



VIAGGIO NEL MONDO DELLE ULTRASTRUTTURE NELLA SCIENZA DEI MATERIALI E NELLA SCIENZA DELLA VITA: STORIA DEL CAMPIONE DALL'ENTRATA NEL LABORATORIO DI MICROSCOPIA ELETTRONICA ALLA PRODUZIONE DELLE IMMAGINI

Microscopia elettronica analitica

La microscopia elettronica a scansione (Scanning Electron Microscopy/Microscope: SEM) e la microscopia elettronica a trasmissione (Transmission Electron Microscopy/Microscope: TEM) trovano, grazie al loro elevatissimo potere risolutivo, la naturale collocazione come strumenti elettivi di indagine del mondo delle ultrastrutture e dei nanomateriali. È così possibile, utilizzando un SEM, ottenere immagini della superficie di un campione fino alla nano-scala, mentre con un TEM si può osservare l'interno di un campione, fino ad arrivare con l'Alta Risoluzione (High Resolution TEM: HRTEM), a definire i piani atomici e anche la disposizione degli atomi nei reticoli cristallini. All'analisi di immagine, la microscopia elettronica analitica associa informazioni preziosissime di natura spettroscopica e diffrattometrica. In questo modo un SEM dotato di spettrometro a dispersione di energia dei raggi X (Energy Dispersive Spectroscopy: EDS) può fornire la composizione in elementi del campione in associazione alle informazioni topografiche. Un TEM può essere fornito, oltre che di EDS, anche di un filtro dell'energia degli elettroni, che consente di effettuare un secondo tipo di spettroscopia, detta "a perdita di energia degli elettroni" (Electron Energy Loss Spectroscopy: EELS), la quale non solo permette di ottenere la composizione in elementi del campione, ma analizzando la struttura fine dei picchi della soglia di un elemento può fornire informazioni dettagliate anche sui legami chimici dell'elemento stesso con gli altri atomi del campione. Infine il TEM, tramite le informazioni diffrattometriche, permette di studiare la struttura del reticolo di un cristallo e di individuare le parti amorfe. Escludendo la EDS, disponibile nelle medesime modalità in entrambe le forme di microscopia elettronica, pur con le dovute differenze legate alla regione di generazione dei raggi X, risulta evidente che i SEM e i TEM forniscono informazioni alternative e complementari e sono entrambi indispensabili per una completa caratterizzazione delle strutture nanometriche. Risulta altresì chiaro dove risiede il punto di forza della microscopia elettronica rispetto alle innumerevoli e utili metodiche di indagine analitica: la possibilità unica di associare le informazioni date dall'analisi di immagine ad informazioni di altra natura quali, ad esempio, quelle spettroscopiche sulla composizione in elementi o quelle diffrattometriche sulla struttura cristallina o amorfa del campione, il tutto con una risoluzione spaziale elevatissima, che può arrivare fino alla "nano-

scala", ovvero a dimensioni nanometriche. Inoltre, al contrario di altre tecniche pur utilissime ma indirette, la microscopia elettronica è di insostituibile aiuto nell'analisi di strutture nanometriche ingegnerizzate, poiché è l'unica in grado di dare un riscontro diretto e immediato sul risultato di un processo di sintesi e di crescita dei campioni.

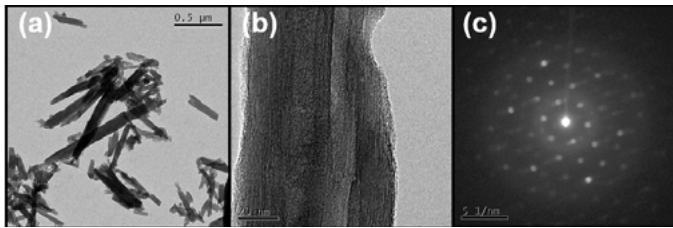
Limitandoci al TEM, tutta la teoria e i risultati migliori di analisi si ottengono nella condizione di singola interazione tra il fascio primario e il campione. Questo impone che il campione sia estremamente sottile, molto inferiore al singolo cammino libero medio dell'elettrone nel mezzo costituito dal campione alla fissata energia del fascio primario impiegata nella misura. Non sempre è possibile garantire questa condizione, ma il criterio da seguire, in fase di preparazione del campione, è di renderlo il più sottile possibile, pur garantendo una stabilità meccanica, e termica, sufficiente.

Scienza dei materiali

Nella scienza dei materiali il fattore più importante è la risoluzione spaziale e per questo si usano energie del fascio primario elevate (200 keV o più), con configurazioni delle lenti magnetiche, in particolare della lente principale del microscopio, la lente obiettivo, che favoriscono il massimo potere risolutivo, anche a scapito del contrasto.

