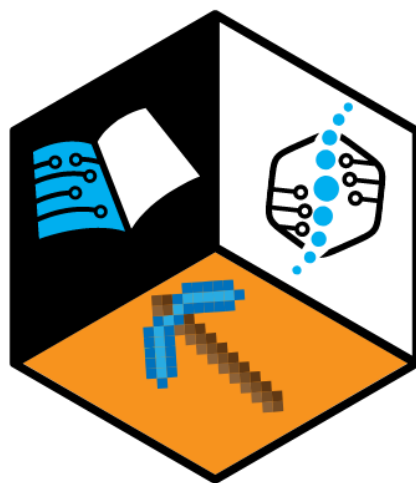


NANOWARE Curriculum

MODUL 4: **CUM VEDEM NANOPARTICULELE?**

DELIVERABLE: R1/T1.1



NANOWARE

31.10.2022

Pammukale University

Autor: PAU

Project Number: 2021-2-PL01-KA220-SCH-000051200



**Co-funded by
the European Union**

The European Commission's support for the production of this publication does not constitute an endorsement of the contents, which reflect the views only of the authors, and the Commission cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein.

Cuprins

1. Introducere in Modul	3
2. Cum vedem nanoparticulele?	4
2.1 Microscopul.....	5
3. Ce putem vedea cu un microscop optic/luminos?	6
4. Cum putem vedea atomii? Microscopul electronic	9
4.1 Microscopia electronica.....	12
4.2 Probele la Microscop.....	13
4.3 Procesare prin microscopie optica.....	14
4.4 Presentare generala a microscopelor	15
5. Referente.....	16

1. Introducere in Modul

După o scurtă descriere a limitelor vederii ochiului uman, în acest modul sunt introduse diferite tipuri și principii de funcționare ale microscopelor. Metodele de vizualizare și analiză pentru nanoparticule sunt explicate în detaliu. Modulul este complet cu o prezentare generală a tipurilor de microscopie și a zonelor de utilizare ale acestora.

Descriere

În acest modul, elevii vor învăța metode de vizualizare și analiză pentru nanoparticule, descrierea acestora și principiile operaționale.

Scopul

Scopul acestui modul este de a crește gradul de conștientizare cu privire la:

- limitele vederii ochiului uman,
- scopul utilizării microscopului luminos și a altor metode de vizualizare precum SEM, TEM, AFM, STM,
- diferențele dintre toate metodele microscopice.

Obiectivele de învățare

Elevii vor fi capabili:

- să explice limitele vederii ochiului uman,
- descrie scopul utilizării microscopului luminos și principiile sale de funcționare
- descrie de ce nu putem vizualiza atomii folosind microscopul luminos,
- explice metodele de vizualizare pe care le putem folosi pentru a vizualiza atomii și nanoparticulele

Rezultatele învățării

După finalizarea cu succes a acestui modul, elevii vor învăța:

- limitele vederii ochiului uman,
- scopul utilizării microscopelor și tipurile și principiile de funcționare ale acestora;
- metode de vizualizare pe care le putem folosi pentru a vizualiza atomii și nanoparticulele.

Durata estimată

Finalizarea modului va dura 1,5 ore. Sunt implicate o secțiune de prelegeri de 30 de minute și o sesiune de laborator de 1 oră.

2. Cum vedem nanoparticulele?

Limitele vederii ochiului uman

Ochiul uman nu poate vedea mai mic de 40 μm (micrometru). ($1 \mu\text{m} = 0,000001 \text{ m} = 10^{-6} \text{ m}$) Ar trebui să folosim diferite tipuri de microscopie pentru a vedea obiecte mai mici decât această dimensiune.

