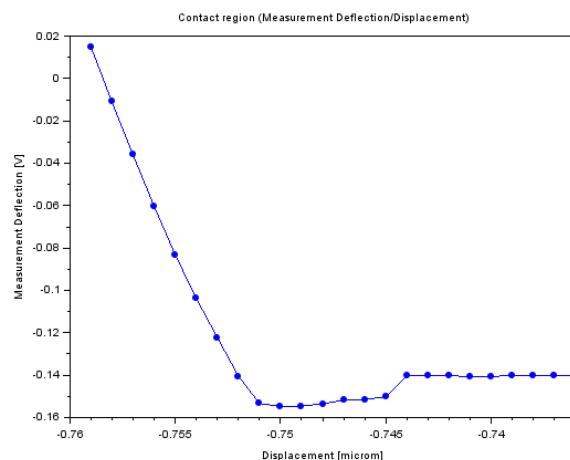


Figura 14: Medesima curva della figura 13, lo script ha individuato il jump in e ha provveduto a scartare gran parte della non-contact region.

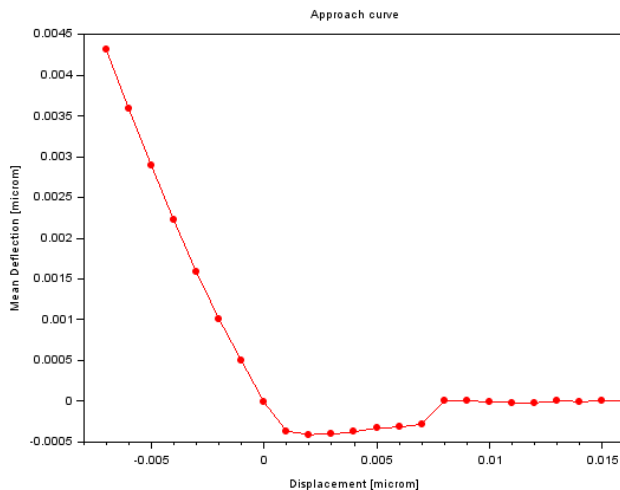


Figura 15: In questa curva il software ha individuato la posizione del contact point ed ha provveduto al relativo offset dello spostamento lungo z

e del campionamento con cui sono state digitalizzate. Il software elabora ciclicamente tutte le curve selezionate. Per ogni curva, in prima istanza, lo script salva in una matrice, i dati di deflessione (espressa in volt) e spostamento lungo z (espresso in μm), ottenuti dal file .dat fornito dal microscopio. Se necessario, divide i dati relativi all'approccio da quelli del ritorno (figura 13). Una volta

ottenuti i dati della curva da elaborare, il software procede con un filtraggio mediano che permette di ridurre le irregolarità della curva dovute al rumore elettronico ed altre sorgenti di artefatti. Dopodiché procede al calcolo della derivata prima della funzione per individuare il cosiddetto jump-in, caratterizzato dalla presenza di una forte pendenza negativa della curva di forza, dovuta alla repentina attrazione a cui è soggetta la leva quando si trova nelle immediate vicinanze del campione, e quindi facilmente riconoscibile con uno studio della derivata. Lo studio della derivata prima della funzione ha il vantaggio di essere di facile applicazione e non incide particolarmente sul tempo macchina necessario all'elaborazione dei dati, ha però lo svantaggio di rischiare, in rari casi, di mislocare il jump-in scambiandolo con un artefatto che porta la curva ad avere variazioni molto repentine della deflessione. Collocato il jump-in, il software ha la possibilità di discernere la non-contact region, priva di dati utili, dalla contact region che invece sarà successivamente elaborata. Individuata l'entità della non-contact region, lo script procede a scartarla dai dati mantenendo solo qualche punto in modo tale che fungano da baseline (porzione della curva in cui il cantilever non viene perturbato) per fornire l'offset della deflessione (figura 14). Viene associata una deflessione nulla al primo punto utile della baseline. Come ricordato in precedenza nei dati grezzi la deflessione è espressa in volt quindi il passo successivo è la conversione dei valori di deflessione da volt a nanometri tramite opportuno coefficiente che viene calcolato come riportato nel capitolo "materiali e

metodi”. In questo modo il software ha a disposizione una matrice a due colonne in cui sono riportati i valori di deflessione in nanometri assunti dalla sonda in relazione allo spostamento lungo z eseguito dallo scanner, è quindi il momento di individuare il contact-point. L’algoritmo per l’individuazione del contact-point esegue una ricerca sequenziale in cui ogni punto della curva deflessione-spostamento sarà un candidato contact-point. Per ogni candidato contact-point i dati deflessione-spostamento vengono convertiti in dati forza-deformazione, che vengono calcolate dall’algoritmo tramite queste relazioni:

$$\delta = (z - z_0) - (d - d_0) \quad (1)$$

$$F_n = d * K \quad (2)$$

In cui z_0 e d_0 sono i valori di deflessione e spostamento relativi al contact-point candidato e K è la costante elastica del cantilever. Si consiglia di non ricorrere al valore di costante elastica nominale fornita dal produttore della sonda ma di ottenere un valore più vicino alla realtà seguendo la metodica descritta nel capitolo “materiali e metodi”, discorso analogo per il valore del raggio di curvatura della punta del cantilever e per il coefficiente di Poisson, che vengono utilizzati dai modelli meccanici per il calcolo del modulo di Young. Ottenuta la deformazione, i dati di contatto della curva di forza vengono fatti aderire al modello meccanico prescelto tramite una funzione creata per lo scopo, che utilizza le relazioni del modello prescelto, mostrate nel capitolo 4, per realizzare

l’andamento teorico della curva (in questo script sono stati implementati il modello di Hertz e il DMT). Il candidato contact-point che possiede i dati che risultano avere il valore più basso di errore quadratico medio rispetto all’andamento ideale predetto dal modello, viene selezionato come contact-point effettivo (Gavara 2016 [3]). Individuato il punto di contatto, viene eseguito un offset dello spostamento che associa alla posizione del contact-point un valore nullo di spostamento dello scanner lungo z;

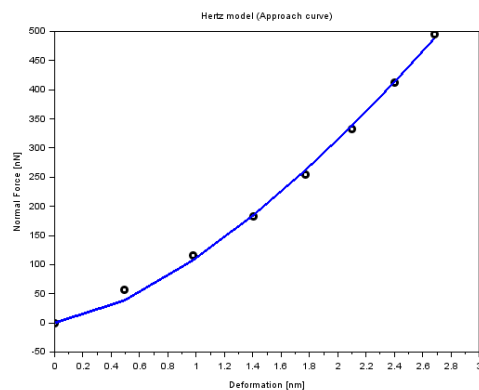


Figura 16: Dettaglio del fitting dei dati della contact region con il modello meccanico di Hertz. I dati sperimentali sono contrassegnati dai punti neri mentre l’andamento teorico è riportato dalla linea in blu.

questo procedimento è essenziale per il calcolo delle deformazioni (figura 15 e formula (1)). Di seguito vengono poi calcolati e mostrati tramite interfaccia grafica, per ogni curva, i valori massimi di deformazione registrati, i valori delle forze di adesione (sia in andata che al ritorno), l'energia dissipata dal cantilever durante l'acquisizione della curva di forza, il modulo di Young calcolato tramite modello di Hertz e infine il modulo di Young calcolato tramite modello DMT. Mostra infine a video i valori medi dei moduli elastici calcolati con l'ausilio dei due modelli meccanici. L'utente può inoltre selezionare una curva del data set di cui verrà visualizzato in dettaglio: l'andamento deflessione-spostamento senza modifiche da parte del software, l'andamento dello spostamento dello scanner rispetto al tempo, la derivata prima della funzione, la curva deflessione-spostamento con offset, la curva forza-spostamento, la porzione di contatto della curva forza-deformazione, la qualità del fitting della curva ai due modelli meccanici di contatto (figura 16) e infine mostra a video la deformazione massima subita dal campione secondo quella curva, le massime forze di adesione registrate sia all'andata che al ritorno, l'energia dissipata durante l'indentazione e i moduli di Young ottenuti coi due modelli.