In figura 1 è mostrato un esempio di analisi di immagine e di diffrattogramma elettronico ottenuti con un TEM su un campione di nanotubi di allumino-silicati: in figura (a) è mostrata un'immagine a basso ingrandimento; in (b) un'immagine che permette visualizzare i piani degli atomi; in (c) un pattern di diffrazione ottenuto con la tecnica della nanoarea del fascio elettronico. Nell'esempio riportato, ottenere un elevatissimo ingrandimento e una vera immagine HRTEM è impossibile, poiché il campione tende a degradarsi e a diventare facilmente amorfo sotto il fascio elettronico. Malgrado ciò, si intuisce subito come il TEM consenta di ottenere informazioni che altre tecniche, anche microscopiche, non consentono. Poter vedere dentro gli oggetti permette, ad esempio, di misurare il canale interno dei nanotubi e il numero delle pareti (dati importanti per alcune applicazioni tecnologiche degli stessi), identificare i nanotubi bamboo-like (con i piani atomici che si richiudono trasversalmente, indebolendo la struttura e rendendo i nanotubi poco efficaci come materiali di rinforzo negli elementi compositi, usati oramai ovunque laddove si richiedano prestazioni elevate: campo aerospaziale, motoristico, protesico, solo per citarne alcuni). Inoltre la diffrazione elettronica consente di identificare un materiale in maniera univoca. Questo permette, ad esempio, di riconoscere le forme allotropiche dello stesso materiale (uguale composizione chimica, ma diversa disposizione degli atomi), tipo il crisotilo (una forma di amianto) e l'antigorite.

Figura 1: Esempi di applicazioni TEM alla scienza dei materiali

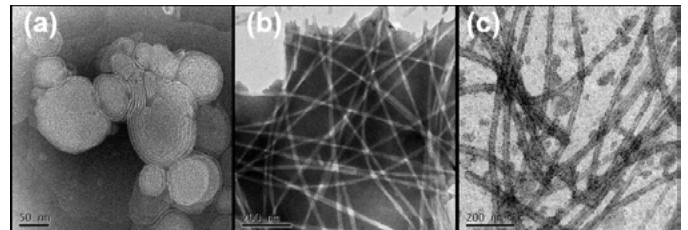


Immagini e diffattogramma di nanotubi allumino-silicati: (a) barra = 0,5 μm ; (b) barra = 20 nm; (c) barra = 5 nm^{-1}

Scienza della vita

Nella scienza della vita il parametro più importante non è la risoluzione ma il contrasto di immagine. Infatti i campioni in studio in tale settore, siano essi sezioni di materiale organico o di cellule, molecole di DNA, polipeptidi, polimeri, coniugati o vescicole, sono caratterizzati da una composizione in elementi leggeri (soprattutto idrogeno, carbonio, ossigeno, azoto) con basso numero atomico, tutti con una bassa probabilità di scattering dell'elettrone primario, che si ripercuote in un basso contrasto. Per tale motivo, a meno che non si possa disporre di un crio-TEM, in cui il campione viene vetrificato e tenuto alla temperatura dell'azoto liquido, è indispensabile ricorrere a tecniche di colorazione del campione stesso, che consistono nell'impiego di sostanze contenenti elementi ad alto numero atomico (tipo tungsteno, lantanio, gadolinio) che rendono visibili i campioni stessi. Nella colorazione negativa il colorante si dispone intorno al campione, che così apparirà chiaro su sfondo scuro, mentre nella colorazione positiva il colorante si lega al campione, che apparirà scuro su sfondo chiaro. In figura 2 sono mostrati esempi di immagini di campioni della scienza della vita: vescicole lipidiche (liposomi), aventi strutture anche lamellari e multivescicolari, con colorazione negativa e molecole di polipeptidi con colorazione negativa e positiva. In tutti i campioni, senza colorazione non si sarebbe osservato assolutamente nulla. Inoltre, la possibilità di vedere attraverso il campione rende, di nuovo, il TEM uno strumento di investigazione unico.

Figura 2: Esempi di applicazione TEM alla scienza della vita



Vescicole e macromolecole: (a) liposomi, barra = 50 nm; (b) polipeptidi con colorazione negativa, barra = 200 nm; (c) polipeptidi con colorazione positiva, barra = 200 nm

Un solo esempio: nella figura 2 (a), con il TEM è possibile misurare lo spessore della membrana, la disposizione e la dimensione del doppio strato lipidico. Gli stessi liposomi multivescicolari, così spettacolari da un punto di vista estetico, sono in realtà un prodotto di sintesi non idoneo per gli scopi tecnologici e applicativi (creare una vescicola che consenta il trasporto di farmaci o materiale genetico, anche selettivo verso e dentro organi e strutture cellulari bersaglio): il TEM fornisce tale informazione con una semplice immagine.

Qualche considerazione di carattere generale

Tutti i campioni si danneggiano durante l'interazione con il fascio elettronico. Nella scienza dei materiali il fenomeno è meno pronunciato rispetto alla scienza della vita, ma è comunque sempre necessario porre molta cura per evitare che durante l'analisi al TEM i campioni non si danneggino al punto da modificare la morfologia, la struttura e i legami chimici, il che condurrebbe a risultati completamente errati. Fase estremamente delicata è quindi quella della preparazione del campione, perché i microscopi sono onesti, ma al contempo severi e spietati: quello che uno ha preparato e inserito lungo l'asse ottico, loro faranno vedere. Esistono decine, se non centinaia, di metodiche e tecniche di preparazione dei campioni, da utilizzare nelle specifiche circostanze, ma in definitiva ogni campione è unico, farà storia a sé e dovrà essere trattato adattando la metodica scelta al caso in esame.

PER ULTERIORI INFORMAZIONI

Contatti: dmil@inail.it

PAROLE CHIAVE

SEM; TEM; HRTEM; EDS; EELS.