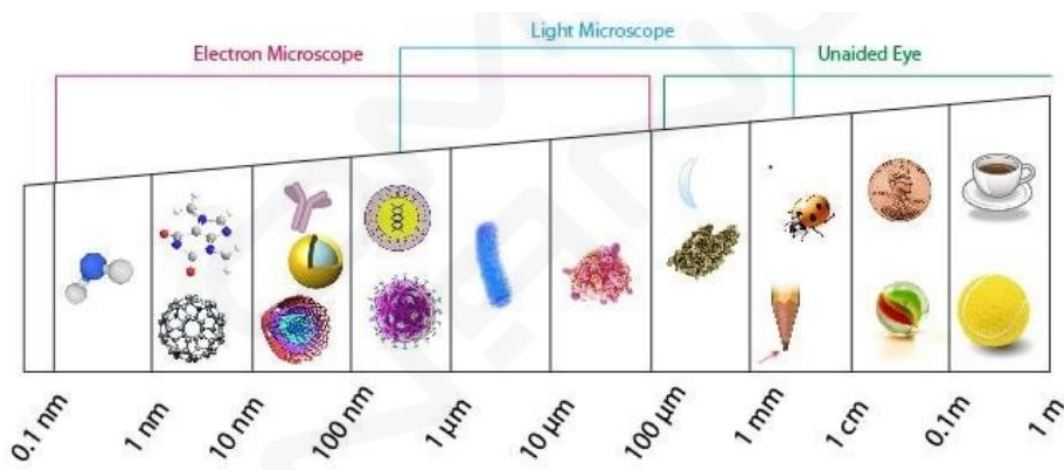


Figura 1. Intervalul de vizualizare al ochiului uman, al microscopului optic/luminos și al microscopului electronic.

Microscopul este instrument optic care ne permite să examinăm obiecte vii sau fără viață care sunt prea mici pentru a fi văzute cu ochiul liber. Ele apropie obiectele mici de limitele vizuale ale ochiului, făcându-le vizibile cu ochiul liber. Organismele și bacteriile eucariote sunt măsurate pe micrometru, virușii pe nanometru și atomii și moleculele pe scara angstrom.

$$1 \text{ mm} = 1000 \mu\text{m} \text{ (micrometru)}$$

$$1 \mu\text{m} = 1000 \text{ nm} \text{ (nanometru)}$$

$$1 \text{ nm} = 1000 \text{ \AA} \text{ (angstrom)}$$



Figura 2. The Relative Size of Particles (<https://www.visualcapitalist.com/visualizing-relative-size-of-particles/>)

2.1 Microscopul

Microscopul, cu o arie largă de utilizare în laboratoare, este un cuvânt combinat format din cuvintele grecești „micro” și „scope”. Micro, mic; Scop înseamnă observator, observator. Cuvântul înseamnă „**a vedea lucruri mărunte**”. Un microscop este un instrument optic care ne permite să examinăm obiecte vii sau neînsuflețite prea mici pentru a fi văzute cu ochiul liber. Microscopul este un dispozitiv vizual și de mărire bazat pe principiile luminii și opticii.

În secolul al XVII-lea, olandezul Anton van Leeuwenhoek și englezul Robert Hooke au descoperit principiile principale ale microscopului folosit astăzi. Microscopul, care a fost folosit pentru prima dată în examinările morfologice în 1757, și-a luat locul în medicina modernă la mijlocul secolului al XIX-lea. Microscopul, care a prezentat mari evoluții în această perioadă, este esențial de două tipuri: un microscop luminos și un microscop electronic în funcție de sursa de iluminare. La microscopul luminos, sursa de iluminare este lumina soarelui sau o lampă. La microscopul electronic, fasciculele de electroni accelerate sunt folosite pentru a ilumina obiectul. Live and lifeless objects that can be seen by using light and electron microscopes are shown in the figure below:

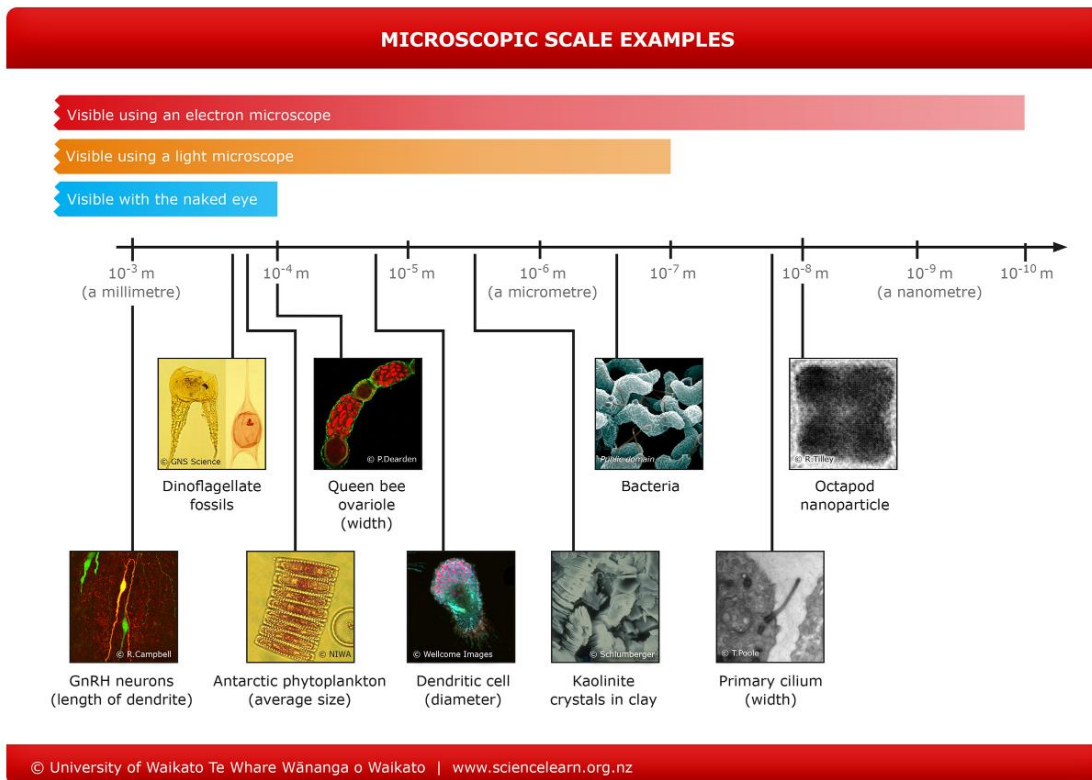


Figura 3. Microscopic Scale Examples (<https://www.sciencelearn.org.nz/resources/497-the-microscopic-scale>)

3. Ce putem vedea cu un microscop optic/luminos?

Microscopul optic, sau microscopul luminos, folosește lumina vizibilă cu un sistem de lentile pentru a mări obiectele mici. Microscopul luminos permite mărirea obiectelor prin folosirea diverselor lentile și aranjarea acestor lentile. Este un instrument adesea folosit în cercetarea biologică. Microscoapele de lumină se bazează pe fascicule de lumină în lungimi de undă vizibile trimise de la o sursă de lumină, care trec prin proba de examinat iar percepția imaginii mărită de lentile și de către observator în funcție de diferențele de contrast, densitate și grosime.

Putem vedea obiecte cu dimensiuni de până la 1 micron cu un microscop optic. (Pentru comparație, diametrul unui păr uman este de aproximativ 100 de microni.) Alte obiecte pe care le putem vedea folosind un microscop cu lumină sunt părți de flori, insecte, râme și piele umană. Microscopul luminos este ideal pentru imagistica specimenelor biologice, deoarece rezoluția microscopului luminos (capacitatea unui microscop de a distinge detaliile) este în intervalul de dimensiuni ale celulelor.

Calitatea imaginii obținute la microscopul luminos și alte tipuri de microscop este determinată de două caracteristici. Prima dintre aceste caracteristici este raportul de mărire (mărire). Raportul de mărire indică de câte ori se obține o imagine mai mare decât dimensiunea originală a unui obiect. A doua proprietate este rezoluția. Rezoluția indică măsura în care condițiile precum distanța și diferența de densitate dintre structurile obiectului observat sunt păstrate în imaginea mărită, adică cât de clară este imaginea. La microscop, rezoluția și mărirea sunt asigurate de lentile de lumină și de microscop. Lentilele ne permit să direcționăm lumina folosită în diverse scopuri.

În imaginile de la microscop, lungimea de undă (λ) a luminii microscopului și deschiderea numerică (NA), care exprimă puterea de colectare a luminii a lentilei, sunt doi factori care afectează rezoluția. Există o proporționalitate liniară între deschiderea numerică și rezoluție. Un obiectiv cu o valoare mare a diafragmei numerice are și o rezoluție ridicată. Indicele de refracție (n) este o expresie numerică care indică cât de multă lumină este transmisă/împrăștiată fără refracție. Indicele de refracție este raportul dintre lumina emisă și lumina refractată. Valoarea lui n , care indică indicele de refracție, exprimă capacitatea de adunare a luminii a lentilei utilizate. Cu alte cuvinte, cu cât valoarea n este mai mare, cu atât capacitatea de adunare a luminii a lentilei utilizate este mai mare.