5.2 Script per l'imaging delle proprietà nanomeccaniche

Il secondo script, è stato ideato per realizzare un'immagine in scala di grigio che rappresenti la variazione del modulo elastico nella superficie analizzata. Lo script ha inoltre la possibilità di realizzare una seconda immagine in scala di grigio che rappresenta la variazione della deviazione standard del modulo elastico. Gli input del software in questo caso sono: la dimensione verticale ed orizzontale dell'immagine che si vuole ottenere, il numero di curve di forza acquisite per ogni singolo punto, la costante elastica della sonda utilizzata, il coefficiente di conversione e la stringa filename per riconoscere i file .dat da elaborare. L'algoritmo per l'elaborazione dei dati è molto simile a quello sviluppato per lo script per l'analisi puntuale delle proprietà nanomeccaniche (sezione 5.1), una differenza è nella struttura dei file .dat che in questo caso possono contenere più curve per singolo file, curve che saranno elaborate e mediate per restituire i valori delle proprietà meccaniche di un singolo punto. Anche in questo software viene eseguito un filtraggio mediano sui dati della

curva e viene ricercato il jump-in con il medesimo metodo dell'analisi della derivata prima della curva di forza descritto nella sezione 5.1. La ricerca del punto di contatto avviene tramite l'algoritmo di ricerca sequenziale basato sulla qualità dell'aderenza al modello meccanico prescelto (Gavara 2016 [3]). Collocato il contact-point il software calcola la deformazione, il modulo elastico e la deviazione standard per ogni punto dell'immagine tramite le medesime relazioni sopracitate. Infine mostra a video il valore medio, minimo e massimo dei moduli elastici ottenuti, il valore minimo e massimo della deformazione subita dal campione e crea le due immagini in scala di grigio del modulo elastico e relativa deviazione standard. Lo script permette di elaborare i dati in due modalità: può analizzare tutte le curve di forza prodotte per singolo punto e quindi realizzare anche un'analisi statistica delle stesse tramite istogrammi, oppure può elaborare la sola curva di forza mediata in automatico per ogni punto dal software proprietario del microscopio. Entrambi gli script sono stati realizzati per elaborare autonomamente fino a 999 file .dat, piccoli accorgimenti possono estendere questo limite a discrezione del programmatore.

6. MATERIALI E METODI

6.1 Setup strumentale

Le misure sperimentali sono state effettuate utilizzando un microscopio a forza atomica Multimode AFM (Digital Instruments, Santa Barbara, CA), controller digitale Nanonis (Zurigo, CH), scanner closed loop nPoint con range di scansione 100x100x15 μm . Il sistema è posto sopra ad una piattaforma per lo smorzamento attivo delle vibrazioni (Integrated Dynamics Engineering GmbH, Oestrich, Germania). I cantilevers utilizzati per la realizzazione delle immagini topografiche e delle curve di forza sono modello RTESPA-525 prodotti dalla Bruker di forma rettangolare e punta piramidale, con una lunghezza di 125 μm , costruite in silicio drogato con antimonio, raggio di curvatura di 8nm e frequenza di risonanza di 525 kHz (dati nominali forniti dal produttore).

6.2 Campione

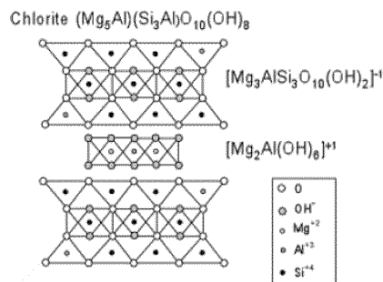


Figura 17: Rappresentazione della struttura di una clorite in cui è evidenziato l'alternarsi di strati TOT (il primo in alto) a strati di tipo brucitico.

Le analisi sperimentali sono state condotte su diversi campioni, circa 5x5 mm, di clinocloro, un fillosilicato appartenente al gruppo della clorite, che cristallizza nel sistema monoclinico e si sfalda in lamelle (figura 18). Sono minerali teneri, di colore verde scuro, formati da strati TOT (tetraedrico-ottaedrico-tetraedrico) alternati a strati di tipo brucitico (figura 17), con caratteristiche meccaniche differenti. I legami chimici all'interno di uno strato sono solitamente di tipo forte mentre i legami che saldano uno strato all'altro sono di tipo debole, perciò è stato possibile sfaldare i campioni tramite nastro adesivo per esporre strati diversi in superficie in modo tale da avere un'area disomogenea dal punto di vista dei materiali che la compongono. Su alcuni campioni sono stati fatti adsorbire alcuni filamenti di DNA per verificare se il software è in grado di realizzare una mappa del modulo elastico in cui è possibile discernere gli eventuali materiali presenti sulla superficie.



Figura 18: Campione di clorite

6.3 Calibrazione dello strumento

Lo strumento è stato calibrato eseguendo una procedura ad hoc. La sonda è stata messa in posizione tramite l'ausilio di un microscopio ottico, e posizionata a circa 100-200 μm dal campione e fatta progressivamente avvicinare a quest'ultimo utilizzando il motore passo a passo. In seguito è stato ottimizzato il sistema laser per la rilevazione delle deflessioni. Un altro passo fondamentale è stata la calibrazione sperimentale della costante elastica del cantilever, del suo raggio di curvatura e del fattore di conversione necessario per convertire i dati di deflessione espressi in volt. In particolare è stato di primaria importanza verificare sperimentalmente il valore di costante elastica della sonda e il raggio di curvatura della stessa, in modo tale da

fornire al software valori più vicini alla realtà rispetto ai dati nominali forniti dal produttore che in alcuni casi presentano tolleranze del 50%. Per ottenere questi dati è stata fatta elaborare dal software una curva di forza presa su di un materiale di riferimento, la grafite. Di questa curva erano già state estrapolate le proprietà meccaniche di interesse, quindi inizialmente al software è stata fatta elaborare la curva con dati della sonda nominali, dopodiché questi parametri sono stati ottimizzati fino ad ottenere un modulo elastico in linea con le previsioni precedenti (18GPa).

6.4 Misure sperimentali

Le analisi sono state condotte su clinocloro. Aree idonee sono state individuate in prima istanza con un microscopio ottico e successivamente sono state condotte misure in modalità a contatto intermittente per realizzare l'immagine topografica delle superfici selezionate. Sulle medesime aree in seguito sono state eseguite delle scansioni in modalità force volume per ottenere le curve di forza da elaborare con gli script sviluppati nell'ambito di questo progetto di tesi. Inoltre gran parte delle misure sono state eseguite impostando nel controller AFM uno z-sweep di 50nm (con z-sweep si intende l'escursione massima consentita allo scanner, che sorregge il campione, lungo l'asse z).

7. RISULTATI E DISCUSSIONE

7.1 Imaging nanomeccanico di clorite + DNA

L'elaborazione delle curve di forza è stata eseguita impostando nel software una costante elastica della sonda pari a 200 N/m, un raggio di curvatura apicale di 8nm, un coefficiente di conversione della deflessione 31,79 nm/V ed è stato ipotizzato un coefficiente di Poisson del materiale pari a 0,4. Infine le elaborazioni dei dati tramite script sono state svolte su notebook HP, con sistema operativo Windows 10 64 bit, processore AMD A10-9600p, scheda video AMD Radeon R5 e 8 GB di RAM DDR3, perciò i tempi di elaborazione riportati per ogni misura si riferiscono a questo setup hardware.

La prima misura qui presentata è stata effettuata su un campione di clorite in cui sono stati lasciati adsorbire sulla superficie alcuni filamenti di DNA. In prima istanza abbiamo investigato, mediante la microscopia a forza atomica, la superficie del campione per identificare le aree più idonee per le prove di imaging nanomeccanico. Successivamente abbiamo ottenuto l'immagine AFM topografica dell'area selezionata (500x500 nm, 256x256 pixel) mediante la modalità a contatto intermittente (tapping mode). Sulla medesima area sono state quindi ottenute dieci curve di forza per ogni punto dell'immagine (16x16 pixel) tramite la modalità force volume, ed infine i dati delle curve di forza sono stati elaborati dal software sviluppato in questo lavoro di tesi, in grado di realizzare il mapping del modulo di Young calcolato, E , tramite il modello di Hertz e il modello DMT e della sua relativa deviazione standard; sono stati ottenuti inoltre i dati inerenti l'entità della deformazione, δ , subita dal campione e quelli inerenti alla distribuzione statistica dei valori del modulo elastico per l'intera immagine. L'elaborazione dei dati da parte del software è stata condotta in due modi: nel primo caso sono state elaborate tutte le 10 curve prodotte per ogni punto immagine, nel secondo caso il software, per ogni punto, ha preso in considerazione solamente la media delle 10 curve generata in automatico, in tempo reale, dal software di controllo dell'AFM.

