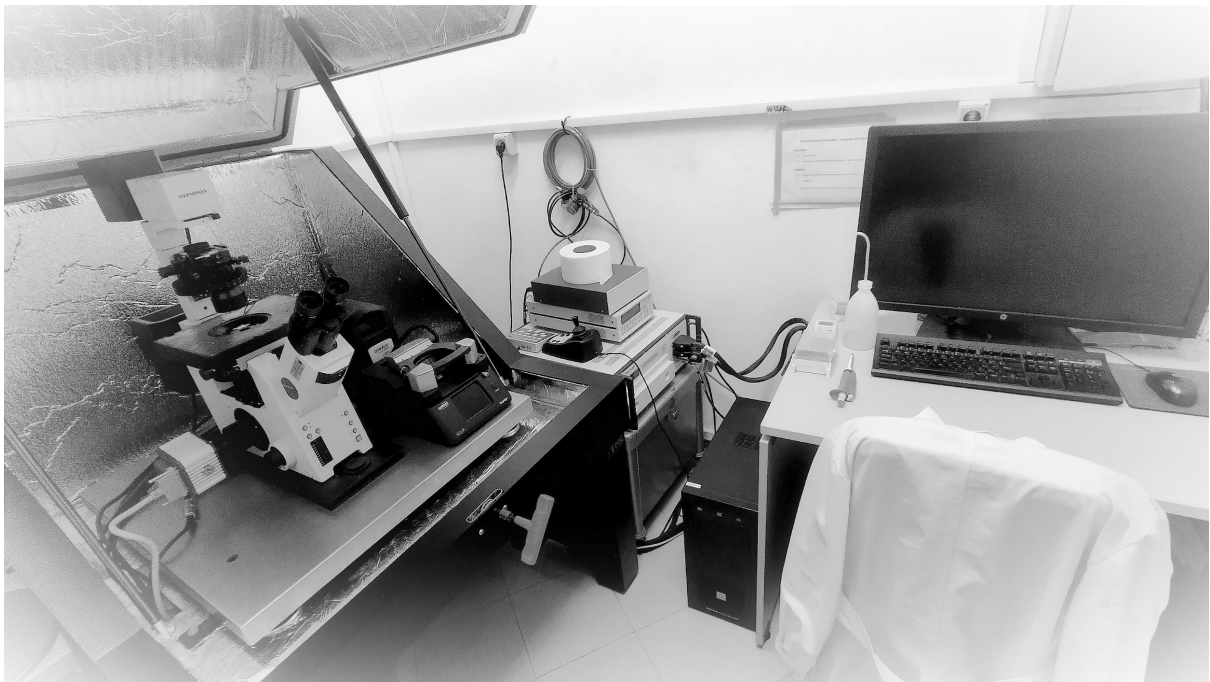


Guía de operación del AFM

Plataforma de Microscopía de Fuerza Atómica - IIBCE



Contenido:

- Guía básica del AFM
- Guía teórica para el análisis de curvas de fuerza obtenidas por AFM

Guía básica del AFM

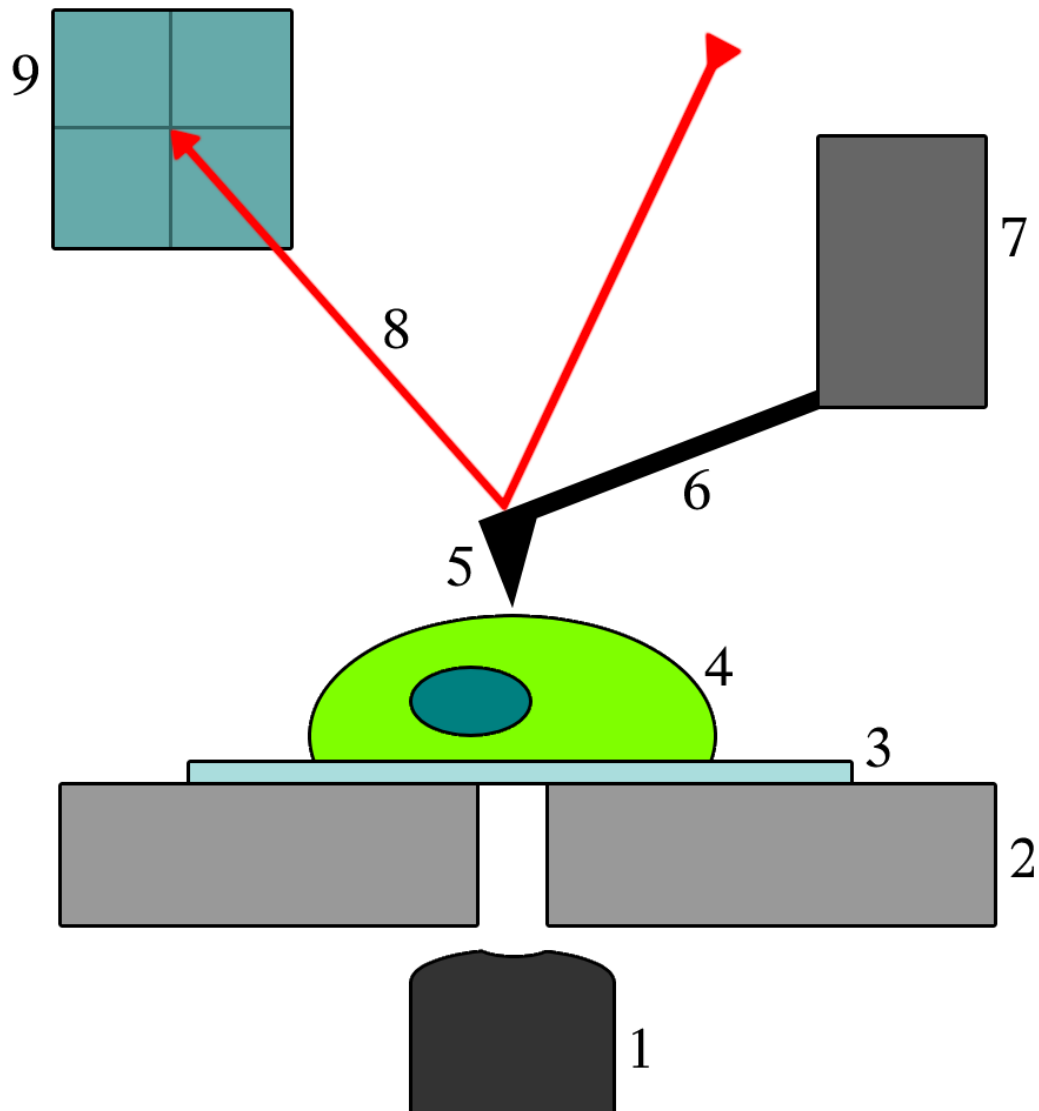
Plataforma de Microscopía de Fuerza Atómica - IIBCE

1. Introducción a la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	3
1.1. Fundamentos del funcionamiento del AFM	3
1.2. Modos de operación del AFM para obtención de imágenes	4
1.2.1. Contacto	4
1.2.2. PeakForce Tapping (ScanAsyst)	4
1.3. Modos de operación del AFM para obtención de propiedades mecánicas	5
1.3.1. Nanoindentación (Curvas de fuerza)	5
1.3.2. PeakForce Quantitative Nanomechanical Mapping (QNM)	5
1.4. Preparación de las muestras	5
2. Plataforma de Microscopía de Fuerza Atómica del IIBCE	6
2.1. Componentes de la Plataforma de AFM del IIBCE	6
2.2. Puntas	8
2.2.1. DNP-10	8
2.2.2. ScanAsyst	8
2.3. Protocolos básicos de operación de la plataforma	8
2.3.1. Procedimiento de encendido/apagado	8
2.3.1.1. Encendido del equipo	8
2.3.1.2. Apagado del equipo	9
2.3.2. Scan (obtención de imágenes)	9
2.3.3. Ramp (obtención de curvas de fuerza)	10
2.3.4. Point & Shoot (nanoindentación)	11
2.3.5. QNM (obtención de mapas de propiedades mecánicas)	12
2.4. Protocolos de calibración	14
2.4.1. Calibración en titanio para obtener radio de la punta	14
2.4.2. Calibración de sensibilidad del cantilever (deflection sensitivity)	14
2.4.3. Calibración por Thermal Tune para obtener constante k del cantilever	15
3. Procesamiento de imágenes y curvas de fuerza	16
3.1. Procesamiento de imágenes en NanoScope Analysis	16
3.1.1. Corrección de imágenes obtenidas	16

3.1.2. Medidas de altura y dimensiones de la muestra	18
3.2. Análisis de curvas de fuerza (nanoindentación)	19
3.2.1. Exportar datos	19
3.2.2. Análisis en Matlab para obtención de módulo de Young y trabajo de adhesión	20
3.2.2.1. Programa ForceCurveAnalysis (módulo de Young y trabajo de adhesión)	20
3.2.2.2. Programa ForceCurveComparison	21
3.2.3. Análisis estadístico de resultados en R	22
3.2.3.1. Programa ForceCurveResults	22
3.3. Análisis de mapas de propiedades mecánicas (QNM)	22
3.3.1. Exportar datos	22
3.3.2. Análisis estadístico de resultados en R	23
3.3.2.1. Programa HistogramQNM	23
4. Mantenimiento de la plataforma	24
4.1. Protocolo de limpieza de puntas	24
4.1.1. Limpieza rápida con agua durante experimentos	24
4.1.2. Limpieza profunda con ultrasonido y luz ultravioleta	24
4.2. Reseteo del equipo	25
5. Otros protocolos, procedimientos y recomendaciones	26
5.1. Ubicación de los archivos y respaldo	26
5.2. Cuaderno de bitácora	27
5.3. Llaves de corriente eléctrica	27
5.3.1. Tablero AFM	27
5.3.2. Tablero LSCyN	28
5.4. UPS	28
5.5. Compresor	29
5.6. Uso del controlador de temperatura de la platina	29
5.7. Uso y mantenimiento de la lámpara de fluorescencia	30
5.8. Consejos útiles y problemas comunes	30
5.8.1. Para trabajar en medio líquido	31

1. Introducción a la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

1.1. Fundamentos del funcionamiento del AFM



1. Lente objetivo del microscopio óptico invertido de epifluorescencia
2. Platina (stage)
3. Portaobjetos
4. Muestra
5. Punta (tip)
6. Cantilever (brazo o micropalanca)

7. Cerámicas piezoeléctricas
8. Láser
9. Fotodetector

La deflexión del cantilever genera la desviación en la incidencia del láser sobre el fotodetector, y está asociada a las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra.

1.2. Modos de operación del AFM para obtención de imágenes

Nota: Para todos los modos está la opción de trabajar en aire o en medio líquido.

1.2.1. Contacto

La punta permanece en contacto con la superficie de la muestra al escanear (barriéndola). Se busca mantener constante la deflexión (desviación) del cantilever, por lo que el piezoeléctrico que regula la altura (Z) se expande o retrae cada vez que hay un cambio de altura en la topografía de la muestra. Se generan así dos imágenes o mapas:

- **Imagen de topografía o altura:** donde se visualizan y almacenan los datos de Z. Es posible reconstruir una imagen 3D de la muestra a partir de este mapa.
- **Imagen de error de deflexión:** donde se visualizan los ajustes o cambios de Z que tuvo que hacer el piezoeléctrico para mantener la deflexión constante. No almacena datos de altura, por lo que no permite reconstruir imagen 3D, pero facilita reconocer a simple vista la textura de la muestra.

Ambas imágenes son resultado de la interacción entre la punta y la muestra, por lo que dependen de la geometría de la punta. Las regularidades obtenidas en imágenes de muestras muy irregulares (como el titanio) aportan información sobre la geometría de la punta y permiten hacer las calibraciones previas a un experimento, como medir empíricamente el radio real de la punta.

Más info:

<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/Contact%20AFM/Contact%20AFM.htm>

1.2.2. PeakForce Tapping (ScanAsyst)

El cantilever oscila sobre la muestra, haciendo que la punta entre en contacto con la muestra solo de manera intermitente, con una cierta frecuencia dada, y manteniendo constante la amplitud de la oscilación y la fuerza máxima que la punta ejerce sobre la muestra cada vez que desciende sobre ella e indenta, por lo que el piezoeléctrico debe regular la altura (Z) exactamente como lo hace para el modo Contacto. Se generan así dos imágenes o mapas:

- **Imagen de topografía o altura:** donde se visualizan y almacenan los datos de Z. Es posible reconstruir una imagen 3D de la muestra a partir de este mapa.