[Finda 2019 - Editable Doc](#)

Figura 4. Parti de Microscop

Este necesar un nivel ridicat de contrast pentru ca imaginea să fie văzută cu un microscop. Este posibil să reglați contrastul variind intensitatea luminii și unghiul la care lumina trece prin lentile. Unghiul luminii care vine de la lentila de iluminare (condensator) este reglat de inelele de fază din microscop numite diafragmă. O altă metodă folosită pentru reglarea contrastului sunt filtrele care pot fi plasate în fața sursei de lumină. Este posibil să se întărească contrastul prin colorarea probei de examinat cu diverse substanțe chimice.

În sălile de clasă există două tipuri de microscopice ușoare. Unul dintre ele este stereomicroscopul, folosit pentru a vedea suprafața obiectelor, iar celălalt este microscopul compus, folosit pentru a examina o secțiune transversală subțire. Unul dintre avantajele microscopelor ușoare (și stereomicroscopelor în special) este că obiectele pot fi vizualizate cu puțină sau fără pregătire prealabilă.

Este nevoie de creșterea vizibilității probelor biologice în microscopul luminos (în special microscopae compuse). Pentru aceasta, unele materiale de vopsire sunt folosite pentru a colora mostrele, deoarece adesea le lipsește contrastul, ceea ce face dificilă distingerea tuturor părților lor.

Ca colorant, iodul este adesea folosit pentru a colora celulele plantelor. Iodul colorează amidonul stocat în celule în albastru, iar celelalte structuri în maro pal, permițându-le să fie separate unul de celălalt în culoare. Alți coloranți cei mai des utilizați sunt hematoxilina și eozina. Când se utilizează microscopia fluorescentă, coloranții fluorescenți sunt utilizați pentru a evidenția anumite părți ale celulei sau țesutului. (<https://www.sciencelearn.org.nz/resources/501-light-microscopes>).

Microscopia confocală cu scanare cu laser cu fluorescență (confocală) permite ca o probă biologică groasă să fie vizualizată la microscop fără a lua nicio secțiune. Această caracteristică face posibilă monitorizarea proceselor din probele biologice, cum ar fi mișcarea mitocondriilor în jurul celulelor și intrarea sistemului purtător de medicamente prin membrana celulară.

Confocalul poate fi utilizat pentru a examina organitele celulelor, țesuturilor sau anumite componente, cum ar fi proteinele. Componenta care trebuie examinată este expusă unei substanțe fluorescente și devine mai strălucitoare cu diferite culori în imagine, ceea ce duce la cea mai ușoară examinare a acesteia.

Când vrem să vedem mineralele dintr-o rocă, folosim un microscop cu lumină polarizată. Astfel, diferite minerale apar ca culori diferite sub lumina polarizată (unde de lumina vibrând într-o singură direcție). Când privim mineralele cu un microscop cu lumină polarizată, ne permite să le examinăm forma, dimensiunea și orientarea.

4. Cum putem vedea atomii? Microscopul electronic

Microscopul luminos modern poate obține o mărire de până la 2000 de ori. Deși această mărire este suficientă pentru a vedea în interiorul celulelor vegetale și animale, nu este suficientă pentru a vedea multe obiecte la scară nanometrică din cauza lungimii de undă a luminii. Obiectele la scară nanometrică sunt atât de mici încât lumina îndreptată către ele nu le poate lovi, ceea ce duce la nicio reflexie înapoi pentru ca noi să le vedem.

Microscoapele electronice ne permit să privim obiectele în detaliu, deoarece pot obține o mărire mult mai mare decât un microscop cu lumină. Unele microscoape electronice permit vizualizarea unor obiecte mici precum molecule sau chiar atomi. Spre deosebire de microscopul cu lumină, microscoapele electronice trebuie să treacă printr-o etapă de pregătire a probei înainte de a privi direct lucrurile vii.

Folosind un microscop electronic, putem vedea obiecte mici ca un atom (aproximativ o zece milioane de milimetru sau 10^{-10} m). Dimensiunea unui atom este o fracțiune de nanometru (diametrul unui atom= 10^{-10} m, 1 nanometru(nm)= 10^{-9} m, deci dimensiunea unui atom=0,1 nm). Alte exemple de obiecte pe care le putem vedea folosind un microscop electronic sunt virușii și moleculele.