Di seguito vengono riportate le condizioni ambientali di misura e alcuni parametri di scansione.

Temperatura durante l'analisi: 22,4° C

Umidità relativa: 31%

Pressione ambientale: 1010 mbar

Dimensioni dell'immagine AFM originale = 256x256 [pixel] / 500x500 [nm]

Dimensioni dell'imaging = 16x16 [pixel]

Campionamento: 128 punti/curva

Z-sweep: 50 nm (intervallo di spostamento della punta in z, per ogni curva di forza)

Velocità di scansione in Z = \approx 200 nm/s

Durata elaborazione dati: $\approx 35s$

Sono stati ottenuti i seguenti risultati sull'intera immagine (10 curve per punto analizzate):

Modello	E medio [MPa]	E minimo [MPa]	E massimo [MPa]	δ minima [nm]	δ massima [nm]
Hertz	9440	959	52013	0,78	4,15
DMT	6960	661	42007	0,96	4,15

È bene notare come il modello di Hertz tenda a sovrastimare il valore di modulo elastico ottenuto da ogni curva di forza rispetto al modello DMT; questo perché nel modello di Hertz manca l'ipotesi di una possibile deflessione negativa della sonda, quindi, a parità di forza normale impiegata, rileva deformazioni minori e quindi restituisce un valore di modulo elastico sovrastimato.

Risultati dell'imaging tramite variazione modulo elastico per il modello di Hertz e per il modello DMT:

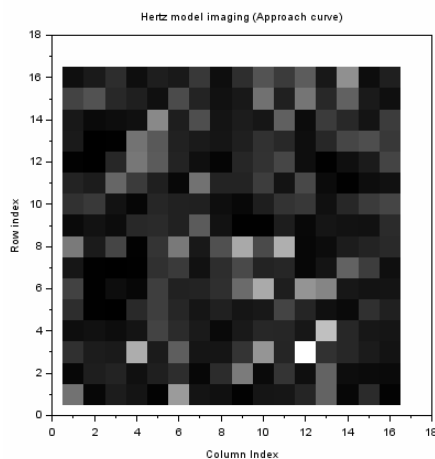


Figura 19: Mapping del modulo elastico calcolato utilizzando il modello di Hertz. Dimensione dell'immagine 16x16 pixel o 500x500nm

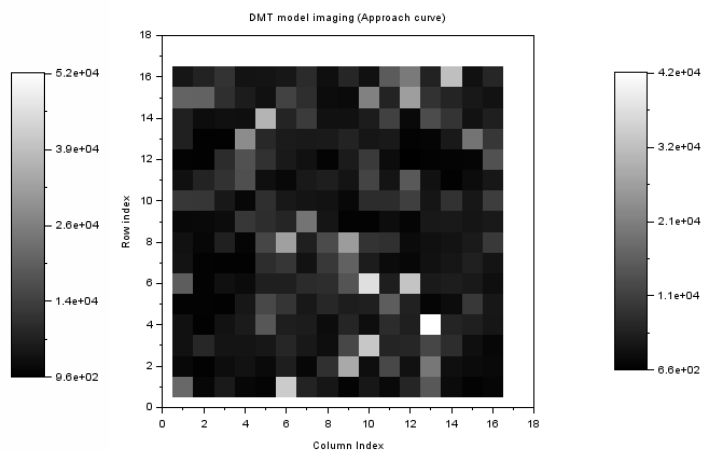


Figura 20: Stessa area della figura 19. Il mapping è realizzato calcolando il modulo elastico tramite il modello DMT. Dimensione dell'immagine 16x16 pixel, 500x500nm

Le immagini in scala di grigio riportano l'andamento del modulo elastico all'interno dell'area analizzata. Il colore bianco identifica il più elevato valore di modulo elastico

riscontrato mentre il colore nero identifica il minore. L'immagine di per sé risulta piuttosto sgranata a causa delle piccole dimensioni (16x16 pixel) è comunque possibile notare un certo contrasto nelle zone occupate da agglomerati di DNA, individuabili dalle macchie di colore più scuro, mentre risulta più ostico discernere i due strati diversi da cui è composta la clorite. La misura è stata condotta cercando di mantenere le deformazioni subite dal campione al di sotto dei 3nm in modo tale da massimizzare il contrasto nelle zone in cui erano presenti agglomerati di DNA e minimizzare l'influenza del substrato minerale. È stato testato e comprovato in una successiva misura che per ottenere contrasto sui due diversi layer che compongono la clorite i valori di deformazione devono attestarsi sopra i 3nm, nelle condizioni sperimentali qui adottate. Non si riscontrano particolari differenze fra gli imaging prodotti con i due differenti modelli nelle condizioni sperimentali adottate, il modello di Hertz in questo particolare caso restituisce un contrasto leggermente migliore rispetto alla controparte realizzata tramite il modello DMT, probabilmente perché i valori di modulo elastico variano all'interno di un intervallo maggiore (0.9-52 GPa).

Le figure 21 e 22 riportano, rispettivamente, l'imaging tramite deviazione standard del modulo elastico per il modello di Hertz e per il modello DMT:

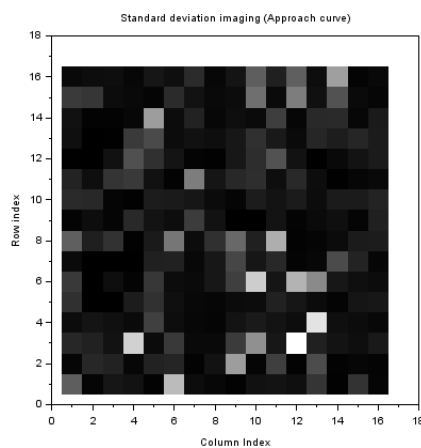


Figura 21: Mapping realizzato attraverso il valore di deviazione standard del modulo elastico calcolato con Hertz. Dimensioni analoghe a quelle della figura 19.

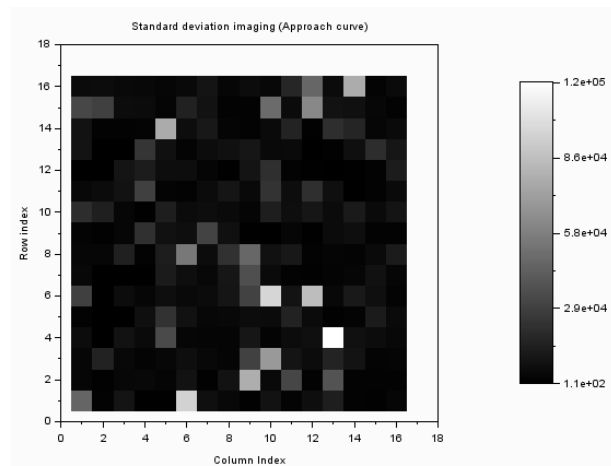


Figura 22: Mapping sulla stessa area alla figura 20, ma la deviazione standard è calcolata su di un modulo elastico ottenuto tramite modello DMT.

È stata prodotta un'immagine utilizzando anche i valori di deviazione standard per ogni singolo punto. In nero è riportato il punto con minore deviazione standard, mentre

in bianco quello con la deviazione maggiore. Dall'immagine si desume che le zone in cui è presente DNA presentano deviazione standard minore, ciò è dovuto alla modalità con cui è stata condotta la misura, focalizzata per risaltare gli agglomerati di acido nucleico. I risultati mostrati nelle figure 21 e 22 provano che, in questo caso, è possibile utilizzare la deviazione standard del modulo elastico come segnale utile per generare un'immagine, almeno per quanto concerne i valori di modulo calcolati tramite modello di Hertz, che ha valori di deviazione standard maggiori di quelli riscontrati nell'utilizzo del modello DMT. Inoltre va ricordato che utilizzare il segnale di deviazione standard per realizzare un'immagine è un procedimento meno robusto dell'utilizzo dei valori reali di modulo, perché suddetti valori non caratterizzano direttamente il materiale nello specifico ma sono il frutto di un'analisi statistica e potrebbero non permettere una corretta distinzione fra i materiali presenti sulla superficie analizzata, soprattutto se questi ultimi hanno valori di modulo elastico simili fra loro.