- **Imagen de error de deflexión:** donde se visualizan los ajustes o cambios de Z que tuvo que hacer el piezoeléctrico para mantener la deflexión constante. No almacena datos de altura, por lo que no permite reconstruir imagen 3D, pero facilita reconocer a simple vista la textura de la muestra.

Es un modo más complejo e inestable que el de Contacto, pero produce menos desgaste tanto en la punta como en la muestra, siendo menos agresivo.

Nota: En este modo es recomendable aumentar al máximo la amplitud de oscilación (2.000 nm) y reducir la frecuencia a la más lenta posible (0,250 kHz).

Más info:

<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/ScanAsyst/ScanAsyst.htm>

1.3. Modos de operación del AFM para obtención de propiedades mecánicas

1.3.1. Nanoindentación (Curvas de fuerza)

La punta se sitúa sobre un punto determinado de la muestra y desciende sobre ella para efectuar una pequeña indentación, es decir, penetra en la muestra para intentar deformarla sin dañarla, y medir la fuerza de resistencia que la muestra ejerce sobre la punta. Luego se retira y mide la fuerza con la que la muestra se resiste a que la punta se despegue de ella. Esto genera una gráfica de fuerza en función de la indentación, lo que permite calcular propiedades mecánicas de la muestra, como el módulo de Young (elasticidad) o la adhesión.

1.3.2. PeakForce Quantitative Nanomechanical Mapping (QNM)

Funciona del mismo modo que el Tapping, pero sobre cada punto de indentación realiza una curva de fuerza y adquiere los datos para producir, además de los mapas de topografía y error, mapas de propiedades mecánicas como el módulo de Young (elasticidad) y la adhesión de la muestra. Es el modo de operación más complejo e inestable.

Más info:

<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/PeakForceQNM/Introduction.htm>

1.4. Preparación de las muestras

Para poder trabajar con AFM, es necesario que las muestras sean preparadas de manera tal que cumplan los siguientes requisitos:

- **Sustrato:** Debe estar limpio y ser plano. Se recomiendan placas de Petri de 60 mm, portaobjetos, o mica para el caso de muestras muy pequeñas como virus o nanopartículas.
- **Inmovilización:** La muestra debe estar firmemente adherida al sustrato y resistir el escaneo de la punta sin moverse.

- **Accesibilidad:** La muestra debe estar descubierta y accesible para la punta, ya que el escaneo se hace a nivel de superficie y la punta debe poder entrar en contacto con la muestra.
- **Concentración:** Para cultivos celulares, la confluencia debe permitir que haya suficientes células como para descender sobre varias de ellas, pero que estén suficientemente aisladas una de otra como para que no se amontonen ni estorben al cantilever al descender sobre una. Se recomienda una confluencia en torno al 20%.
- **Opacidad:** Para poder utilizar el microscopio óptico invertido de epifluorescencia, la muestra debe ser translúcida.

2. Plataforma de Microscopía de Fuerza Atómica del IIBCE

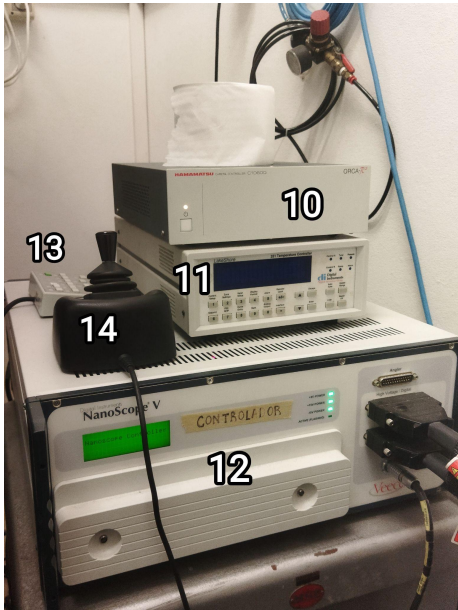
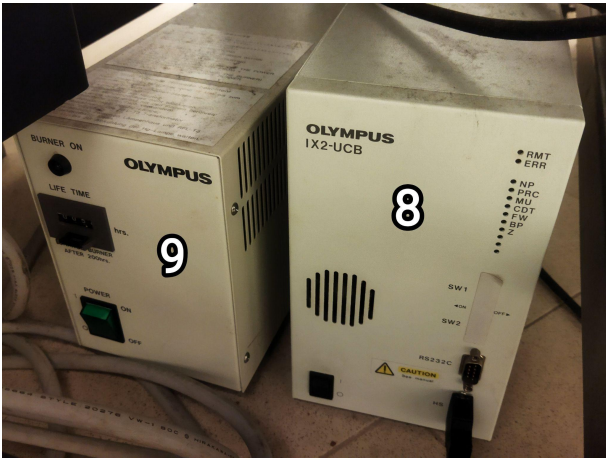
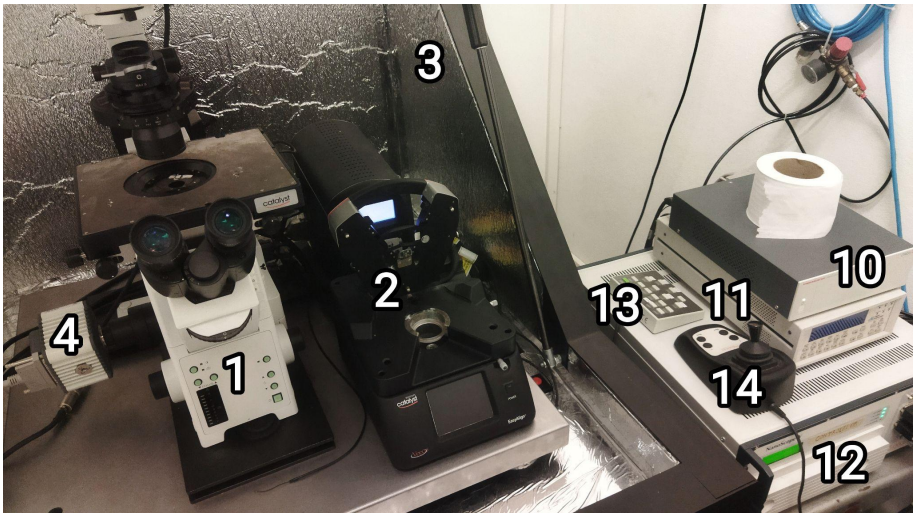
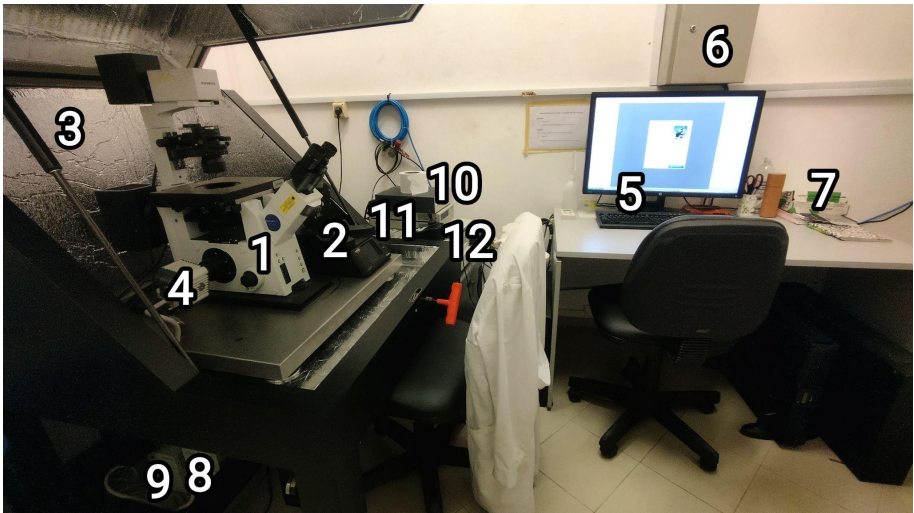
La Plataforma de Microscopía de Fuerza Atómica (**AFM**) pertenece al Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología (**LSCyN**) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (**IIBCE**), que a su vez depende del Ministerio de Educación y Cultura (**MEC**).

Sitio web de la plataforma:

<https://www.gub.uy/ministerio-educacion-cultura/politicas-y-gestion/plataforma-microscopia-fuerza-atmica>

2.1. Componentes de la Plataforma de AFM del IIBCE

1. Microscopio óptico invertido de epifluorescencia
2. Cabezal del AFM
3. Campana
4. Cámara de video
5. Computadora
6. Tablero de llaves de corriente eléctrica (detalle en **5.3. Llaves de corriente eléctrica**)
7. Caja con puntas, holders y otros insumos de uso frecuente
8. Controlador del microscopio óptico
9. Controlador de lámpara de fluorescencia
10. Controlador de cámara de video
11. Controlador de temperatura de platina
12. Controlador del AFM
13. Controlador del tambor de lentes objetivo del microscopio óptico
14. Controlador de movimiento fino del AFM



2.2. Puntas

Nota: Las puntas de uso frecuente se almacenan en la caja sobre el escritorio del cuarto de AFM, etiquetadas según la fecha en la que se abrieron para poder identificarlas. El resto de las puntas se guardan en una caja blanca en la estantería flotante.

2.2.1. DNP-10

- Recomendada para: muestras vivas o blandas.
- Radio: 20 nm.
- Medio: aire y líquido (“todo terreno”).
- Cada chip trae 4 cantilevers con distinta constante k (elástica/spring).
- Usamos el cantilever **D** porque es el de menor k (menos rígido).
- Más info en web del fabricante (Bruker):
DNP-10: <https://www.brukerafmprobes.com/p-3254-dnp-10.aspx>

2.2.2. ScanAsyst

- Recomendada para: muestras inertes o fijadas.
- Radio: 2 nm.
- Variantes:
 - Air (medio: aire)
 - (distinto k) - Fluid+ (medio: líquido)
- Cada chip trae 1 cantilever.
- Más info en web del fabricante (Bruker):
Air: <https://www.brukerafmprobes.com/p-3726-scanasyst-air.aspx>
Fluid+: <https://www.brukerafmprobes.com/p-3728-scanasyst-fluid.aspx>

2.3. Protocolos básicos de operación de la plataforma

2.3.1. Procedimiento de encendido/apagado

2.3.1.1. Encendido del equipo

1. Encender la luz de la sala (interruptor atrás de la puerta).
2. Subir llaves de corriente eléctrica en tablero sobre computadora (primero la general de arriba, luego las de abajo en orden del 1 al 5). Más info en **5.3. Llaves de corriente eléctrica**.
3. Encender la computadora (y el monitor).
4. Presionar CTRL + ALT + DELETE y luego ENTER para iniciar sesión (sin clave).
5. Encender controladores: AFM, microscopio óptico y cámara.

6. Iniciar software NanoScope.

2.3.1.2. Apagado del equipo

1. Cerrar software NanoScope.
2. Apagar controladores: AFM, microscopio óptico y cámara.
3. Apagar la computadora.
4. Bajar llaves de corriente eléctrica en tablero sobre computadora (primero las de abajo en orden del 1 al 5, solo las habilitadas). Más info en **5.3. Llaves de corriente eléctrica**.
5. Apagar la luz de la sala.
6. Cerrar y atrancar la puerta.

2.3.2. Scan (obtención de imágenes)

Nota: Se recomienda ejecutar el procedimiento **2.4.1. Calibración en titanio para obtener radio de la punta** previo a la sesión de experimento de obtención de imágenes.