Doi oameni de știință germani, Ernst Ruska și Max Knoll au dezvoltat o metodă în 1931 care ar oferi o rezoluție mai bună decât lumina vizibilă. În această metodă, electronii trec prin eșantionul de examinat în loc de lumină și se obține imaginea. Cu această metodă, a fost dezvoltat primul exemplu de microscop electronic. Fasciculele de electroni sunt îndreptate către o probă și făcute să o lovească. Electronii care lovesc proba sunt împrăștiați și folosiți pentru imaginea obiectului pe care l-au lovit. La microscopul electronic, această imagine poate fi mărită de 500,00 ori. În timp ce un microscop electronic ne permite să vedem interiorul celulei în detaliu, un microscop electronic cu transmisie ne permite să vedem nanoparticulele și atomii. Între anii 1940-1950, grație muncii realizate de Albert Claude, Keith Parter și George Palade, microscopul electronic a devenit și un domeniu de utilizare în biologie.

Electronii sunt folosiți în locul luminii ca sursă de iluminare în microscopul electronic. Un microscop electronic oferă o rezoluție mai bună decât un microscop cu lumină, deoarece lungimea de undă a electronilor este de aproximativ 0,04 nm. Lungimea de undă a electronului este de aproximativ 10000 de ori mai mică decât lungimea de undă a luminii vizibile. Deoarece lungimea de undă a electronilor este mai scurtă decât lungimea de undă a luminii vizibile, mărirea și rezoluția oferite de microscopul electronic sunt mai mari decât cele ale microscoapelor ușoare standard.

La microscopul electronic, electronii sunt eliberați de tunul cu electroni. Lentilele de condensare transformă apoi fasciculul de electroni într-un singur fascicul subțire. Astfel, electronii sunt furnizați pentru a se concentra pe un singur punct. Există sisteme încărcate pozitiv în jurul probei pentru ca electronii să călătorească în aval și să fie țintiți spre eșantion. Utilizarea microscopului electronic și pregătirea probelor pentru prelucrarea imaginilor sunt mai complexe în comparație cu microscoapele standard. Proba care urmează să fie utilizată la microscopul electronic trebuie să fie în secțiuni mult mai subțiri decât la microscopul cu lumină. Prin trecerea electronilor direct prin această probă, imaginile

pot fi create pe baza gradului de întuneric de pe suprafața fluorescentă, sau electronii lovesc suprafața probei și sunt deviați la unghiuri și rate diferite în funcție de adâncimea și densitatea probei studiate. Electronii rățiți sunt detectați de detectoare, rezultând o imagine digitală a probei.

Există mai multe tipuri de microscopie electronice:

Microscopul electronic cu transmisie (TEM) a fost primul microscop electronic dezvoltat în tehnologia microscopiei electronice. Funcționează pe principiul detectării electronilor care lovesc o bucată subțire de probă și o trec pe cealaltă parte. TEM este similar cu microscopia cu lumină compusă, permițându-ne să privim o secțiune subțire a unei probe la o rezoluție foarte mare. Această funcționalitate oferă o examinare și mai detaliată a multor obiecte mici.

Tomografia electronică este un tip diferit de TEM care ne permite să vedem o imagine tridimensională a celulei sau a țesutului. Vederea obiectelor și a părților lor în trei dimensiuni ne ajută să înțelegem relațiile dintre ele. De asemenea, tomografia electronică poate oferi imagini bidimensionale cu rezoluție mai mare decât TEM convențională.

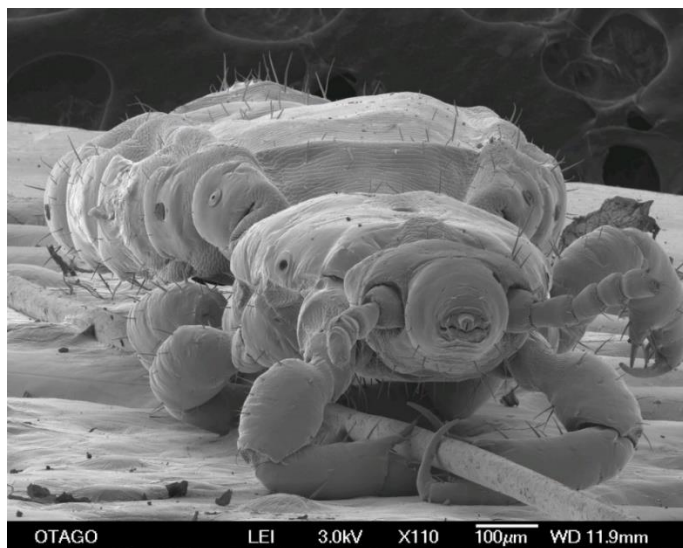


Figura 5. Louse viewed with the SEM (www.sciencelearn.org.nz/resources/502-types-of-electron-microscope)