La figura 23 riporta l'istogramma della distribuzione del modulo elastico calcolato tramite modello di Hertz e relativo all'intera immagine di figura 19.

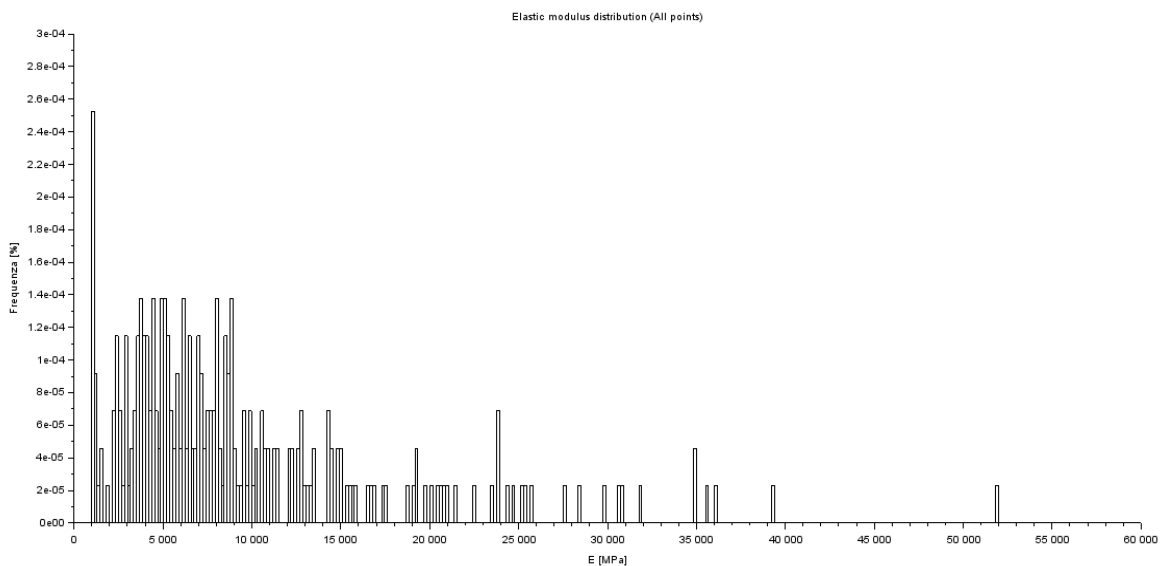


Figura 23: Istogramma della distribuzione del modulo di Young calcolato tramite il modello di Hertz.

Anche questa immagine conferma una maggiore omogeneità dei valori di modulo elastico del DNA, che si attesta intorno a 1GPa, e presenta una distribuzione a

campana molto stretta, mentre la distribuzione del modulo del layer brucitico tende ad essere più ampia.

In figura 24 viene presentato l'istogramma della distribuzione del modulo elastico calcolato tramite modello DMT.

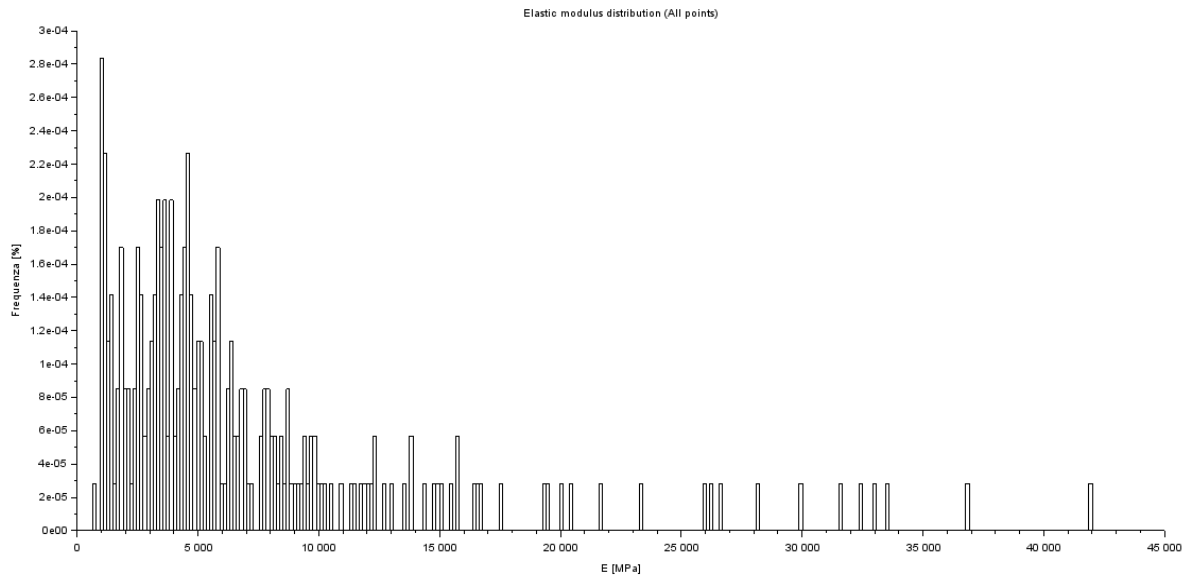


Figura 24: Iistogramma della distribuzione del modulo elastico calcolato con il modello DMT

Dalla figura 23 e 24 si può notare come i valori di modulo calcolati tramite il modello DMT tendano a distribuirsi formando una campana più stretta rispetto ai corrispettivi valori calcolati con il modello di Hertz, perché soggetti a minori errori di calcolo grazie all'assenza di alcune ipotesi semplificative presenti invece nel modello di Hertz.

Di seguito verrà mostrato un confronto fra l'immagine topografica originale e il mapping del modulo elastico elaborato con modello di Hertz.

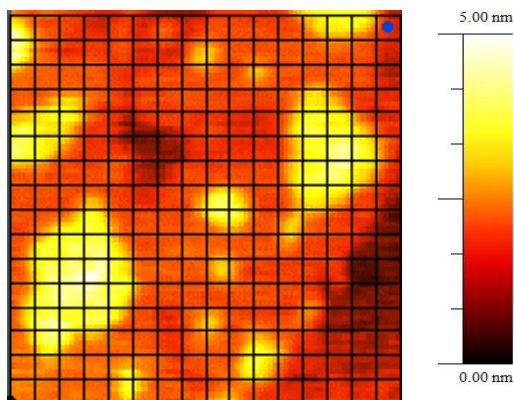


Figura 25: immagine topografica di molecole di DNA agglomerate sulla superficie di una clorite, ottenuta in modalità a contatto intermittente. Dimensione: 500x500 nm

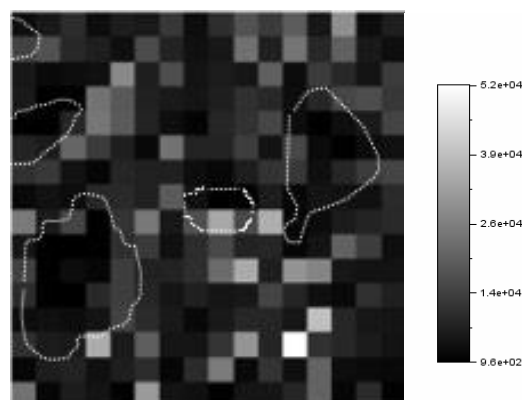


Figura 26: Mapping del modulo elastico. In bianco sono risaltati i contorni degli agglomerati di DNA come si presentano nell'immagine topografica originale