1. Abrir software NanoScope.
2. Verificar que haya señal del láser o alinear láser al cantilever.
3. Seleccionar modo de operación (**Contact Mode** o **ScanAsyst**) y medio (Air / Fluid), y cargar nuevo experimento.
4. Inicializar platina.
5. Alinear láser a la punta del cantilever (buscar máximo de señal).
6. Alinear fotodetector para que el láser quede centrado en el cero.
7. Colocar muestra en la platina.
8. Buscar área de interés (modo Navigate).
9. Ubicar cabezal del AFM sobre la platina con la muestra.
10. Corregir alineación del fotodetector.
11. Bajar cantilever sobre la muestra, acercarlo al área de interés y centrarlo en el campo visual cuando esté en foco (con perillas de platina).
12. Corroborar o configurar parámetros de escaneo (en Check Parameters, con **Expanded Mode**) y opciones de guardado de archivos (directorio, nombre). Se recomienda especialmente verificar los siguientes parámetros:

- Scan

Scan Size: 1 μm

- | | | |
|-----------------------------|--|------------------|
| Scan Rate: | (luego ir subiendo hasta área deseada)
0.2 Hz | |
| ○ Feedback | | |
| Deflection Setpoint: | 1 V | (modo Contact) |
| Peak Force Setpoint: | 1 V | (modo ScanAsyst) |
| ○ PeakForce Tapping Control | (solo modo ScanAsyst o Tapping) | |
| PeakForce Amplitude: | 2000 nm | |
| PeakForce Frequency: | 0.250 Hz | |

13. Engage.

14. Corregir parámetros y corroborar área de escaneo.

15. Cerrar la campana.

16. Capturar imagen.

17. Al terminar de escanear, levantar la punta (withdraw).

18. Para capturar otra imagen, navegar hasta nuevo área de interés y repetir desde el paso 10 al 17.

19. Subir cantilever hasta una distancia segura.

20. Retirar cabezal del AFM de la platina.

21. Retirar muestra.

22. Cerrar software NanoScope.

2.3.3. Ramp (obtención de curvas de fuerza)

Nota: Ramp se puede utilizar en todos los modos de operación (Contact, ScanAsyst y QNM, tanto en aire como en líquido). Cargar experimento y seguir protocolo para Engage + Scan. Una vez en contacto con la muestra, cambiar al modo Ramp.

1. En el modo Ramp, configurar los siguientes parámetros:

- | | | |
|--------------------------------|---|--|
| Trigger Mode: | Off | Importante! (para poder variar Z Scan Start) |
| Ramp Size: | 3 μm | |
| Z Scan Start: | entre 10 y 19 μm | (ir aumentando de a 1 μm hasta ver curva de fuerza) |
| Ramp Rate: | 1 Hz | |
| Trigger Threshold: | 0.5 V | para muestras rígidas |
| | 0.2 V | para muestras blandas |
| | (tomar nota de este valor en nm para publicaciones) | |
| Tip Radius: | (radio de la punta en uso) | |
| Sample Poisson's Ratio: | 0.3 | para muestras rígidas |
| | 0.5 | para muestras blandas |

2. Para hacer las curvas de fuerza:

- **Ramp Single:** hace una sola curva de fuerza.
 - **Ramp Continuous:** hace varias curvas de fuerza en bucle.
 - **Stop:** detiene el bucle de curvas de fuerza.
 - **Capture:** guarda la curva de fuerza.
3. Al terminar de hacer las curvas de fuerza, volver al modo Scan o levantar la punta con Withdraw.

Más info:

<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/SoftwareGuide/Realtime/ForceCurves/ForceCurveProcedure.htm>

2.3.4. Point & Shoot (nanoindentación)

Nota: Este modo captura una imagen rápida de un área pequeña (ejemplo: 500 nm a 1 Hz) para usar como referencia, luego permite seleccionar puntos específicos de esa imagen y obtener un número de curvas de fuerza para cada punto marcado.

Nota: Point & Shoot se puede utilizar en todos los modos de operación (Contact, ScanAsyst y QNM, tanto en aire como en líquido). Se recomienda usarlo en modo ScanAsyst.

1. Cargar experimento y seguir protocolo para Engage + Scan.
2. Una vez en contacto con la muestra, en modo Scan, configurar parámetros de escaneo. Recomendado: Scan Size **500 nm**, Scan Rate **1 Hz**, Samples/Lines **128**.
3. Abrir ventana de **Point and Shoot**.
4. Capturar imagen de referencia con opción Image/Scan → **Capture Next AFM Image** (seleccionar opción para arrancar a escanear desde arriba en ventana principal).
5. Al terminar de capturar la imagen, pasará automáticamente a la opción Ramp/ForceCurve. Verificar que haya tomado la imagen correctamente (abajo de todo de la ventana).
6. Seleccionar puntos para hacer las curvas de fuerza (con Mark Only, o con Mark and Ramp para controlar las curvas de dichos puntos). Pueden ser arbitrarios con Point, o en grilla regular con Box (para este modo, dibujar el área de interés en la imagen de referencia, seleccionar densidad de puntos con filas y columnas, y luego convertir a puntos). Recomendado: **30 puntos** por área de contacto.
7. Seleccionar cantidad de curvas de fuerza por punto (Multiple Shoot, máximo 100 curvas por punto). Recomendado: **10 curvas** de fuerza por punto.
8. Configurar o corregir parámetros del Ramp en la ventana principal (se puede hacer Continuous Ramp sin guardar las curvas, para controlar los pre-resultados).
9. Click en Ramp and Capture en la ventana de Point and Shoot para que haga las curvas de fuerza y las guarde.

10. Controlar que las curvas de fuerza vayan saliendo bien. Idealmente queremos al menos 250 curvas de fuerza analizables por área de contacto, por lo que guardaremos 300 para luego descartar las defectuosas. Si salen varias curvas defectuosas de corrido, abortar captura y corregir parámetros del Ramp en ventana principal o hacer contacto en otra zona. Si salen algunas curvas defectuosas aisladas no es necesario detener el proceso.
11. Al terminar, Withdraw y luego cerrar la ventana de Point and Shoot.

Más info:

<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/SoftwareGuide/Realtime/PointAndShoot/PointAndShoot.htm>

2.3.5. QNM (obtención de mapas de propiedades mecánicas)

Nota: Se recomienda ejecutar el procedimiento **2.4.1. Calibración en titanio para obtener radio de la punta** previo a la sesión de experimento de obtención de mapas.

Nota: Para utilizar este modo, la computadora requiere una clave temporal: configurar fecha como **1/9/2015**. **Importante!**

1. Abrir software NanoScope.
2. Verificar que haya señal del láser o alinear láser al cantilever.
3. Seleccionar modo de operación Mechanical Properties.
4. Seleccionar medio (Air / Fluid), amplitud (Standard / Large), y cargar nuevo experimento. Recomendado: **Large Amplitude**.
5. Inicializar platina.
6. Alinear láser a la punta del cantilever (buscar máximo de señal).
7. Alinear fotodetector para que el láser quede centrado en el cero.
8. Ejecutar procedimiento **2.4.2. Calibración de sensibilidad del cantilever (deflection sensitivity)** haciendo curva de fuerza sobre sustrato rígido en mismo medio que se usará para el experimento de obtención de mapas.
9. Ejecutar procedimiento **2.4.3. Calibración por Thermal Tune para obtener constante k del cantilever** en mismo medio que se usará para el experimento de obtención de mapas.
10. Colocar muestra en la platina.
11. Buscar área de interés (modo Navigate).
12. Ubicar cabezal del AFM sobre la platina con la muestra.
13. Corregir alineación del fotodetector.

14. Bajar cantilever sobre la muestra, acercarlo al área de interés y centrarlo en el campo visual cuando esté en foco (con perillas de platina).

15. Corroborar o configurar parámetros de escaneo (**Expanded Mode**) y opciones de guardado de archivos (directorio, nombre).

Se recomienda especialmente verificar los siguientes parámetros:

- Scan

Scan Size:	1 μm (luego ir subiendo hasta área deseada)
Scan Rate:	0.2 Hz

- Feedback

PeakForce Setpoint:	1 V
----------------------------	-----

- PeakForce Tapping Control

PeakForce Amplitude:	2000 nm
PeakForce Frequency:	0.250 Hz

- Cantilever Parameters

Tip Radius:	Ingresa radio de punta utilizada
Sample Poisson's Ratio:	0.3 para muestras rígidas 0.5 para muestras blandas

16. Engage.

17. Corregir parámetros y corroborar área de escaneo.

18. Cerrar la campana.

19. Habilitar función **Enable PeakForce Capture**, que permite guardar una matriz con los datos de las curvas de fuerza, de modo que puedan ser procesadas por fuera del software NanoScope.

20. Capturar imagen.

21. Al terminar de escanear, levantar la punta (withdraw).

22. Para capturar otro mapa, navegar hasta un nuevo área de interés y repetir desde el paso 13 al 21.

23. Subir cantilever hasta una distancia segura.

24. Retirar cabezal del AFM de la platina.

25. Retirar muestra.

26. Cerrar software NanoScope.

2.4. Protocolos de calibración

Nota: Se recomienda verificar antes de cada experimento o servicio (por ejemplo, el día anterior) que todos los materiales y componentes de la plataforma a ser utilizados están disponibles y en buenas condiciones o funcionando correctamente.

2.4.1. Calibración en titanio para obtener radio de la punta

Nota: Las imágenes obtenidas por AFM se basan en la interacción entre la punta y la muestra, por lo que imágenes de muestras muy irregulares como el titanio, y en concreto, las regularidades que pueden aparecer en ellas, aportan información sobre la geometría de la muestra.

1. Ejecutar el procedimiento **2.3.2. Scan (obtención de imágenes)** en modo **Contacto (aire)** sobre la muestra de titanio (se encuentran en la caja de insumos de uso frecuente junto con las puntas y holders).

- Parámetros recomendados:

Scan Size	5 μm
Scan Rate	0.300 Hz
Samples/Line	512
Lines	512

2. Abrir software NanoScope Analysis.
3. Abrir la imagen de altura (canal **Height**) de la muestra de titanio escaneada.
4. Ejecutar filtro de corrección **Flatten**.
5. Ejecutar **Tip Qualification** → **Estimate Tip** → **Qualify Tip**.
6. Tomar nota del **Estimated Tip End Radius 2**.
7. Cerrar software NanoScope Analysis.

Más info:

<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/PeakForceQNM/Calibration/TipRadius.htm>

2.4.2. Calibración de sensibilidad del cantilever (deflection sensitivity)

Nota: La sensibilidad del cantilever depende de varios factores, siendo uno de ellos el punto sobre el que el láser incide en el cantilever, por lo que se recomienda calibrar la sensibilidad cada vez que se cambia la punta.

1. Ejecutar procedimiento **2.3.3. Ramp (obtención de curvas de fuerza)** sobre superficie rígida no deformable como vidrio o plástico.
2. Hacer una curva de fuerza simple.
3. Click en el eje Y y arrastrar cursor hasta la gráfica dos veces para seleccionar (delimitar) la zona de pendiente de la curva.

4. Seleccionar **Update Sensitivity** (arriba, al lado de las opciones de Ramp), y aceptar la ventana emergente (corroborar antes que el valor calculado por el software es razonable). El software automáticamente va a actualizar este dato para las futuras medidas.
5. Withdraw.

Más info:

<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/SoftwareGuide/Realtime/ForceCurves/ForceCurveProcedure.htm>

2.4.3. Calibración por Thermal Tune para obtener constante k del cantilever

Nota: Se recomienda ejecutar este procedimiento en el mismo medio que se usará para el experimento de obtención de mapas de propiedades mecánicas, previo a comenzar a trabajar sobre la muestra. Este método determina la constante k del cantilever en función de la respuesta del mismo ante vibraciones a distintas frecuencias.

1. Verificar que la punta se encuentra dentro del medio pero suficientemente lejos de la muestra o sustrato como para no entrar en contacto (con un **Withdraw** es suficiente).
2. Click en el ícono **Thermal Tune** en la barra de herramientas superior del software NanoScope.
3. En la ventana del Thermal Tune, configurar los siguientes parámetros:
 - **Lorentzian** (si se trabaja en aire)
Simple Harmonic Oscillator (si se trabaja en líquido)
 - **Thermal Tune Range** 1 - 100 kHz
Temperature (Celsius) 25° (o temperatura del medio o ambiente)
4. Click en **Acquire Data**. Esperar mientras toma los datos (alrededor de 30 segundos).
5. Al terminar, genera una gráfica con un pico en la frecuencia de resonancia.
6. Click en el eje Y y arrastrar cursor hasta la gráfica dos veces para seleccionar (delimitar) la zona del pico de resonancia.
7. Click en **Fit Data**.
8. Click en **Calculate Spring K**.
9. Verificar que el valor obtenido está en el orden del aportado por el fabricante, y de ser el caso, aceptar la ventana que pregunta si desea usar ese valor. Tener en cuenta que en medio líquido se obtienen valores mayores debido a la resistencia del medio al movimiento del cantilever.

10. Repetir los pasos del 4 al 9 una o dos veces más para verificar que da valores similares.
11. Cerrar ventana del Thermal Tune.