Microscopul electronic cu scanare (SEM) scanează mai întâi suprafața probei cu un fascicul de electroni direcționat către obiect, apoi folosește electronii reflectați de suprafața probei pentru a obține o imagine tridimensională și de înaltă rezoluție. Uneori, pentru a vedea obiecte (insecte precum păduchi, purici etc.), valorile mici de mărire pot fi suficiente pentru a obține imagini 3D ale acestora.

CryoSEM este o formă specială de SEM care ne permite să vedem și să examinăm obiecte care conțin în mod natural apă (plante, alimente etc.). Spre deosebire de prepararea probelor în SEM convențional, probele sunt înghețate în azot lichid înainte de examinare în CryoSEM. Mulți cercetători preferă să lucreze cu cryoSEM, deoarece este similar cu forma eșantionului înainte de a fi pregătit.

Difracția cu retroîmprăștiere a electronilor (EBSD) este utilizată pentru a analiza în detaliu structura mineralelor din pietre și roci. Detectoarele EBSD funcționează ca parte a SEM-urilor. Fasciculul de electroni este îndreptat către un obiect, cum ar fi o piatră/rocă, electronii care lovesc obiectul sunt împrăștiați, iar dispozitivul detectează acești electroni. Modelul de împrăștiere de aici oferă informații importante despre structura și forma cristalului mineralului.

4.1 Microscopia electronică

În general, tehnica de imagistică directă a nanoparticulelor este realizată prin metode de microscopie electronică. Principiile de bază ale microscopiei electronice sunt descrise în modulul 2.4. Două tehnici diferite de microscopie electronică ar trebui menționate aici. Acestea sunt microscopia electronică cu scanare (SEM) și microscopia electronică de tranziție (TEM). SEM este o metodă de obținere a imaginii prin reflectarea fasciculului de electroni trimis pe materialul care urmează să fie examinat de pe suprafața materialului. În această metodă se pot obține informații despre proprietățile suprafeței materialului. TEM este o tehnică de captare a imaginilor prin trecerea unui fascicul de electroni trimiși prin material.

Ambele metode au avantaje și dezavantaje una față de cealaltă. În plus, diferite proprietăți fizice ale nanomaterialelor pot fi găsite cu ambele metode de microscopie electronică prin împrăștierea electronilor sau a razelor (raze X) care apar ca urmare a interacțiunii electronilor cu atomii materialului.

În SEM, energia electronilor care urmează să fie trimiși la suprafața nanomaterialelor este între 200 eV și 100 keV. Această valoare trebuie să fie mai mare pentru ca electronii să treacă prin materialul din TEM. Această valoare variază între aproximativ 100 keV și 500 keV. În procesele de imagistică care urmează să fie efectuate cu SEM, materialul trebuie să fie conductiv pentru ca electronii să fie orientați. Dacă materialul nu este conductiv, suprafața materialului trebuie acoperită cu un material conductiv (aur, carbon) de câțiva nanometri grosime. Acesta este un dezavantaj al tehnicii atât în ceea ce privește dificultatea etapei de pregătire a măsurătorilor, cât și timpul îndelungat, cât și costul. Pe de altă parte, TEM poate fi utilizat direct atât pe materiale conductoare, cât și pe cele izolatoare. Totuși, pentru ca electronii trimiși să treacă prin material, materialul trebuie să fie foarte subțire sau trebuie pregătit cu o

grosime de câțiva nm folosind tehnici speciale. Acesta este unul dintre dezavantajele acestei metode. În ambele metode, informațiile pot fi obținute din nanomateriale atât despre imagistica lor, cât și despre proprietățile lor fizice diferite.