L'immagine della figura 25 rappresenta la nano-topografia del campione di clorite analizzato tramite AFM. È un'immagine quadrata di dimensione 500x500 nm, con un'altezza variabile fra i 2-3 nm. Le molecole di DNA si presentano adsorbite alla superficie del minerale sotto forma di agglomerati. Questi agglomerati sono rappresentati dalle macchie di colore giallo (di dimensioni laterali tra 90nm e 125nm), adsorbiti selettivamente sullo strato di tipo brucitico; inoltre nell'angolo in basso a destra è possibile riconoscere anche una porzione dello strato TOT caratterizzato da un colore più scuro. Nella figura 26 sono stati riportati in bianco, tramite software grafico, i margini degli agglomerati esattamente come si presentano nell'immagine topografica di figura 25. Si nota un buon contrasto in questo caso ed è facile riconoscere le zone in cui è presente acido nucleico anche nel mapping realizzato dallo script sperimentale nonostante la bassa risoluzione. È facile notare che la posizione originale dei suddetti agglomerati è generalmente posizionata più in basso rispetto a quanto riportato nel mapping prodotto dallo script, questo fenomeno è una conseguenza diretta del drift termico avvenuto nel lasso di tempo intercorso fra l'acquisizione topografica e la successiva acquisizione delle curve di forza sulla stessa area. Il fenomeno è strettamente tempo-dipendente, infatti il suo contributo negativo è maggiormente visibile nella parte superiore del mapping poiché le curve di forza vengono ottenute in successione dal basso verso l'alto. Nel mapping non vi è contrasto fra lo strato TOT, presente in basso a destra, e lo strato tipo brucitico, questo perché l'analisi forze volume è stata condotta mantenendo le deformazioni al di sotto dei 3nm circa per non rischiare di danneggiare gli agglomerati di acido nucleico (che hanno uno spessore di

circa 3nm) e di conseguenza renderli pressoché invisibili nel successivo mapping. Per contro però, come constatato anche dalle misure successive presentate in questa tesi, mantenendo le deformazioni al di sotto della soglia dei 3nm non è possibile distinguere i due diversi strati che compongono la clorite.

Come accennato precedentemente i dati relativi alla medesima misura sono stati elaborati dal software anche in una seconda maniera, infatti nel caso sotto riportato il software per ogni punto non ha preso in considerazione tutte e 10 le curve prodotte dalla modalità force volume, bensì è stato chiamato ad elaborare una sola curva media per punto, curva che è stata realizzata in tempo reale dal software di controllo del microscopio a forza atomica. Lo scopo di questa elaborazione era di dimostrare o meno l'affidabilità dei dati presenti nella curva mediata in automatico dallo strumento. Come si evince dai dati e in maniera più diretta dalle immagini prodotte si può concludere che è preferibile evitare di utilizzare la curva mediata dal software poiché si nota chiaramente una netta perdita di contrasto nelle immagini e una dubbia consistenza dei dati numerici relativi alle proprietà nanomeccaniche.

I risultati ottenuti mediante elaborazione della sola curva media per ogni punto sono riportati nella tabella seguente:

Modello	E medio [MPa]	E minimo [MPa]	E massimo [MPa]	δ minima [nm]	δ massima [nm]
Hertz	4208	228	121790	0,14	4,29
DMT	3568	228	137717	0,19	4,29

I mapping del modulo di Young calcolato considerando la sola curva mediata sono riportati di seguito.

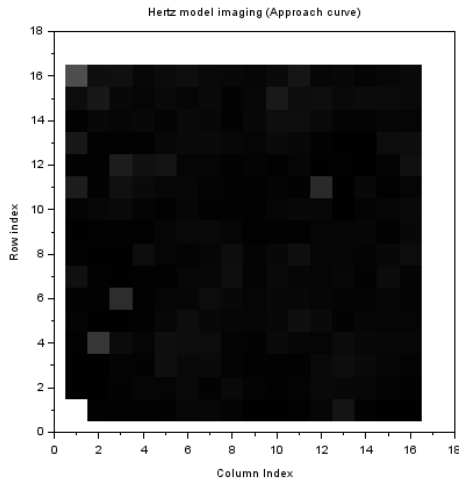


Figura 27: Mapping del modulo elastico ottenuto tramite elaborazione della sola curva di forza mediata in automatico dal microscopio AFM, utilizzando il modello di Hertz

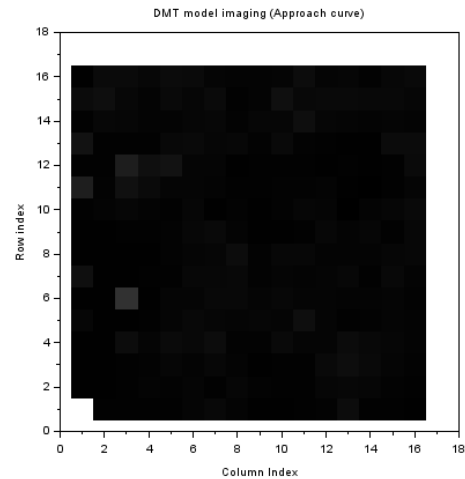


Figura 28: Mapping analogo alla figura 26. Qui i valori di modulo elastico sono stati ottenuti tramite il modello DMT

Il software di controllo del microscopio AFM per ogni punto ha mediato aritmeticamente i valori di deflessione presenti nelle dieci curve di forza acquisite producendo un'unica curva mediata. L'elaborazione delle suddette curve mediate ha prodotto dei mapping di qualità inferiore rispetto ai precedenti, segno evidente che la strategia di analizzare tutte le curve prodotte per punto e successivamente estrapolare la media del modulo di Young è da preferire. La procedura della curva mediata possiede però un vantaggio, la durata dell'elaborazione passa dai 35s necessari per processare 10 curve per punto a 7s utili per gestire la sola curva mediata. Questo risparmio di tempo macchina, irrisorio nel caso in cui i punti analizzati siano meno di un migliaio, potrebbe rivelarsi fondamentale se la mole di dati da elaborare cresce.

7.2 Misura puntuale sullo strato TOT della clorite

Questa misura è stata condotta in modo differente rispetto alla precedente, non è stata prodotta un'immagine topografica, ma è stato analizzato un singolo punto di un layer di tipo TOT della clorite. Su questo punto sono state condotte cinque analisi in successione con valori di forza normale applicata crescente (da 112 nN a 573 nN). Per ogni analisi sono state prodotte venti curve di forza. I dati sperimentali sono stati elaborati con lo script descritto nella sezione 5.1.

Temperatura durante l'analisi: 22,4° C

Umidità relativa: 31%

Pressione ambientale: 1010 mbar

Dimensione = singolo punto

Campionamento: 128 punti/curva

Z-sweep: 50 nm

Durata elaborazione dei dati: 2,8 s

I risultati ottenuti dalle elaborazioni sono riportati nella tabella seguente, dove E è il modulo elastico calcolato e δ l'indentazione:

TOT	E Hertz [MPa]	δ Hertz [nm]	E DMT [MPa]	δ DMT [nm]
1° Acquisizione	4090	3,39	3930	3,5
2° Acquisizione	7692	3,18	7654	3,2
3° Acquisizione	13676	2,78	12489	2,87
4° Acquisizione	14711	3,20	14722	3,24
5° Acquisizione	14073	3,83	11969	4,23

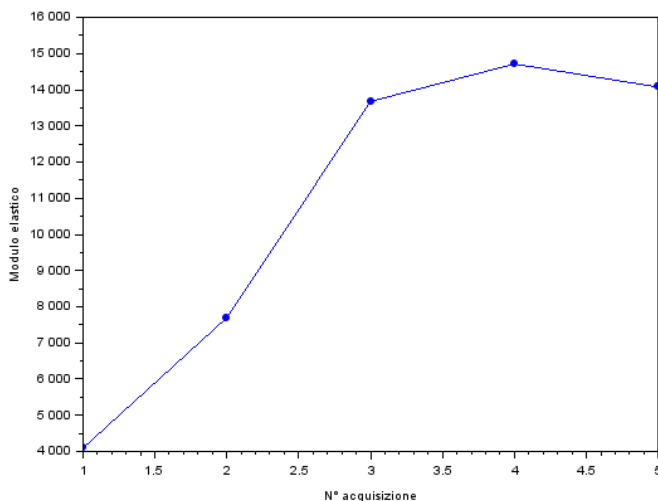


Figura 29: Grafico che mostra l'andamento del modulo elastico nelle cinque diverse acquisizioni. si nota come dalla terza acquisizione il modulo elastico si attesta sui 14GPa