Más info:

<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/PeakForceQNM/Calibration/ThermalTune.htm>

3. Procesamiento de imágenes y curvas de fuerza

3.1. Procesamiento de imágenes en NanoScope Analysis

NanoScope Analysis es un software que permite visualizar y procesar las imágenes obtenidas con el microscopio de fuerza atómica.

Al abrir NanoScope Analysis encontramos un panel central donde se visualizarán los archivos, un panel lateral derecho donde se encuentran los directorios (carpetas) de archivos almacenados en el disco duro de la PC, y una barra de herramientas superior.

Para abrir un archivo basta con buscarlo y seleccionarlo (doble click) en el panel lateral derecho. Los archivos de imágenes se guardan en un formato nativo del software NanoScope, cuya extensión es un número de 3 dígitos (el código de la imagen). Si a la extensión agrega .pfc (peak force curves), se trata de un archivo de mapa de curvas de fuerza.

Al abrir un archivo de imagen, el panel central se divide en una barra lateral izquierda (donde se puede elegir qué canal visualizar dentro de los que contiene el archivo, ya sea mapa de altura, de error o de propiedades mecánicas), y una región principal de la pantalla donde se visualiza la imagen en sí y los parámetros u opciones de las herramientas de procesamiento.

3.1.1. Corrección de imágenes obtenidas

Las imágenes obtenidas pueden contener pequeños errores o artefactos derivados de inestabilidades en la interacción entre la punta y la muestra. Para corregir esto utilizamos distintos filtros o herramientas de edición:

- **Ajuste de escala:** cambia los colores y valores límite de la escala del mapa.
Click secundario en la barra de la escala (a la derecha del mapa) → Color Scale...
→ Elegir colores en pestaña Choose Color Table → Modificar valores límite en pestaña Modify Data Scale (valores Maximum y Minimum en columna Display) → OK. Más info:
<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/SoftwareGuide/Offline/DisplayCommands/ColorScale.htm>
- **Corrección de plano (flattening):** endereza el plano de base de la imagen si quedó inclinado o arqueado. Se recomienda aplicar *siempre y únicamente* sobre el mapa de *altura* (nunca sobre los de propiedades mecánicas). Se puede hacer de dos formas:

- **Plane Fit:** calcula un polinomio de ajuste único para toda la imagen.
Click en ícono de Plane Fit en barra de herramientas superior → Configurar parámetros y opciones (orden del polinomio de ajuste en Plane Fit Order: 1st para corregir plano inclinado o 2nd para corregir plano arqueado e inclinado) → Execute. Más info:
<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/SoftwareGuide/Offline/ModifyCommands/PlaneFit.htm>
- **Flatten:** calcula un polinomio de ajuste individual para cada línea (ventaja: elimina también artefactos, ruido o desplazamientos indeseados de la imagen, desventaja: el usuario tiene menos control sobre el criterio del ajuste).
Click en ícono de Flatten en barra de herramientas superior → Configurar parámetros y opciones (orden del polinomio de ajuste en Flatten Order, si el ajuste es único para toda la imagen o individual para cada línea en Find Threshold for, y asegurarse de que Flatten Z Thresholding Direction esté seteado en “No thresholding”) → Execute. Más info:
<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/SoftwareGuide/Offline/ModifyCommands/Flatten.htm>
- **Limpieza de saltos e imperfecciones:** reemplaza una línea o área seleccionada con una interpolación de las líneas adyacentes.
Click en ícono de Erase en barra de herramientas superior → Click secundario sobre el mapa para seleccionar si se quiere marcar una *línea horizontal* o un *área* → Click sobre el mapa para marcar una línea, click y arrastre para marcar un área (marcar todas las líneas y áreas a reemplazar) → Para borrar una marca, click secundario sobre ella y Delete, o Clear All para borrar todas → Execute → Click en ícono de 2D Image para ver resultado → Repetir procedimiento completo de ser necesario aplicar más correcciones sobre el resultado. Más info:
<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/SoftwareGuide/Offline/ModifyCommands/Erase.htm>
- **Eliminación de ruido:** filtros que suavizan picos, frecuencias o contrastes indeseados:
 - Clean Image:
<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/SoftwareGuide/Offline/ModifyCommands/CleanImage.htm>
 - Gaussian:
<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/SoftwareGuide/Offline/ModifyCommands/Gaussian.htm>
 - Lowpass:
<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/SoftwareGuide/Offline/ModifyCommands/Lowpass.htm>
 - Median:
<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/SoftwareGuide/Offline/ModifyCommands/Median.htm>

- **Zoom o recorte de imagen:** amplía un área seleccionada de la imagen y genera un archivo nuevo a partir de ella (conservando todos los canales/mapas de la misma). Click en ícono de Crop and Split en barra de herramientas superior → Click y arrastre sobre el mapa para seleccionar el área de zoom o recorte (se recomienda mantener la proporción de aspecto 1:1 cuadrada de la imagen) → Click sobre el área marcada y arrastre para desplazarla y corregir ubicación si es necesario, click fuera del área para deshacer selección → Create File(s) para generar el archivo de imagen del área seleccionada → Save.
<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/SoftwareGuide/Offline/ModifyCommands/CropAndSplit.htm>
- **Otros filtros y herramientas de edición:**
<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/SoftwareGuide/Offline/ModifyCommands/ModifyCommands.htm>
- **Guardar o exportar imagen:** genera un archivo de imagen (BMP, TIFF, JPEG, PNG) a partir del mapa del canal seleccionado. Click en ícono de Export en barra de herramientas superior → Seleccionar formato de salida en Export Type (se recomienda TIFF para publicaciones) → Export → Seleccionar directorio/carpeta donde guardar el archivo → Save.

3.1.2. Medidas de altura y dimensiones de la muestra

Una vez abierta una imagen de microscopía de fuerza atómica en el software Nanoscope Analysis es posible realizar mediciones de distancias horizontales y verticales (altura) en los mapas de error de deflexión y altura según corresponda.

Es importante recordar que las medidas siempre serán relativas, es decir, no se mide una altura absoluta sino la distancia vertical entre dos puntos seleccionados.

- **Distancias horizontales (regla):** se miden sobre el mapa de error de deflexión (canal **Peak Force Error**) para mayor precisión, o sobre el de altura si los límites del objeto a medir se visualizan con claridad.

Click en herramienta **regla** sobre la imagen 2D → Click y arrastrar sobre el mapa para conectar los dos puntos entre los que se quiera conocer la distancia horizontal (click en el punto A, arrastrar y soltar en el punto B) → Mantener el cursor sobre la línea que se dibuja entre ambos puntos para ver en display la distancia medida → Repetir el procedimiento para obtener más medidas, teniendo en cuenta que la medida anterior desaparecerá de pantalla y solo puede visualizarse una medida a la vez.

- **Alturas y distancias horizontales (Section):** se miden sobre el mapa de altura (canal **Height**). Es posible obtener hasta tres medidas de distancia horizontal y vertical en simultáneo.

Click en ícono de **Section** en barra de herramientas superior → Click y arrastrar para trazar una línea recta sobre el mapa, que atraviese (y exceda) los puntos entre los que se quiere conocer la distancia horizontal y vertical → A la derecha del mapa se graficará el corte correspondiente a la recta

trazada → Click sobre las líneas verticales punteadas en la gráfica, y arrastrarlas lateralmente para seleccionar los dos puntos de la recta entre los que se quiere medir la distancia (notar que cada línea vertical punteada se corresponde con una cruz del mismo color marcada sobre la recta en el mapa) → Las medidas se mostrarán en las columnas Horizontal Distance y Vertical Distance de la tabla debajo del mapa → Repetir el procedimiento para obtener más medidas, teniendo en cuenta que se pueden trazar sobre el mapa hasta tres rectas en simultáneo.

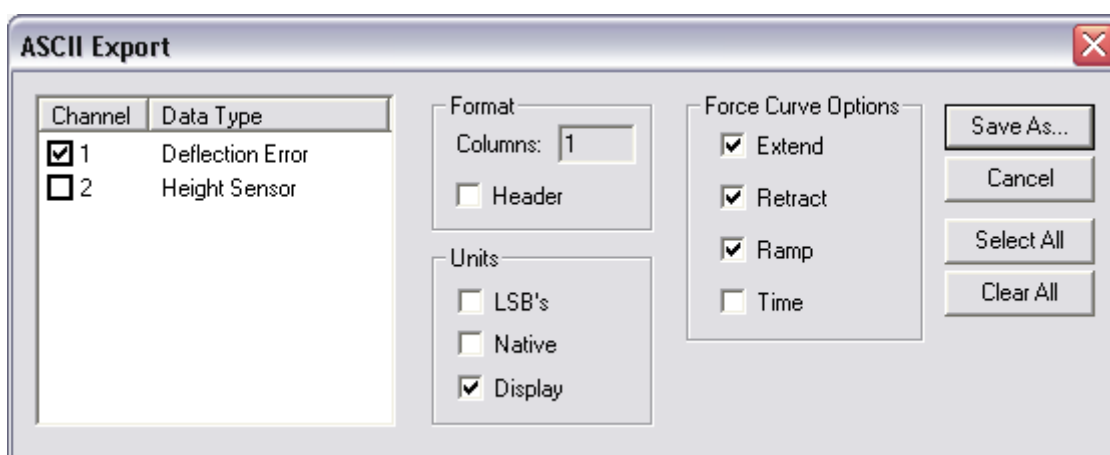
Más info:

<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/SoftwareGuide/Offline/AnalysisFunct/Section.htm>

3.2. Análisis de curvas de fuerza (nanoindentación)

3.2.1. Exportar datos

1. Abrir software NanoScope Analysis.
2. Cargar carpeta donde se encuentran guardadas las curvas de fuerza.
3. Seleccionar archivos de curvas de fuerza para exportar.
4. Click secundario → Export → ASCII.
5. En la ventana emergente, deseleccionar **Height Sensor** y seleccionar **Ramp**. Debe quedar así:



6. Save As... (Recomendación: crear carpeta "ASCII" dentro de la misma carpeta donde están guardadas las curvas).
7. Repetir pasos 2 a 6 para todas las carpetas con curvas de fuerza para exportar.
8. Copiar carpetas con curvas de fuerza a un pendrive para copiar en la computadora donde se van a analizar.
9. Cerrar software NanoScope Analysis.

3.2.2. Análisis en Matlab para obtención de módulo de Young y trabajo de adhesión

Nota: Para poder analizar las curvas, estas deben estar en formato ASCII y contener las siguientes columnas en este orden:

1. **Calc_Ramp_Ex_nm:** Altura (Z) en nanómetros para la bajada (extend).
2. **Calc_Ramp_Rt_nm:** Altura (Z) en nanómetros para la subida (retrace).
3. **Defl_nm_Ex:** Deflexión en nanómetros para la bajada.
4. **Defl_nm_Rt:** Deflexión en nanómetros para la subida.

Nota: Para poder analizar las curvas, es necesario haber tomado nota de los siguientes parámetros del experimento:

- k : Constante de elasticidad del cantilever, en N/m.
- Altura de la muestra, para calcular la máxima indentación a considerar (idealmente no más del **10%** de la altura total de la muestra, para evitar sentir efecto del sustrato).
- Ángulos de la punta, que se encuentran en la web del fabricante.

3.2.2.1. Programa ForceCurveAnalysis (módulo de Young y trabajo de adhesión)

Nota: Dejar el programa original intacto. Hacer una copia específica para cada análisis, y trabajar modificando y ejecutando dicha copia. **Importante!**

Este programa tiene la función de calcular el módulo de Young y el trabajo de adhesión para todas las curvas de fuerza de un directorio.

1. Abrir software Matlab.
2. Abrir copia del programa ForceCurveAnalysis.
3. Modificar el script de la copia del programa para definir los siguientes parámetros:
 - Directorio donde están los datos (archivos de las curvas de fuerza para analizar).
 - Nombre genérico de los archivos a analizar (incluyendo un cero).
 - Constante k del cantilever utilizado durante el experimento.
 - Indentación máxima a considerar para el ajuste. Recomendado: hasta 10% de la altura total de la muestra.
 - Ángulos de la punta (se encuentran en la web del fabricante).
 - Módulo de Poisson. Recomendado: 0.49 para muestras biológicas.