4.2 Probele la Microscop

Microscoapele cu sondă sunt metode indirecte de imagistică. În aceste metode, informații despre imagini și proprietățile fizice ale materialului pot fi obținute cu ajutorul unei sonde. Cele mai frecvent utilizate microscoape cu sondă sunt microscoapele cu scanare tunel (STM) și microscoapele cu forță atomică (AFM).

STM: STM-urile au fost inventate pentru prima dată în 1981 de G.Binnig și H. Rohrer. În această metodă, cu ajutorul unui material piezo-electric, are loc o tranziție de curent între un vârf ascuțit și suprafață și se obține informații despre atomii de suprafață scanați. Această metodă funcționează numai pe suprafețe conductoare. În general, nanotuburile de wolfram, platină-iridiu și carbon sunt folosite ca vârfuri piezoelectrice. Datorită STM, informații despre starea electronică a regiunii sunt obținute în materialele eșantionului, rugozitatea suprafeței poate fi măsurată și se obțin imagini tridimensionale ale suprafețelor metalice. Cu toate acestea, în timp ce configurația microscopului ar trebui să fie într-un mediu de vid, măsurătorile se fac la temperaturi scăzute. (Figura 6)

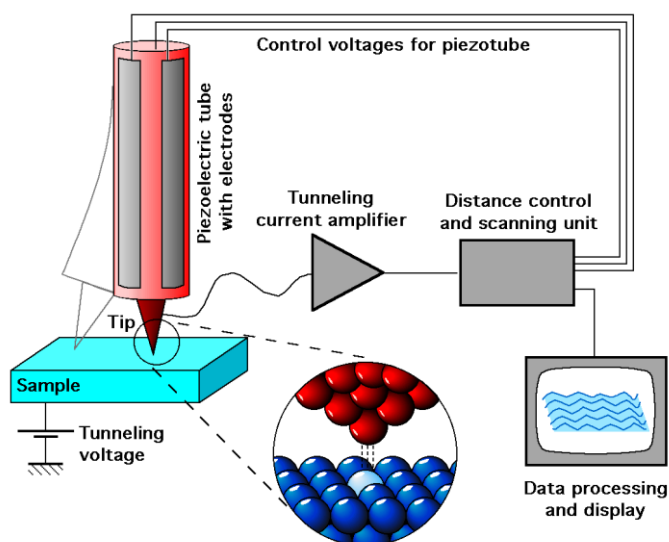


Figura 6. Scanning Tunneling Microscopy structure
(https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Scanning_tunneling_microscope)

AFM: AFM-urile sunt o metodă relativ mai ușoară și mai utilă decât metoda STM. În această metodă, imagistica tridimensională de înaltă rezoluție a suprafeței conductoare sau izolatoare este realizată cu ajutorul unui vârf de ac ascuțit la dimensiuni atomice. Imagistica se realizează prin examinarea interacțiunii vârfului acului cu suprafața. În această metodă, mișcarea acului funcționează cu principiul reflectării laserului, care este aruncat pe suprafața acului, către fotodiodă (Figura 7).

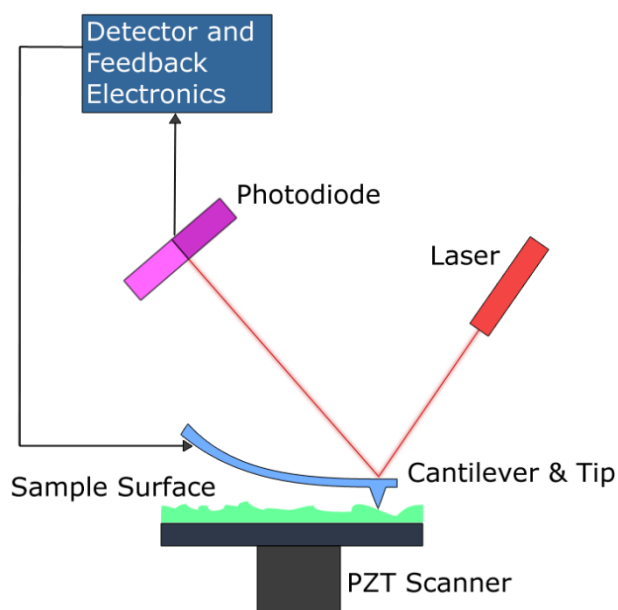


Figura 7. Atomic Force Microscopy structure
(https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1a/Atomic_force_microscope_block_diagram.png)