La misura è stata condotta per verificare la dipendenza del modulo di Young alla deformazione subita dal campione, dipendenza verificata per le piccole deformazioni (< 2nm), in quanto se vengono prese in considerazione le prime tre acquisizioni si nota un incremento di circa il 100% del modulo di Young tra un'acquisizione e l'altra (figura 29). Questo è dovuto al fatto

che per piccole deformazioni il comportamento del campione non è elastico lineare, mentre aumentando l'entità della deformazione (acquisizione 3,4,5) questa dipendenza non lineare si perde, poiché si entra in un range di deformazioni in cui il materiale assume un comportamento elastico lineare. Inoltre, un altro dato interessante è fornito dai valori delle deformazioni stesse; come si può desumere dalla tabella, esse non hanno andamento crescente come ci si aspetterebbe, se non dalla 3° acquisizione in poi. Il motivo è il medesimo, le prime due acquisizioni, come già detto, sono state ottenute rimanendo in un campo di deformazioni in cui il materiale non ha comportamento elastico, perciò l'algoritmo per la localizzazione del contact-point non riesce a garantire buoni risultati. Questo è dovuto al fatto che l'algoritmo si basa sulla bontà dell'aderenza dei dati

sperimentali al modello meccanico prescelto, il che genera ovviamente degli errori di calcolo, se la forza applicata e la deformazione non hanno una dipendenza lineare. Inoltre, anche in questa misura si nota come il modello di Hertz tende a sovrastimare il modulo elastico del

campione rispetto al modello DMT; questa tendenza è dovuta all'ipotesi semplificativa del modello che esclude una deflessione della sonda verso il campione e quindi negativa, perciò a parità di forza applicata tende a rilevare deformazioni minori sul campione e di conseguenza genererà un modulo elastico sovrastimato se durante la misura sono presenti grandi forze di attrazione fra la punta della sonda e la superficie del campione.

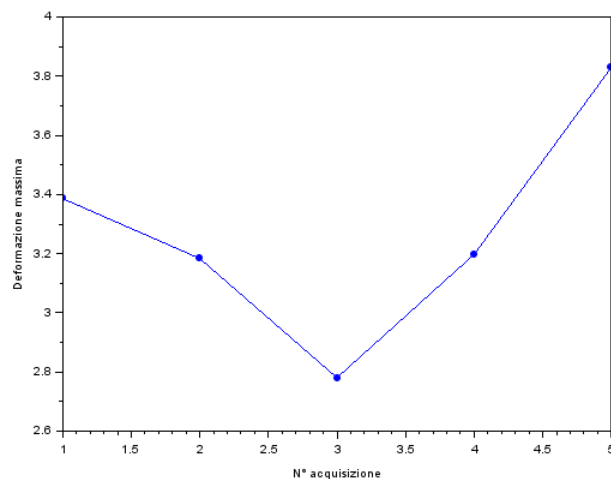


Figura 30: Grafico che mostra l'andamento delle deformazioni riscontrate durante le diverse acquisizioni. I dati sulla deformazione risultano consistenti dalla terza acquisizione e mostrano a partire da essa un andamento crescente

7.3 Misura puntuale sullo strato di tipo brucitico della clorite

La misura è analoga alla precedente, con la stessa modalità di acquisizione, ma condotta su di un layer di tipo brucitico. Sono state condotte cinque analisi in successione con valori di forza normale applicata crescente (da 127 nN a 522 nN). Per

ogni analisi sono state prodotte venti curve di forza. Lo scopo della misura era di riuscire a comprendere quali erano i parametri di scansione che garantivano il massimo contrasto, in termini di modulo elastico, fra il layer TOT e il layer tipo brucitico.

Temperatura durante l'analisi: 22,4° C

Umidità relativa: 31%

Pressione ambientale: 1010 mbar

Dimensione = singolo punto

Campionamento: 128 punti/curva

Z-sweep: 50 nm

Durata elaborazione dei dati: 2,8s

I risultati ottenuti dalle elaborazioni sono riportati nella tabella seguente, dove E è il modulo elastico calcolato e δ l'indentazione:

Layer tipo brucitico	E Hertz [MPa]	δ Hertz [nm]	E DMT [MPa]	δ DMT [nm]
1° Acquisizione	4164	3,5	3995	3,6
2° Acquisizione	7730	3,16	7399	3,24
3° Acquisizione	12330	2,8	11170	2,93
4° Acquisizione	18427	2,5	17150	2,59
5° Acquisizione	27325	2,18	25911	2,27

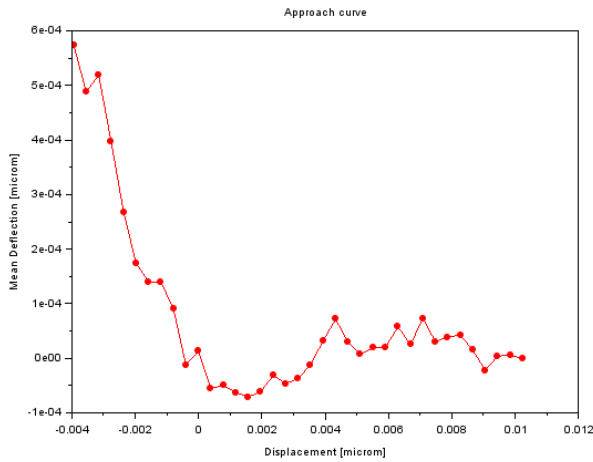


Figura 31: Grafico che mostra la curva di forza corrispondente alla prima acquisizione su strato tipo brucite, da cui derivano dati sulla deformazione discutibili.

Dai risultati di questa misura si conferma la dipendenza non lineare fra deformazioni e forza applicata per piccole deformazioni (figura 31), già ipotizzata dalla misura precedente; conclusioni analoghe anche per la tendenza del modello di Hertz a sovrastimare il valore del modulo elastico e la deformazione conseguente.

I parametri con cui condurre l'analisi sperimentale per massimizzare il contrasto nel mapping sono risultati essere quelli della 5° acquisizione, di seguito viene mostrato il confronto in scala di grigio, fra il layer TOT e il tipo brucitico.

Il mapping di figura 31 è diviso in due righe, la riga soprastante si riferisce al layer brucitico con le cinque diverse acquisizioni disposte in ordine crescente da sinistra verso destra, la riga sottostante riporta il modulo elastico del layer TOT. In nero viene riportato

il valore di modulo minore mentre in bianco il maggiore. Si nota chiaramente che il contrasto maggiore tra i due strati della clorite si ha con i valori di forza impostati nella quinta ed ultima acquisizione.

Hertz model imaging (Approach curve)

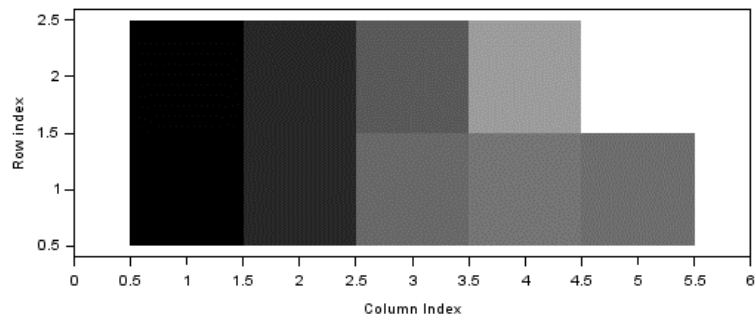


Figura 32: Mappig del modulo elastico ottenuto dalle cinque acquisizioni puntuali, riportate in ascissa, eseguite sui due diversi strati della clorite, in ordinata. Nella prima riga sono riportati i dati dello strato tipo brucitico, nella seconda quelli dello strato TOT. Questa mappa a differenza delle precedenti non ha significato spaziale.

7.4 Misura puntuale su DNA adsorbito sullo strato di tipo brucitico

Si tratta anch'essa di una misura puntuale. Il punto prescelto della superficie appartiene ad un agglomerato di DNA adsorbito sul campione, in particolare su di uno strato di tipo brucitico. Non sono stati prodotti mapping ma l'attenzione è stata focalizzata sull'andamento della curva di forza ottenuta.