- Tolerancia de correlación (al final del código, a modo de filtro).
Recomendado: 0.99 o 0.95 como mínimo.
- 4. Guardar copia modificada del programa.
- 5. Ejecutar copia modificada del programa.
- 6. Seleccionar manualmente (haciendo click con el cursor en cada gráfica de la curva de fuerza) el punto de contacto entre la punta y la muestra, es decir, el punto donde comienza el comportamiento parabólico de la gráfica. Buscarlo en la curva de bajada (extend, en color azul).
- 7. Al terminar, el programa guarda un vector ASCII con los resultados de módulo de Young y un vector ASCII con los resultados de trabajo de adhesión, en el mismo directorio donde se encuentran las curvas de fuerza analizadas, y retorna en consola el promedio de los valores obtenidos.
- 8. Repetir pasos 3 al 6 para analizar las curvas de fuerza del mismo experimento que se encuentren en otro directorio.
- 9. Cerrar software Matlab.

3.2.2.2. Programa ForceCurveComparison

Nota: Dejar el programa original intacto. Hacer una copia específica para cada análisis, y trabajar modificando y ejecutando dicha copia. **Importante!**

Este programa tiene la función de graficar dos curvas de fuerza en un mismo par de ejes cartesianos. Para ello, las curvas deben encontrarse guardadas en un mismo directorio (se recomienda copiarlas previamente).

1. Abrir software Matlab.
2. Abrir copia del programa ForceCurveComparison.
3. Modificar el script de la copia del programa para definir los siguientes parámetros:
 - Directorio donde están los datos (archivos de las curvas de fuerza para analizar).
 - Nombre genérico de los archivos a analizar (incluyendo un cero).
 - Constante k del cantilever utilizado durante el experimento.
 - Indentación máxima a considerar para el ajuste. Recomendado: hasta 10% de la altura total de la muestra.
 - Ángulos de la punta (se encuentran en la web del fabricante).
 - Módulo de Poisson. Recomendado: 0.49 para muestras biológicas.
4. Guardar copia modificada del programa.
5. Ejecutar copia modificada del programa.

6. Seleccionar manualmente (haciendo click con el cursor en la gráfica de cada curva de fuerza) el punto de contacto entre la punta y la muestra.
7. Al terminar, el programa genera una gráfica con las dos curvas de fuerza. Es probable que sea necesario ajustar los límites del eje X con el parámetro xlim, y volver a ejecutar el programa hasta que la gráfica quede visualmente satisfactoria.
8. Exportar la gráfica como imagen BMP con Save As...
9. Cerrar software Matlab.

3.2.3. Análisis estadístico de resultados en R

3.2.3.1. Programa ForceCurveResults

Nota: Dejar el programa original intacto. Hacer una copia específica para cada análisis, y trabajar modificando y ejecutando dicha copia. **Importante!**

Este programa tiene la función de procesar los resultados de módulo de Young obtenidos para un conjunto de curvas de fuerza (calcular la media y desviación estándar, realizar histogramas, boxplot y test estadístico).

1. Abrir software RStudio.
2. Abrir copia del programa ForceCurveResults.
3. Modificar el script de la copia del programa siguiendo las indicaciones de los comentarios incluidos en el mismo.
4. Ejecutar cada sección del programa por separado (en orden), seleccionando las líneas de código de una sección del script (delimitadas con ##) y haciendo click en Run.
5. Al terminar, copiar resultados como comentario en la sección final del script.
6. Guardar copia modificada del programa.
7. Cerrar software RStudio.

Nota: Si los histogramas guardados tienen el mismo tamaño de imagen (resolución en pixeles), los mismos límites en ejes x e y, y la misma cantidad de barras, es posible superponerlos con PhotoShop y darle un color distinto a cada grupo de datos.

3.3. Análisis de mapas de propiedades mecánicas (QNM)

3.3.1. Exportar datos

1. Abrir software NanoScope Analysis.
2. Cargar archivo de mapa obtenido por método QNM.
3. Seleccionar canal del mapa de la propiedad mecánica de interés (ej. DMTModulus).

4. Click en botón **Depth** en barra de herramientas superior.
5. En los parámetros del histograma, configurar *X Axis* como Absolute.
6. Seleccionar área de interés dibujando un rectángulo con el ratón sobre el mapa (click y arrastrar). Los datos contenidos en ese área serán los exportados, de lo contrario se exportará la totalidad de los datos del mapa completo.
7. Click secundario sobre el histograma → Export → XZ Data.
8. En la ventana emergente, seleccionar directorio de destino, renombrar archivo de ser necesario, y guardar con Save. Esto genera un archivo .txt que contiene una matriz de dos columnas: la primera son los valores de la propiedad mecánica medida (módulo de Young en kilopascales, fuerza de adhesión en nanonewtons, verificar que el título de la columna diga kPa o nN y no otra cosa, de lo contrario exportar los datos de nuevo), y la segunda son los valores porcentuales de frecuencia de aparición de cada dato de la primera columna.
9. Repetir pasos 2 a 8 para todos los archivos con mapas para exportar.
10. Si se quiere procesar todos los mapas juntos, o, por ejemplo, separarlos según distintas condiciones experimentales o tipos de muestra, crear un archivo .txt para cada condición/tipo y copiar manualmente en él todos los datos de los archivos .txt correspondientes a tal condición/tipo. La primera fila debe contener el mismo título que los archivos individuales, pero este luego no debe repetirse en el resto del archivo (por eso es importante que en cada archivo individual se trabaje con las mismas unidades, para que puedan analizarse en conjunto).
11. Copiar carpetas con datos exportados a un pendrive para copiar en la computadora donde se van a analizar.
12. Cerrar software NanoScope Analysis.

3.3.2. Análisis estadístico de resultados en R

3.3.2.1. Programa HistogramQNM

Nota: Dejar el programa original intacto. Hacer una copia específica para cada análisis, y trabajar modificando y ejecutando dicha copia. **Importante!**

Este programa tiene la función de procesar los resultados de propiedades mecánicas obtenidos por el método QNM (calcular la media y desviación estándar, realizar histogramas, boxplot y test estadístico).

1. Abrir software RStudio.
2. Abrir copia del programa HistogramQNM.
3. Modificar el script de la copia del programa siguiendo las indicaciones de los comentarios incluidos en el mismo.

4. Ejecutar cada sección del programa por separado (en orden), seleccionando las líneas de código de una sección del script (delimitadas con **##**) y haciendo click en Run.
5. Al terminar, copiar resultados como comentario en la sección final del script.
6. Guardar copia modificada del programa.
7. Cerrar software RStudio.

Nota: Si los histogramas guardados tienen el mismo tamaño de imagen (resolución en pixeles), los mismos límites en ejes x e y, y la misma cantidad de barras, es posible superponerlos con PhotoShop y darle un color distinto a cada grupo de datos.

4. Mantenimiento de la plataforma

4.1. Protocolo de limpieza de puntas

Las puntas o cantilevers pueden ensuciarse durante los experimentos al quedarse adheridos a su superficie restos de material biológico (ya sea de las muestras o del medio donde se encuentran). Esto puede modificar las propiedades mecánicas (como constante de elasticidad) del cantilever o las dimensiones efectivas de la punta, y por lo tanto perjudicar o imposibilitar la adquisición de datos.

Es posible efectuar una limpieza rápida durante el propio experimento, o, si esta no resuelve el problema, guardar la punta para una posterior limpieza más profunda.

4.1.1. Limpieza rápida con agua durante experimentos

Para hacer una limpieza rápida del cantilever y la punta durante un experimento, es necesario retirar el **holder** del cabezal del AFM. Sin sacar el chip del holder, sostener el holder a unos **45 grados** con el chip orientado hacia abajo, unos centímetros por encima de un recipiente para descarte de sustancias, y verter sobre el holder (no directamente sobre el chip) **agua destilada** desde una piseta, de manera que, al caer deslizando sobre la superficie del holder, el agua pase por el chip y lo vaya lavando, para luego caer dentro del recipiente de descarte. Verter abundante agua de esta manera durante al menos **10 segundos**.

4.1.2. Limpieza profunda con ultrasonido y luz ultravioleta

Para hacer una limpieza profunda de puntas y cantilevers, el chip se separa en una **caja** con todos los chips que serán sometidos a este procedimiento (y que no volverán a ser utilizados en experimento hasta que se hayan limpiado por este método). Es necesario coordinar previamente el día con el **LSCyN** ya que es allí donde se realiza este protocolo. El día de la limpieza, llevar la caja de puntas a limpiar al LSCyN. El procedimiento consta de dos etapas: inmersión en baño ultrasónico e irradiación con luz ultravioleta.

Para la inmersión en **baño ultrasónico**, verter agua destilada dentro del recipiente del baño hasta la mitad de su capacidad y sumergir la caja de puntas sin su tapa (que quede

completamente apoyada en el fondo). Encender el baño en su **frecuencia más baja** y dejarlo funcionar durante **1 minuto** (corta solo al terminar ese lapso). Dejar descansar unos segundos y encender nuevamente durante otro minuto las veces que sea necesario. Retirar la caja del agua y revisar el estado de los cantilevers con la **lupa** del LSCyN. Dejar secar la caja con las puntas antes de guardar o limpiar con UV.

Para la irradiación con **luz ultravioleta**, llevar la caja de puntas a una **cámara de flujo** laminar. Limpiar el piso de la cámara y la caja de puntas rociando **alcohol etílico** al 70% y secando con papel. Apoyar la caja de puntas sin su tapa dentro de la cámara, debajo del tubo de luz UV. Cerrar la cámara y encender la luz UV. Dejar reposar allí durante **1 hora**, controlando cada 20 minutos. Apagar UV al terminar, antes de abrir la cámara para retirar las puntas. Revisar el estado de los cantilevers con el **microscopio óptico** del AFM (hacer una limpieza rápida con agua destilada de ser necesario). Separar las puntas reutilizables para su posterior **calibración**, y descartar las irre recuperables.

4.2. Reseteo del equipo

En caso de errores recurrentes en el software de NanoScope al momento de adquirir imágenes o datos, de modo que impida el funcionamiento operativo del equipo, es posible realizar un reseteo general de la computadora del cuarto de AFM.

Instrucciones para el reseteo general del equipo del AFM:

1. Actualizar **respaldo** de archivos de imágenes y curvas de fuerza obtenidas en disco duro externo de la plataforma (guardado en la estantería flotante del cuarto de AFM).
2. Contactar al área de Informática del IIBCE para solicitar y coordinar el reseteo del equipo. El procedimiento se lleva a cabo en un par de horas. Al momento de efectuarse, se requiere tener a mano el archivo [Imagen_sistema_respaldo_completo_20140611.tib](#) (guardado en el disco duro externo) y el **DVD de Acronis** (guardado en la estantería flotante del cuarto de AFM).
3. Terminado ese proceso, es necesario habilitar la **licencia** temporal del software NanoScope para poder utilizar el modo QNM:
 - 3.1. Buscar en disco duro externo la carpeta [Licencia QNM](#) y copiar (no cortar) su archivo [280654743_20150915.txt](#) en el escritorio de la computadora del cuarto de AFM. Renombrar dicha copia (no el original) para cambiar su extensión de .txt a .reg (no modificar el resto del nombre del archivo).
 - 3.2. Ejecutar el archivo modificado y aceptar la ventana emergente.
 - 3.3. Abrir software NanoScope y corroborar que el modo QNM está habilitado (debe mostrar las cuatro opciones de experimentos disponibles en dicho modo, es decir, en aire y fluido con standard y large amplitudes).
 - 3.4. Eliminar la copia del archivo de la licencia del escritorio de la computadora.

4. Efectuar un **testeo** general del AFM (se recomienda verificar que los modos Contacto, ScanAsyst y QNM funcionan correctamente, y probar guardar una imagen y curvas de fuerza).

5. Otros protocolos, procedimientos y recomendaciones

5.1. Ubicación de los archivos y respaldo

- En la computadora del cuarto de AFM:
 - Archivos de imágenes y curvas de fuerza obtenidas:
Acceso directo en escritorio: [/AFM Data](#)
Ruta original: [E:/AFM Data](#)
 - Manuales: [D:/Manuals](#)
- En la computadora portátil:
 - Programas para analizar curvas de fuerza y resultados:
Acceso directo en escritorio: [/Data analysis programs](#)
Ruta original: [C:/Users/afmii/Desktop/Data analysis programs](#)
- En el disco duro externo:
 - Archivos de imágenes y curvas de fuerza obtenidas: [/AFM Data](#)
 - Manuales: [/Manuals](#)
- En Google Drive:
 - E-mail: afm.iibce@gmail.com
Contraseña: afmiibce3318
 - Programas para analizar curvas de fuerza y resultados:
[/Data analysis programs](#)
 - Archivos del curso anual “Introducción a la Microscopía de Fuerza Atómica”:
[/Curso AFM](#)
 - Papers y trabajos de referencia:
[/Papers y documentación](#)

Nota: Actualizar **respaldo** en disco duro externo y Google Drive regularmente (mínimo cada 3 meses). Mantener el orden de las carpetas y actualizar esta guía en caso de modificaciones.