4.3 Procesare prin microscopie optică

În această secțiune, vom discuta despre modul în care microscopicele optice sunt utilizate în analiza nanoparticulelor. După cum am menționat în secțiunea anterioară, observarea directă a nanoparticulelor poate fi realizată cu rezoluție înaltă numai dacă se folosesc microscopice electronice. Cu toate acestea, din cauza dezavantajelor microscopelor electronice, cum ar fi necesitatea unui mediu de vid, necesitatea de experți și măsurarea timpului și a costurilor, eforturile de a dezvolta analize ale nanoparticulelor cu ajutorul microscopelor optice au devenit din ce în ce mai importante. În primul rând, doar utilizarea microscopelor optice nu este suficientă pentru observarea nanoparticulelor. Mărirea maximă posibilă este de numai 1000X, iar cea mai bună rezoluție posibilă este de 200 nm cu

microscopice optice. Cu toate acestea, dezvoltarea tehnologiei și noi studii în acest domeniu au arătat că aceste dispozitive pot fi utilizate în anumite analize ale nanoparticulelor ca urmare a combinării acestora cu anumite instrumente. În special, imaginile digitale obținute ca urmare a combinării camerelor Charge-Coupled Device (CCD) cu microscopice optice au făcut posibilă dezvăluirea multor proprietăți ale nanoparticulelor prin procesarea lor cu programe de calculator. Folosirea microscopelor optice în analiza nanomaterialelor datorită avantajelor lor precum ușurința în utilizare, nefiind necesar un mediu de vid, cost, accesibilitate și viteza de măsurare a dus la creșterea numărului de studii în acest domeniu. Dacă vorbim despre unele dintre metodele efectuate cu microscopice optice: sunt microscopia optică fototermală, microscopia optică în câmp apropiat cu scanare de tip Scattering (s-SNOM), microscopia Raman, microscopia prin rezonanță cu plasmoni de suprafață, microscopia în câmp întunecat și microscopia cu fluorescență.

4.4 Prezentare generală a microscopelor

Tipurile de microscopice pot fi văzute în figura de mai jos:

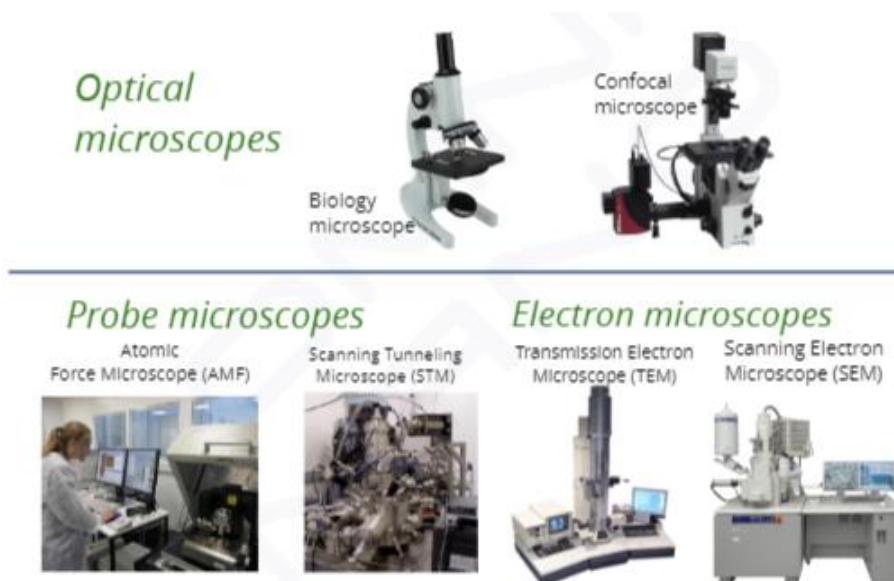


Figura 8. Tipuri de microscopice

5. Referente

1. <https://evrimagaci.org/mikroskoplarin-genel-ozellikleri-hangi-mikroskop-cesitleri-hangi-deneylerde-kullanilir-9830>
2. https://acikders.tuba.gov.tr/pluginfile.php/1110/mod_resource/content/0/konu12.pdf
3. <https://study.com/academy/lesson/how-to-use-a-microscope-lesson-for-kids.html>
4. <https://omninano.org/nanotechnology-stem-curriculum/>