Temperatura durante l'analisi: 22,2° C

Umidità relativa: 25%

Pressione ambientale: 1012 mbar

Dimensione = singolo punto

Campionamento: 128 punti/curva

Z-sweep: 50 nm

Durata elaborazione dei dati: 9s

Risultati ottenuti dall'elaborazione diretta del software di tutta la curva di figura 33

	E Hertz [MPa]	E DMT [MPa]	δ massima [nm]
DNA su layer brucitico	933	904	7,22

Questa analisi conferma, per quanto riguarda il DNA, un modulo elastico che si attesta a circa 1GPa, ma è bene portare l'attenzione sui dati forniti dall'andamento della curva di forza ottenuta, riportata di seguito; per poter interpretare correttamente la deformazione massima restituita dal software.

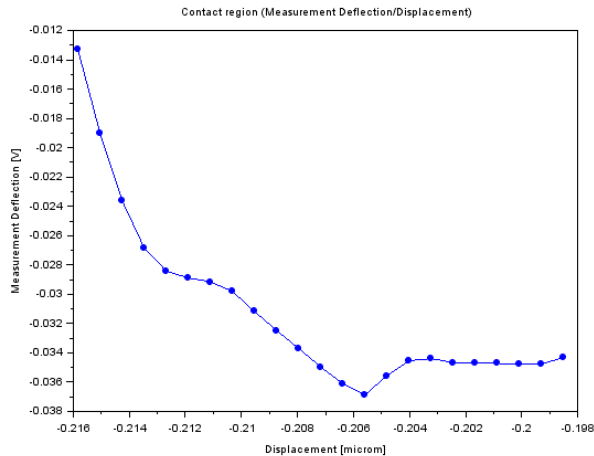


Figura 33: Curva di forza ottenuta su agglomerato di DNA.

Si può notare che la curva in questione (figura 33) si discosta dalle altre perché presenta un doppio andamento nella sua contact-region. Solitamente attorno al contact point si ha un andamento non lineare della curva seguito dalla classica porzione lineare della contact region. In questa curva, dopo il contact point vi

è un andamento lineare approssimabile

ad una retta, ma aumentando ulteriormente la forza normale applicata si presenta un flesso e dopo di esso un nuovo andamento lineare ma con coefficiente angolare differente. L'ipotesi è che per le piccole deformazioni precedenti al flesso i dati prodotti dall'analisi siano riferibili all'agglomerato di DNA, infatti la deformazione subita dal campione in corrispondenza del flesso è di circa 3nm (in totale accordo con i dati forniti da precedenti misure). La figura 34 mostra il reale profilo della sezione della zona sondata; si può notare lo strato TOT, sopra di esso lo strato di tipo brucitico con uno spessore di circa 0,5 nm e infine adsorbito al di sopra di quest'ultimo troviamo

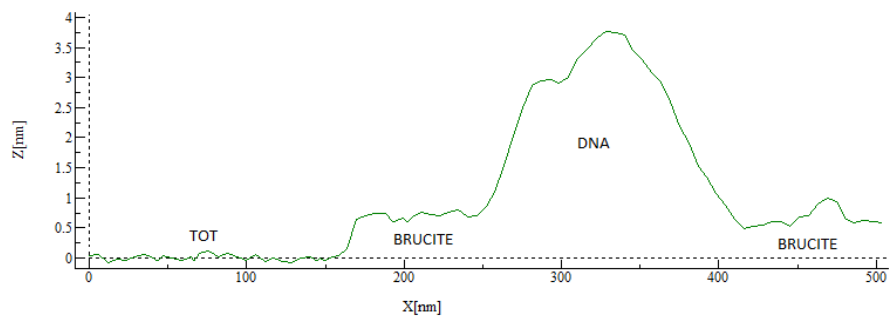


Figura 34: Grafico che mostra il profilo laterale del campione. Da notare lo spessore del DNA indicato nella figura in perfetto accordo con i risultati delle elaborazioni.

l'agglomerato di DNA con uno

spessore di circa 3 nm, valore confermato anche dall'elaborazione dei dati da parte del software. Proseguendo con l'indentazione la sonda entra in contatto con il layer di tipo brucitico sottostante e perciò i dati riportati dal flesso in poi sono attribuibili al contributo di quest'ultimo. La curva in oggetto dimostra chiaramente l'importanza del settaggio scrupoloso dei parametri di acquisizione sperimentali, perché esagerando con le deformazioni si possono creare artefatti e perdite di contrasto in un eventuale

mapping delle proprietà nanomeccaniche, mentre se si deforma poco il campione si rischia di giacere nel range di deformazioni in cui il materiale non si comporta in maniera lineare, è necessario perciò trovare il giusto compromesso per ottenere dati consistenti.

7.5 Misura puntuale su DNA

Anche in questo caso è stato condotto uno studio puntuale su una curva di forza acquisita posizionandosi al di sopra di un agglomerato di DNA e, memori dei risultati della misura precedente, è stata mantenuta una massima forza di acquisizione che portasse il campione a subire una deformazione al di sotto della soglia dei 3nm, per evitare che il substrato minerale sottostante inficiasse la misura stessa.

Sotto vengono riportate le condizioni ambientali di misura e alcuni parametri di scansione.

Temperatura durante l'analisi: 22,4° C

Umidità relativa: 31%

Pressione ambientale: 1010 mbar

Campionamento: 128 punti/curva

Z-sweep: 50 nm (intervallo di spostamento della punta in z, per ogni curva di forza)

Velocità di scansione in Z \approx 200 nm/s

Durata elaborazione dei dati: 7s

I risultati ottenuti dalla misura puntuale eseguita sull'agglomerato di acido nucleico sono mostrati nella tabella che segue.

	E Hertz [MPa]	E DMT [MPa]	δ massima [nm]
DNA	802	895	2,64

Dal dato sulla deformazione massima si desume che le condizioni sperimentali adottate erano corrette, infatti con 2,64 nm di deformazione massima, la presenza del

substrato minerale su cui giace l'agglomerato non ha influenzato i dati. I valori ottenuti sul modulo elastico confermano le precedenti misure, attestandolo a 800-900 MPa a seconda del modello, valori leggermente inferiori rispetto all'analisi presentata nella sezione 7.4 in cui, indubbiamente, lo strato minerale sottostante aveva influenzato i dati. Si può però notare che i valori qui presentati non si discostano in maniera netta da quelli della sezione precedente, segno che i modelli meccanici di contatto hanno operato un fitting più aderente ai dati di contatto relativi all'acido nucleico limitando fortemente l'influenza del substrato minerale sottostante.

Di seguito viene mostrata la curva di approccio ottenuta sul DNA.

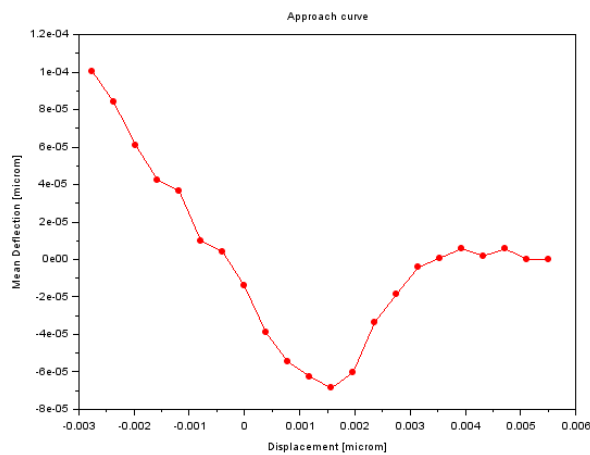


Figura 35: Curva di forza ottenuta su DNA

La curva di forza in esame risulta più disturbata della precedente, è comunque possibile riscontrare l'assenza del flesso in contact region (figura 35) presente nella sezione 7.4, assenza dovuta al fatto che in fase sperimentale abbiamo mantenuto una più bassa forza di indentazione.

La qualità dell'aderenza ai modelli meccanici di contatto è mostrata nelle figure che seguono.