Nota: Utilizar únicamente el **pendrive** de la plataforma (guardado en el lapicero del escritorio del cuarto de AFM) para trasladar archivos desde o hacia la computadora del cuarto de AFM. Vaciar el pendrive después de trasladar los archivos.

5.2. Cuaderno de bitácora

Se recomienda mantener un cuaderno de bitácora, guardado en el cuarto de AFM, donde se tome nota de:

- Asistencia de cada operador/a del microscopio de fuerza atómica (fecha, día, hora de entrada y salida), como registro ante la eventualidad del fallo del reloj de contralor horario.
- Experimentos o servicios realizados:
 - responsable de las muestras (opcional dato de contacto);
 - modo de operación utilizado (y en qué medio);
 - punta utilizada (tipo, caja, número y cantilever);
 - datos de calibración (radio de la punta, constante elástica del cantilever);
 - parámetros de la configuración (en especial los que hayan sido modificados respecto al default);
 - notas sobre los archivos generados (códigos numéricos, observaciones sobre cantidad y calidad de los datos obtenidos);
 - otras notas para futura referencia (condiciones del experimento, temperatura, medio, inconvenientes que hayan surgido durante el experimento).
- Análisis de datos: qué datos se analizaron y qué resultados se obtuvieron.
- Otros procedimientos realizados: calibraciones (y sus resultados), mantenimientos del equipo, reuniones, charlas o clases (importante para informes anuales de actividad de la plataforma).

5.3. Llaves de corriente eléctrica

5.3.1. Tablero AFM

En la pared sobre el monitor de la computadora del cuarto de AFM se encuentra el tablero de llaves de corriente eléctrica que habilitan la alimentación del microscopio de fuerza atómica, su computadora, las tomas de corriente del cuarto de AFM, el acondicionador de aire de la sala, la batería del UPS, y el compresor externo que bombea aire a la bandeja neumática del microscopio. **Importante:** verificar que las llaves **1, 2, 3 y 5** queden bajas (inhabilitadas) siempre que el microscopio o su computadora no estén en uso.

Función de cada llave:

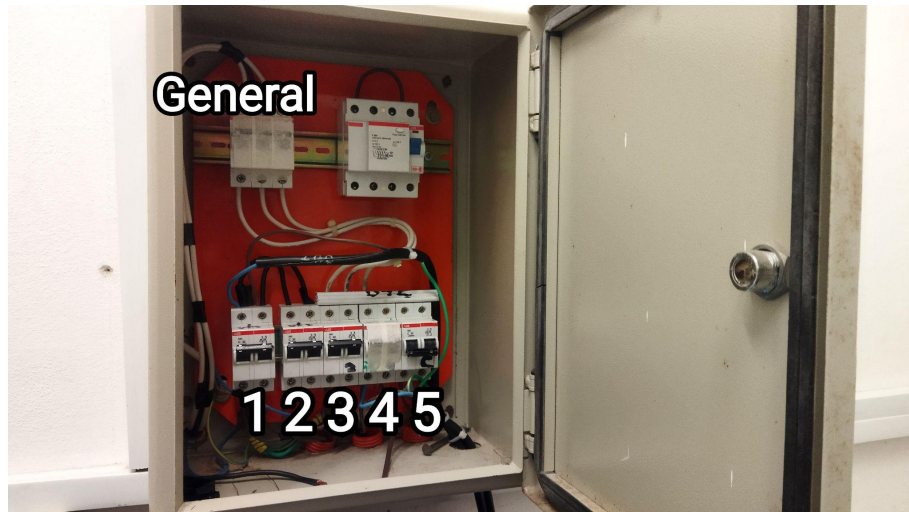
General: alimenta toda la sala del AFM.

1: alimenta los controladores del microscopio y las tomas de corriente 1.

2: alimenta la computadora y las tomas de corriente 2.

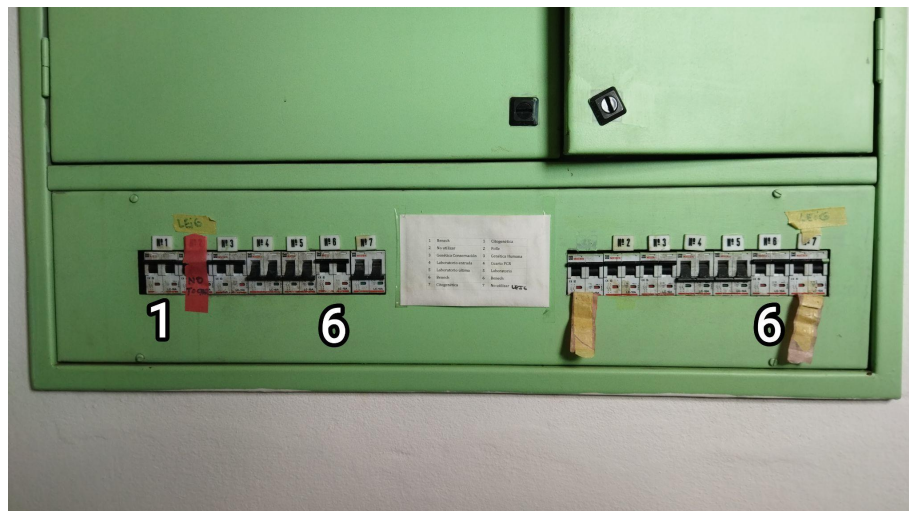
3: alimenta el acondicionador de aire, el monitor y las tomas de corriente 3.

- 4: alimenta la batería del UPS y las tomas de corriente 4 (NO BAJAR).
- 5: alimenta el compresor externo.



5.3.2. Tablero LSCyN

Por el pasillo opuesto al del LSCyN se encuentra, sobre la pared opuesta a las ventanas, el tablero de llaves de corriente eléctrica que habilitan la luz del LSCyN. Las llaves correspondientes al LSCyN son únicamente la 1 y 6 de la serie izquierda, y la 6 de la serie derecha (ver imagen abajo). **Importante:** verificar que queden las tres llaves bajas (inhabilitadas) cuando no vaya a quedar nadie en el LSCyN.



5.4. UPS

El UPS (Uninterruptible Power Supply, o Sistema de Alimentación Ininterrumpida) es un sistema que, ante un corte de luz, pico o baja de tensión u otro fallo eléctrico, aporta energía eléctrica al cuarto de AFM por medio de una batería.

La batería y el controlador del sistema se encuentran ubicados debajo del escritorio de la computadora del cuarto de AFM. Estos son alimentados por la llave 4 del tablero de llaves

de corriente eléctrica del cuarto del AFM, que mantiene la batería cargada, por lo que esta llave debe permanecer siempre habilitada.

Ante un fallo en el suministro eléctrico del IIBCE mientras el AFM y su computadora estén encendidos, el UPS será capaz de detectar el problema y automáticamente comenzar a suministrar energía a la sala. Esta energía será suficiente para proceder al apagado correcto de los equipos de la sala, evitando potenciales daños causados por el fallo eléctrico.

5.5. Compresor

El compresor externo que bombea aire a la bandeja neumática sobre la que se apoya el microscopio, para evitar vibraciones durante la adquisición de datos, se encuentra ubicado en el patio exterior del edificio del IIBCE, junto a la pared externa del propio cuarto del AFM. Está conectado a una toma de corriente externa que es alimentada por la llave **5** del tablero de llaves de corriente eléctrica del cuarto del AFM.

El compresor consta de un tanque de aire y un motor que regula la presión del aire dentro del tanque y la bombea hacia la bandeja neumática del microscopio. La función del motor es mantener una cierta presión de aire, por lo que debe funcionar intermitentemente (se enciende una o dos veces al día y luego permanece apagado hasta que la presión de aire deba ser ajustada nuevamente). En caso de que el motor permanezca encendido continuamente corre riesgo de sobrecalentarse y quemarse, por lo que se deberá inhabilitar la llave de corriente que lo alimenta (**5**) y contactar al taller para su revisión o reparación.



5.6. Uso del controlador de temperatura de la platina

Para utilizar el controlador de temperatura de la platina es necesario primero adosar la termocupla a la platina (pegarla con cinta de modo que no interfiera con el espacio donde se colocará la muestra, pero que quede en contacto con la zona metálica de la platina). Luego, encender el controlador de temperatura (el interruptor está en la parte de atrás del mismo). En el display, la temperatura identificada con la letra B es la que está siendo detectada por la termocupla. En caso de que la temperatura exceda los niveles marcados, comenzará a

sonar una alarma proveniente del propio controlador de temperatura, que se desactiva mediante el botón frontal Alarm.

5.7. Uso y mantenimiento de la lámpara de fluorescencia

Para utilizar la lámpara de fluorescencia, encender el controlador de la lámpara de fluorescencia (en el piso, debajo de la campana del AFM) y habilitar el shutter (obturador) con el botón etiquetado como “fluo” del controlador del tambor de lentes objetivo del microscopio óptico. Los filtros se seleccionan desde el microscopio óptico.

Para cambiar la lámpara (ubicada en el compartimiento negro detrás del microscopio óptico), destornillar desde arriba (notar que el polo negativo de la lámpara va hacia arriba).

Vida útil de la lámpara: aproximadamente 200 horas.

5.8. Consejos útiles y problemas comunes

- No encuentro el plano de la muestra para hacer foco.

Hacer marca en el portaobjetos con un marcador y buscarla con el microscopio óptico.

- No encuentro el láser para alinearlo.

No buscarlo si no está encendida la luz roja del cabezal del AFM, el láser solo se enciende al abrir el software NanoScope y cargar experimento.

- No inicializa la platina.

Corroborar que haya al menos algo de señal del láser en el fotodetector. Inicializar manualmente (Stage → Initialize).

- No detecta la cámara el NanoScope.

Verificar que esté encendido su controlador y reiniciar software NanoScope.

- No veo nada en el microscopio óptico.

Corroborar que esté encendida la luz y abiertos los diafragmas. Corroborar la posición de la luz (que el condensador esté vertical apuntando a la muestra).

- No quedó bien ubicada la punta sobre el área a escanear.

Corregir con el offset del software si la distancia es pequeña. Si no, levantar la punta y mover con el joystick controlador de movimiento fino.

- No encuentro parámetros para configurar el escaneo.

Corroborar que estoy en el Expanded Mode (botón con piezas rojas arriba en software).

- No está escaneando el tamaño de área adecuado.

Modificar parámetro Scan Size en forma escalonada, dando tiempo a estabilizarse. No saltar varios órdenes de magnitud.

- No tengo señal suficientemente estable para hacer contacto.

Limpiar punta en holder con agua destilada (o limpiar lente del holder para líquido).

- No sé si está capturando la imagen y datos adquiridos.

Verificar que diga "Capture: Movie", "Capture: On" o "Capture: Forced" abajo a la derecha en software.

- No hace las curvas de fuerza en el modo Ramp.

Verificar en los parámetros que Trigger Mode: Off.

- No puedo variar el Z Scan Start en el modo Ramp.

Verificar en los parámetros que Trigger Mode: Off.

- False engage recurrente.

Aumentar el PeakForce Engage Setpoint (Microscope → Engage Settings).

Recomendado: ir variando de 0.1 V a 1 V.

5.8.1. Para trabajar en medio líquido

- Al cargar experimento en software NanoScope, seleccionar las opciones "in Fluid" para los modos de operación.
- Trabajar siempre con puntas para fluido y en el holder para fluido (el que tiene la lente para corregir la refracción del láser al cambiar al medio líquido).
- Trabajar en líquido implica mayor inestabilidad que en aire, por lo que las constantes elásticas de los cantilevers son mayores (son más rígidos).
- Por la lente del holder, el láser solo será captado por el fotodetector cuando el cantilever esté en agua o líquido. Se puede perder la señal si el holder queda en el aire. Tener esto en cuenta antes de realizar cualquier movimiento.
- En general suele haber menos señal en líquido que en aire, esto es normal.
- El líquido se puede ir evaporando. Conviene verificar que haya líquido suficiente antes de escanear, y apagar la luz del microscopio óptico al escanear, para reducir la incidencia de calor y la velocidad de evaporación.

Guía teórica para el análisis de curvas de fuerza obtenidas por AFM

Plataforma de Microscopía de Fuerza Atómica - IIBCE

1. Obtener datos de fuerza y profundidad de indentación a partir de deflexión del cantilever y movimiento vertical del piezoeléctrico	2
1.1. Normalizar datos para que el cero sea el punto de contacto	2
1.2. Obtener fuerza a partir de deflexión	3
1.3. Obtener indentación a partir de altura y deflexión	3
2. Obtener módulo de Young (elasticidad - rigidez)	3
2.1. Modelo de Hertz (indentador esférico o parabólico)	4
2.2. Modelo de Sneddon (indentador cónico o piramidal)	5
2.3. Modelo DMT (modo QNM)	6
2.4. Modelo de Sirghi (elasticidad y adhesión)	7
2.5. Otros modelos	8
2.5.1. Modelo de Bilodeau (indentador grande)	8
2.5.2. Modelo JKR (muestra más rígida que indentador)	8
2.5.3. Modelo de Oliver-Pharr (casos plásticos o viscoelásticos)	8
3. Obtener trabajo de adhesión	9
3.1. Modelo de Sirghi (indentador piramidal)	9
3.2. Modelo JKR (indentador esférico)	10
3.3. Modelo DMT (modo QNM)	10

1. Obtener datos de fuerza y profundidad de indentación a partir de deflexión del cantilever y movimiento vertical del piezoeléctrico

El microscopio de fuerza atómica, al efectuar curvas de fuerza, censa la variación en el tiempo de dos parámetros: el **movimiento vertical del piezoeléctrico** (Z) y la **deflexión del cantilever** (por medio de la desviación del láser en el fotodetector).

Para cada curva de fuerza, el software almacena una matriz de pares de datos de Z y deflexión (dos columnas, cuya unidad de medida son los nanómetros para ambos parámetros), tanto para la bajada del cantilever (carga, extend o approach) como para la subida (descarga, retract o withdraw), por lo tanto la matriz tendrá cuatro columnas en total:

1. **Calc_Ramp_Ex_nm**: Altura (Z) en nanómetros para la bajada (extend).
2. **Calc_Ramp_Rt_nm**: Altura (Z) en nanómetros para la subida (retrace).
3. **Defl_nm_Ex**: Deflexión en nanómetros para la bajada.
4. **Defl_nm_Rt**: Deflexión en nanómetros para la subida.

A partir de estas dos variables es posible obtener pares de valores de **profundidad de indentación** (que aparece en la literatura como h por *height* o δ por *depth*) y **fuerza** (F).

1.1. Normalizar datos para que el cero sea el punto de contacto

Dado que el microscopio genera medidas relativas a la posición inicial de la punta, y esta no siempre queda ubicada a la misma distancia nanométrica de la superficie de la muestra, es necesario aplicar una corrección a los datos de Z y deflexión para poder operar con ellos siempre bajo los mismos estándares absolutos y que sean comparables entre sí.

El primer paso es encontrar el par de valores de Z y deflexión que corresponden al **punto de contacto**, o “**cero**”, entre la punta y la superficie de la muestra. Denotamos este par de valores como $(Z_0, defl_0)$.

El criterio para la corrección a aplicar será siempre centrar los ejes de coordenadas en dicho punto de contacto. Por lo tanto, a todos los datos de Z y deflexión exportados del software del microscopio para una curva de fuerza habrá que restarle sistemáticamente el valor de Z_0 y $defl_0$, respectivamente, de esa misma curva de fuerza.

Para encontrar el punto de contacto o cero en Matlab graficamos la deflexión del cantilever durante la bajada (Defl_nm_Ex) en función del movimiento vertical del piezoeléctrico también durante la bajada (Calc_Ramp_Ex_nm):

```
figure, plot(Calc_Ramp_Ex_nm, Defl_nm_Ex)
```

Luego busco el cero manualmente sobre la gráfica mediante el comando `ginput`, que permite seleccionar con un click el punto de la trayectoria donde se produce el contacto

entre la punta y la superficie de la muestra, y almacena como variable el par de valores $(Z_0, defl_0)$ asociados al punto señalado.

El cero es el punto de inflexión donde la gráfica deja de ser una recta horizontal constante y adquiere características de régimen lineal o parabólico, dependiendo de si la muestra corresponde a un material indeformable o deformable respectivamente.

Una vez obtenido el cero, se aplica la corrección de la siguiente forma:

$$Z = Calc_Ramp_Ex_nm - Z_0$$

$$defl = Defl_nm_Ex - defl_0$$

1.2. Obtener fuerza a partir de deflexión

Para obtener los valores de **fuerza** (F) a partir de los datos de **deflexión del cantilever** ($defl$) es necesario conocer la constante de elasticidad k del cantilever que se utilizó para obtener la curva de fuerza, ya que aplicaremos la **Ley de Hooke**:

$$F = kx$$

Reemplazando x por la deflexión ($defl$). Es importante verificar que las unidades de k y la deflexión sean compatibles, de lo contrario será necesario aplicar un factor de corrección a uno de los dos valores.

1.3. Obtener indentación a partir de altura y deflexión

Para obtener los valores de **profundidad de indentación** (h) a partir de los datos de **movimiento vertical del piezoeléctrico** (Z) y **deflexión del cantilever** ($defl$) se debe considerar que, a medida que aumenta Z después del contacto entre la punta y la superficie de la muestra, la deflexión aumenta progresivamente, produciendo un desfase variable entre el valor de Z y la profundidad de la indentación. Por lo tanto, es necesario restar la deflexión a la altura para obtener la indentación real:

$$h = Z - defl$$

2. Obtener módulo de Young (elasticidad - rigidez)

El **módulo de Young** (E), también conocido como módulo de elasticidad longitudinal, es una propiedad mecánica fundamental que describe la rigidez o la resistencia de un material a deformarse elásticamente cuando se le aplica una fuerza. Cuanto mayor es el módulo de Young, mayor es la rigidez del material y más resistente es a la deformación.

El módulo de Young se define como la relación entre el esfuerzo (fuerza por unidad de área) aplicado a un material y la deformación (cambio relativo en longitud) resultante en la dirección longitudinal del material. Se expresa en unidades de presión, como **pascales** (Pa).

Dado que el módulo de Young es la pendiente de la curva de tensión-deformación elástica de un material, podemos calcularlo mediante un ajuste por mínimos cuadrados de las curvas de fuerza-indentación a distintos modelos matemáticos según las características del indentador, de la muestra, y de la interacción entre ambos.

2.1. Modelo de Hertz (indentador esférico o parabólico)

Los modelos más comunes para analizar indentación para determinar propiedades mecánicas de materiales son el modelo de Hertz (y sus derivados) y el modelo de Oliver-Pharr. El primero es un modelo más simple que se puede aplicar cuando se cumplen determinadas hipótesis, mientras que el segundo se aplica a un mayor número de casos, pero implica mucha mayor complejidad en cuanto a los parámetros y variables a considerar para el cálculo.

El **modelo de Hertz** para estudiar propiedades mecánicas a partir de curvas de fuerza-indentación se basa en las siguientes **hipótesis**:

1. **Deformación elástica (reversible):** se asume que la deformación inducida por la indentación es completamente elástica (sin deformación plástica ni fluencia), es decir, toda deformación es reversible, no hay deformación permanente. Esta hipótesis es válida para materiales que tienen un comportamiento elástico lineal y no muestran plasticidad significativa bajo las condiciones de carga y geometría utilizadas en el experimento.
2. **Material homogéneo e isotrópico:** se asume que el material indentado es homogéneo en su composición y propiedades mecánicas, e isotrópico, es decir que sus propiedades mecánicas son iguales en todas las direcciones. Estas hipótesis son válidas para muchos materiales sólidos, pero pueden no aplicarse a materiales anisotrópicos o heterogéneos.
3. **Superficie plana y lisa (semiespacio infinito):** se considera una superficie de indentación perfectamente plana y lisa (como un semiespacio infinito cuya superficie es un plano), así como una punta de indentador con una geometría precisa y conocida. Esto implica que no hay irregularidades o rugosidades en la superficie de la muestra y que la geometría de la punta del indentador es ideal. En la práctica, esta hipótesis se aplica cuando las dimensiones del indentador y la indentación son mucho menores que las de la muestra y sus irregularidades.
4. **Deformación pequeña:** se asume que la deformación elástica generada por la indentación es suficientemente pequeña en comparación con las dimensiones del indentador y la muestra.
5. **Área de contacto circular:** se modela que, durante la indentación, el área de contacto entre el indentador y la muestra tiene forma circular, por lo que el modelo aplica especialmente para indentadores esféricos o parabólicos de revolución.

Las muestras biológicas a nanoescala no cumplen con dichas hipótesis, pero múltiples experimentos realizados por diferentes grupos de investigación demostraron que para pequeñas profundidades de indentación y para indentadores pequeños (en comparación

con las dimensiones de la muestra), los datos de carga-indentación siguen la mecánica hertziana y el modelo puede aplicarse (solo para ajustar la **curva de carga** o extend). Esto es, si el radio del indentador es al menos 10 veces más pequeño que cada dimensión horizontal de la muestra, y si la profundidad máxima de indentación no excede el **10%** del grosor (altura total) de la muestra para evitar medir las propiedades del sustrato sobre el que se encuentra (**regla de Bückle**).

En estas condiciones, y para **indentador esférico o parabólico**, se cumple que:

$$F = \frac{4}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \sqrt{R} h^{\frac{3}{2}} \quad y \quad E = \frac{3}{4} \frac{1-\nu^2}{F \sqrt{R} h^3}$$

Donde:
 F es la fuerza de indentación
 E es el módulo de Young
 ν es el módulo de Poisson
 R es el radio del indentador
 h es la profundidad de indentación

El **módulo de Young reducido** se define como: $E^* = \frac{E}{1-\nu^2}$

Más info:

https://drive.google.com/file/d/1vKcHx2RnG0TazmbssCOldhufVktNVdgo/view?usp=share_link

2.2. Modelo de Sneddon (indentador cónico o piramidal)

A partir del modelo de Hertz, Ian N. Sneddon propuso en 1965 una extensión que aplica específicamente a indentaciones realizadas con una punta de indentador rígida y perfectamente afilada.

El **modelo de Sneddon** considera las mismas **hipótesis** que el modelo de Hertz, pero en vez de modelar un área de contacto circular entre el indentador y la muestra, considera una geometría de contacto **puntual**, donde la punta del indentador se modela como un cono perfecto.

La relación matemática entre la fuerza aplicada durante la indentación (solo durante la **curva de carga** o extend), la profundidad de indentación y el módulo de Young del material se obtiene a través de una solución analítica de la ecuación de elasticidad para la indentación puntual.

Así, según el modelo de Sneddon, para **indentador cónico** se cumple que:

$$F = \frac{2}{\pi} \frac{E}{1-\nu^2} \tan(\alpha) h^2 \quad y \quad E = \frac{\pi}{2} \frac{1-\nu^2}{\tan(\alpha) F h^2}$$

Y para **indentador piramidal**:

$$F = \frac{1}{\sqrt{2}} \frac{E}{1-\nu^2} \tan(\alpha) h^2 \quad y \quad E = \sqrt{2} \frac{1-\nu^2}{\tan(\alpha) F h^2}$$

Donde: F es la fuerza de indentación
 E es el módulo de Young
 ν es el módulo de Poisson
 α es el semiángulo de apertura del indentador
 h es la profundidad de indentación

Más info:

https://drive.google.com/file/d/1vKcHx2RnG0TazmbssCOldhufVktNVdgo/view?usp=share_link

2.3. Modelo DMT (modo QNM)

El modelo DMT fue propuesto por Derjaguin, Muller y Toporov en 1975 y considera la interacción adhesiva entre el indentador y la muestra, por lo que puede aplicarse especialmente para la curva de descarga.

Basado en la teoría de la adhesión de van der Waals, considera que la interacción adhesiva entre la punta de AFM y la muestra es debida principalmente a las fuerzas de van der Waals, que surgen debido a las interacciones entre los dipolos y las fluctuaciones eléctricas en las moléculas que conforman la punta y la muestra.

El **modelo DMT** considera las mismas **hipótesis** que el modelo de Hertz, añadiendo la suposición de que la muestra y la punta se encuentran en contacto en toda el área de indentación.