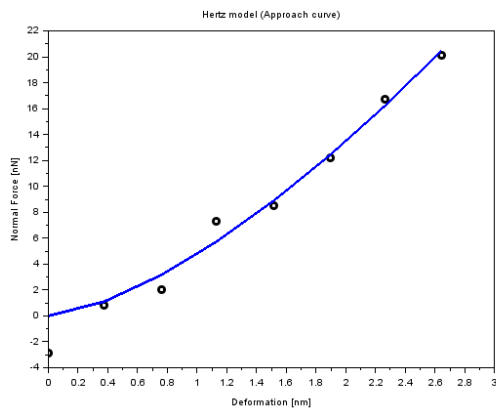


Figura 36: Aderenza al modello di Hertz. I dati sperimentali sono identificati dalle sfere nere mentre l'andamento teorizzato dal modello è riportato in blu.

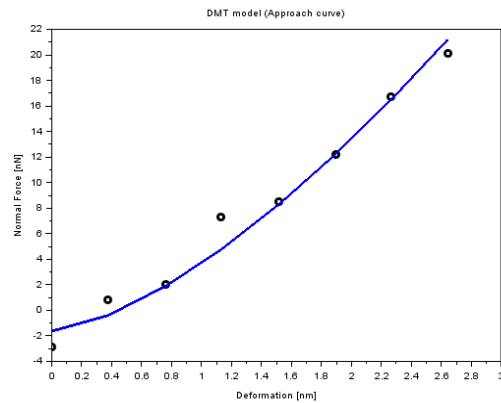


Figura 37: Aderenza al modello DMT. I dati sperimentali sono identificati dalle sfere nere mentre l'andamento teorizzato dal modello è riportato in blu.

La qualità dell'aderenza è molto simile in entrambi i modelli implementati. Il modello DMT in questo caso sembra approssimare meglio i dati sperimentali soprattutto per quanto riguarda il primo punto di contatto fra la punta del cantilever e la superficie del campione. Il contatto, come si evince dai dati sperimentali, avviene ad un valore negativo di deflessione, il modello di Hertz posiziona invece il contatto al valore zero della deflessione in attinenza con la teoria propria del modello in questione.

8. CONCLUSIONI

Negli ultimi anni vi è stato un forte sviluppo nell'utilizzo della microscopia a forza atomica nell'ambito delle misure di proprietà meccaniche su scala nanometrica. Questo sviluppo era inizialmente stato ostacolato dalla mancanza di approcci automatizzati che garantissero la necessaria robustezza per l'elaborazione dei dati e che riducessero al minimo gli interventi da parte dell'utilizzatore. In questa tesi sono stati presentati due script, il primo in grado di ottenere misure puntuali di una vasta gamma di proprietà meccaniche, tra le quali: forza normale esercitata sul campione, modulo elastico estratto dalle curve, deformazioni subite dal campione, energia dissipata dal cantilever durante l'acquisizione della curva, e l'entità delle forze di adesione se presenti. Il secondo script invece realizza immagini in scala di grigio della distribuzione del modulo di Young sulla superficie del campione e della relativa deviazione standard. Grazie ai software qui presentati l'utente, attraverso l'inserimento di semplici input, è in grado di valutare e misurare sia le interazioni fra sonda e campione sia le proprietà meccaniche su scala nanometrica di una mole considerevole

di dati, senza la necessità di interventi diretti sui dati grezzi del microscopio. Gli script si sono rivelati robusti, in grado di processare ed elaborare in modo soddisfacente anche dati appartenenti a curve soggette a forte rumore elettronico e termico e con tempi computazionali relativamente brevi. Inoltre con piccoli accorgimenti è possibile implementare nell'algoritmo di ogni script qualsiasi modello meccanico di contatto desiderato oltre ai già presenti Hertz e DMT, così da poter adattare il software ad ogni situazione, infine è possibile estendere la capacità di elaborazione automatica dei dati ad un numero di curve a discrezione del programmatore (abbiamo svolto test con 20000 curve da elaborare, con un tempo macchina risultante di circa 30 minuti). I risultati ottenuti si sono rivelati soddisfacenti, soprattutto per quanto riguarda le misure puntuali, mentre il mapping ha sofferto: lo scarso contrasto offerto dal numero limitato di grigi che la funzione di Scilab da noi utilizzata offriva, il setup sperimentale rigido obbligato dalla necessità di limitare gli effetti dei disturbi e inoltre, la maggior parte delle misure sperimentali è stata soggetta ad un notevole drift termico che ci ha precluso la produzione di immagini topografiche più grandi e di conseguenza i mapping prodotti sono di piccole dimensioni e scarsa risoluzione. Limitando gli effetti del drift, gli script realizzati in questo progetto di tesi possono essere un valido strumento di analisi e ricerca soprattutto nell'ambito della bioingegneria e delle nanotecnologie.

9. BIBLIOGRAFIA

- [1] D.C.Lin, E. K. Dimitriadis, F. Horkay, 2007, Robust strategies for automated AFM force curve analysis-I, *Journal of biomechanical engineering*, pp. 430-440
- [2] D.C.Lin, E. K. Dimitriadis, F. Horkay, 2007, Robust strategies for automated AFM force curve analysis-II, *Journal of biomechanical engineering*, pp. 904-912
- [3] N. Gavara, 2016, Combined strategies for optimal detection of the contact point in AFM force indentation curves obtained on thin samples and adherent cells, *Scientific reports* 6, 21267; doi:10.1038/srep21267

- [4] B.Cappella, G.Dietler, 1999, Force-distance curves by AFM, Surface science reports 34, pp. 1-104
- [5] V. L. Mironov, Fondamenti di microscopia a scansione di sonda, Accademia russa delle scienze, Istituto per la fisica delle microstrutture, tradotto dalla versione inglese edizione 2004.
- [6] A. Noy, D.V. Vezenov, C.M. Lieber, 1997, Chemical force microscopy, Annu. Rev. Mater. Sci., pp 381-421
- [7] P. Trtik, J. Kaufmann, U. Volz, 2012, On the use of peak-force tapping atomic force microscopy for quantification of the local elastic modulus in hardened cement paste, Cement and Concrete Research 42, pp. 215-221
- [8] G. Valdrè, D. Moro, 2008, 3D finite element analysis of electrostatic deflection and shielding of commercial and FIB-modified cantilevers for electric and Kelvin force microscopy: II. Rectangular shaped cantilevers with asymmetric pyramidal tips, Nanotechnology 19, 9 pp.
- [9] G. Valdrè, D. Moro, 2008, 3D finite element analysis of electrostatic deflection and shielding of commercial and FIB-modified cantilevers for electric and Kelvin force microscopy: I. Triangular shaped cantilevers with asymmetric pyramidal tips, Nanotechnology 19, 9 pp.
- [10] K. L. Johnson, K. Kendall, A. D. Roberts, 1971, Surface energy and the contact of elastic solids, Proc. R. Soc. Lond. A. 324, pp. 301-313
- [11] B. V. Dejarguin, V. M. Muller, YU. P. Toporov, 1975, Effect of contact deformations o the adhesion of particles
- [12] R. W. Carpick, D. F. Ogletree, M. Salmeron, 1999, A general equation for fitting contact area and friction vs load measurement, Journal of colloid and interface science 211, pp. 395-400
- [13] O. Pietrement, M. Troyon, 2000, General Equations Describing Elastic Indentation Depth and Normal Contact Stiffness versus Load, Journal of colloid and interface science 226, pp. 166-171
- [14] D. Maugis, 2001, Adhesion of solids: mechanical aspects, 41 pp.

- [15] M. A. Poggi, E. D. Gadsby, L. A. Bottomley, W. P. King, E. Oroudjev, H. Hansma, 2004, Scanning probe microscopy, *Anal. Chem.* 76, pp. 3429-3444
- [16] H. J. Butt, B. Cappella, M. Kappl, 2005, Force measurements with the atomic force microscope: technique interpretation and applications, *Surface science reports* 59, pp. 1-152
- [17] D. C. Lin, F. Horkay, 2008, Nanomechanics of polymer gels and biological tissues: A critical review of analytical approaches in the Hertzian regime and beyond, *Soft matter* 4, pp. 669-682
- [18] N. Moldovan, Z. Dai, H. Zeng, 2012, Advances in manufacturing of molded tips for scanning probe microscopy, *Journal of microelectromechanical systems*, Vol. 21, NO. 2, pp. 431-442