Este modelo es utilizado por el modo **QNM** (Quantitative NanoMechanics) del AFM para analizar cada curva de fuerza-indentación obtenida (aplicando un ajuste a la **curva de descarga** o retract) y presentar el resultado de elasticidad en el mapa **DTM modulus**.

Así, según el modelo DMT, para **indentador esférico o parabólico**, se cumple que:

$$F = \frac{4}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \sqrt{R} h^{\frac{3}{2}} + F_a$$

Donde: F es la fuerza de indentación
 E es el módulo de Young
 ν es el módulo de Poisson
 R es el radio del indentador
 h es la profundidad de indentación
 F_a es la fuerza de adhesión

Nota: El resultado de módulo de Young obtenido por modo QNM puede diferir del resultado obtenido por análisis de nanoindentación simple, debido a:

- El ajuste por modelos matemáticos diferentes (modelo DMT sobre curva retract vs. modelos hertzianos sobre curva extend).
- Un régimen distinto de aumento y reducción de la fuerza aplicada al indentar (sinusoidal vs. lineal), que puede modificar el comportamiento de la muestra.
- La frecuencia de indentación, que en el modo QNM puede ser hasta mil veces mayor que en la nanoindentación simple, y por lo tanto puede modificar el comportamiento de la muestra al darle un tiempo mucho menor para recuperarse de cada indentación.

Más info:

<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/PeakForceQNM/Operation/Channels.htm>

2.4. Modelo de Sirghi (elasticidad y adhesión)

Propuesto por **Lucel Sirghi** en **2008** en su trabajo *Probing elasticity and adhesion of live cells by atomic force microscopy indentation*, consiste en una extensión del modelo de Hertz que aplica especialmente a los experimentos de indentación de AFM realizados en **células vivas** con indentadores de geometría piramidal (el modelo fue probado con **puntas piramidales de nitruro de silicio**).

El **modelo de Sirghi** considera que la fuerza de indentación equilibra la fuerza elástica del citoesqueleto celular y la fuerza de adhesión de la membrana celular. Se asume que la fuerza de adhesión y el área de contacto entre el indentador y la célula disminuyen continuamente durante la curva de descarga (retract) de la indentación (modelo de despegue o *peeling*).

El modelo separa las contribuciones elásticas y adhesivas en **dos términos**, por lo que permite aplicar únicamente el término elástico (cuadrático) a la curva de carga (extend) y la ecuación completa, incluyendo la contribución adhesiva, a la curva de descarga (retract).

Así, según el modelo de Sirghi, para **indentador piramidal** se cumple que:

$$F = \frac{4}{\pi\sqrt{\pi}} \frac{E}{1-\nu^2} \tan(\alpha) h^2 - \frac{32}{\pi^2} \gamma_a \frac{\tan(\alpha)}{\cos(\alpha)} h$$

Donde:

- F es la fuerza de indentación
- E es el módulo de Young
- ν es el módulo de Poisson
- α es el semiángulo de apertura del indentador
- h es la profundidad de indentación
- γ_a es el trabajo de adhesión

El **módulo de Young** se obtiene del ajuste por mínimos cuadrados de la curva de carga (extend) al término elástico (cuadrático) de la ecuación del modelo, y despejando el E del coeficiente de ese término. Esto es:

$$E = \frac{\pi\sqrt{\pi}}{4} \frac{1-\nu^2}{\tan(\alpha)}$$

Más info:

https://drive.google.com/file/d/1_RsOnBOpqYPxnM_MvvfRHusyoFBDO96B/view?usp=share_link

2.5. Otros modelos

2.5.1. Modelo de Bilodeau (indentador grande)

El modelo de Bilodeau, también conocido como modelo de contacto múltiple o modelo de indentación múltiple, fue propuesto por Louis Bilodeau en 1992.

A diferencia de otros modelos de indentación más simples que definen el área de contacto como un punto, un círculo o un área única de forma definida y conocida, el **modelo de Bilodeau** considera una indentación con **múltiples puntos de contacto** entre la punta del indentador y la muestra.

Este enfoque es especialmente útil para indentaciones en las que el **tamaño del indentador** es comparable o mayor que la profundidad de indentación y las dimensiones de la muestra.

2.5.2. Modelo JKR (muestra más rígida que indentador)

El **modelo JKR** fue propuesto por Johnson, Kendall y Roberts en 1971 y considera la interacción adhesiva debida a las fuerzas de van der Waals entre el indentador y la muestra. Se aplica a sistemas en los que la muestra es mucho más **rígida** que la punta de AFM, y por lo tanto se considera que la punta se deforma al indentar.

2.5.3. Modelo de Oliver-Pharr (casos plásticos o viscoelásticos)

El **modelo de Oliver-Pharr** fue propuesto por William C. Oliver y George M. Pharr en 1992 y consiste en una extensión más compleja del modelo de Hertz que aplica para variedad de geometrías de indentador, y para muestras que no se pueden modelar como homogéneas, isotrópicas, planas y lisas.

Además considera contribuciones plásticas o viscoelásticas en la curva de fuerza-indentación, lo que amplía su capacidad para analizar materiales que exhiben comportamiento elástico-plástico o viscoelástico, y deformaciones irreversibles.

Más info:

https://drive.google.com/file/d/1zt_v0Oslf4QvZ2n_jUdMh9woe8UsoTaH/view?usp=share_link

3. Obtener trabajo de adhesión

3.1. Modelo de Sirghi (indentador piramidal)

La **fuerza de adhesión** (F_a) es la derivada de la **energía de adhesión** (W_a) del contacto entre el indentador y la muestra, y se mide como la fuerza externa necesaria para separar el indentador de la muestra. Su valor depende del tamaño y la geometría del indentador, ya que se considera que la energía de adhesión y el **área de contacto** (A_c) varían continuamente durante la indentación.

La fuerza de adhesión entre la muestra y el indentador es debida principalmente a las interacciones de van der Waals (por fluctuaciones eléctricas entre moléculas y dipolos de ambas superficies), por lo que afecta tanto la carga (extend) como la descarga (retract) del proceso de indentación, pero es la **curva de descarga** la que permite una medición directa de la fuerza de adhesión.

Cuando la adhesión es generada por las interacciones de un gran número de moléculas en la región de contacto entre el indentador y la muestra, un parámetro más adecuado para medirla es el **trabajo de adhesión** (γ_a), que se define como la **energía por unidad de área** de superficie requerida para separar el indentador de la muestra.

La relación entre la **fuerza de adhesión** (F_a), la **energía de adhesión** (W_a) y el **trabajo de adhesión** (γ_a) está dada por:

$$F_a = - dW_a / dh \quad \text{y} \quad W_a = - \gamma_a \cdot A_c$$

Donde el **área de contacto** (A_c) para **indentador piramidal** es:

$$A_c = 4 h_c^2 (\tan \alpha / \cos \alpha)$$

Donde $h_c = 2h/\pi$ es la **profundidad de contacto**, es decir, una fracción de la profundidad total de indentación (h) en cada momento del proceso, y α es el semiángulo de apertura del indentador.

Así, según el modelo de Sirghi, para **indentador piramidal** se cumple que:

$$F_a = - \frac{32}{\pi^2} \gamma_a \frac{\tan(\alpha)}{\cos(\alpha)} h$$

$$F = \frac{4}{\pi\sqrt{\pi}} \frac{E}{1-\nu^2} \tan(\alpha) h^2 - \frac{32}{\pi^2} \gamma_a \frac{\tan(\alpha)}{\cos(\alpha)} h$$

Donde: F es la fuerza de indentación
 E es el módulo de Young
 ν es el módulo de Poisson

α es el semiángulo de apertura del indentador

h es la profundidad de indentación

γ_a es el trabajo de adhesión

De esta manera, es posible extraer el **trabajo de adhesión** (γ_a) a partir del **ajuste** por mínimos cuadrados de la curva de descarga (retract), entre el **punto de contacto** y una profundidad de indentación no mayor al **10%** de la altura total de la muestra (**regla de Bückle**), para evitar el efecto del sustrato rígido sobre el que se encuentra la muestra. El valor se obtiene al despejar γ_a del coeficiente del término lineal de la ecuación del modelo.

$$\gamma_a = \frac{\pi^2}{32} \frac{\cos(\alpha)}{\tan(\alpha)}$$

Más info:

https://drive.google.com/file/d/1_RsOnBOpqYPxnM_MvvfRHusyoFBDO96B/view?usp=share_link

3.2. Modelo JKR (indentador esférico)

El **modelo JKR** fue propuesto por Johnson, Kendall y Roberts en 1971 y describe la interacción entre un indentador esférico rígido y una muestra de superficie plana mediante fuerzas adhesivas de corto alcance.

La relación entre la **fuerza de adhesión** (F_a), la **energía de adhesión** (W_a) y el **trabajo de adhesión** (γ_a) para un indentador esférico de radio R está dada por:

$$F_a = 3 R \gamma_a \quad \text{y} \quad W_a = \frac{2}{3} \pi R \gamma_a$$

Así, según el modelo JKR, para **indentador esférico** se cumple que:

$$F = \frac{4}{3} R \sqrt{E h} + \pi R^2 \gamma_a$$

Donde:

F es la fuerza de indentación

E es el módulo de Young

ν es el módulo de Poisson

α es el semiángulo de apertura del indentador

h es la profundidad de indentación

γ_a es el trabajo de adhesión

3.3. Modelo DMT (modo QNM)

El **modelo DMT** fue propuesto por Derjaguin, Muller y Toporov en 1975 y considera que la interacción adhesiva entre el indentador y la muestra es debida principalmente a las fuerzas de van der Waals, que surgen debido a las interacciones entre los dipolos y las

fluctuaciones eléctricas en las moléculas que conforman la punta y la muestra. Además, asume que la muestra y la punta se encuentran en contacto en toda el área de indentación.

Este modelo es utilizado por el modo **QNM** (Quantitative NanoMechanics) del AFM para analizar cada curva de fuerza-indentación obtenida (aplicando un ajuste a la **curva de descarga** o **retract**) y presentar el resultado de **fuerza máxima de adhesión** (F_{adh}) en el mapa **Adhesion**.

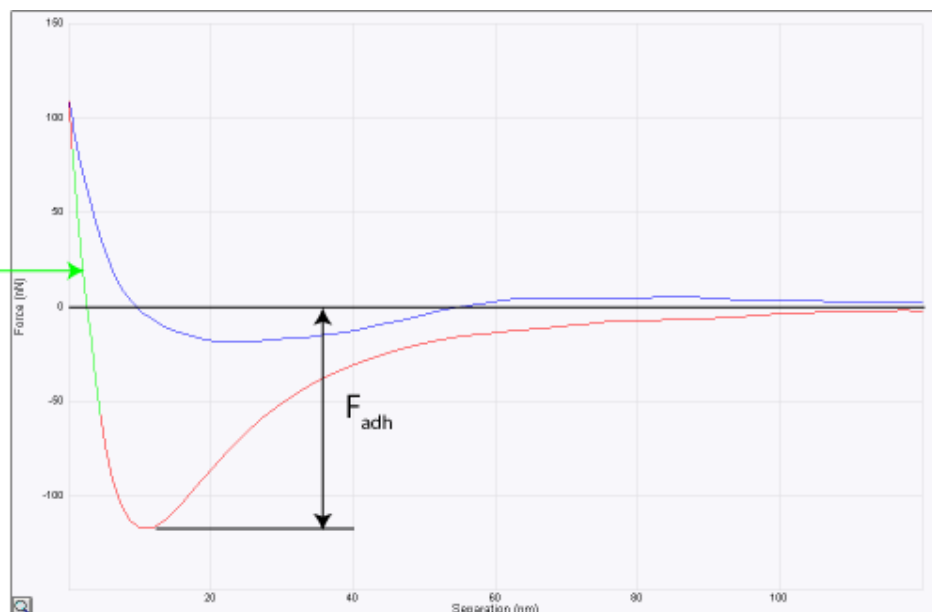
Así, según el modelo **DMT**, para **indentador esférico o parabólico**, se cumple que:

$$F = \frac{4}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \sqrt{R} h^{\frac{3}{2}} + F_a \quad y \quad F_a = \pi R \gamma_a$$

Donde:

- F es la fuerza de indentación
- E es el módulo de Young
- ν es el módulo de Poisson
- R es el radio del indentador
- h es la profundidad de indentación
- F_a es la fuerza de adhesión
- γ_a es el trabajo de adhesión

DMT modulus
fit region



Más info:

<https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/PeakForceQNM/Operation/Channels.htm>