

Universidad Autónoma de Madrid

TEORÍA DEL MICROSCOPIO DE FUERZAS
PARA DETERMINAR PROPIEDADES
NANOMECÁNICAS EN CÉLULAS

Pablo David García López

Universidad Autónoma de Madrid
ICMM-CSIC

Director

Ricardo García García

Tutor:

Pablo Pou Bell

Resumen

El estudio de la relación entre las propiedades mecánicas y la fisiología de una célula es un tema importante en mecanobiología. Los parámetros mecánicos sirven como indicadores de distintas patologías, así como de diferentes procesos celulares. En esta tesis, se estudian las posibilidades ofrecidas por un microscopio de fuerza atómica (AFM) para el estudio de dichos parámetros. Se analiza con detalle la interacción de la punta del microscopio con la célula, así como los diferentes modelos de respuesta mecánica de la misma. Se tienen en cuenta las condiciones de cultivo de la célula (propiedades mecánicas del sustrato). Todo ello desde una perspectiva principalmente teórica, aunque combinada con simulaciones numéricas y algunos experimentos.

En el primer capítulo realizaremos un pequeño repaso histórico de las medidas de las propiedades mecánicas de las células. También analizaremos el estado del arte de la tecnología actual, tanto desde el punto de vista del AFM como de otras técnicas.

En el segundo capítulo analizaremos como serían las fuerzas obtenidas por el AFM en el caso de que la célula tuviera un comportamiento viscoelástico. Obtendremos soluciones exactas para la combinación entre los modelos más usados en la práctica (Kelvin-Voigt, SLS, Power-law) y las puntas más comunes en AFM (esférica, cónica y cilíndrica). Analizaremos en detalle dichas soluciones, así como las hipótesis en las que se basan. Finalmente aplicaremos nuestros resultados para analizar las propiedades mecánicas de un fibroblasto, así como la variación de dichas propiedades ante cambios temporales y químicos en el entorno de la célula.

El efecto del soporte rígido sobre el que se apoya la célula en las medidas mecánicas ha sido estudiado por diferentes investigadores, aunque no con la suficiente generalidad. En el tercer capítulo, por lo tanto, extenderemos, completaremos (y en algunos caso corregiremos) las soluciones propuestas en la bibliografía, haciéndolas válidas para la mayoría de las geometrías usadas en las puntas de AFM. Para ello haremos uso de diferentes herramientas matemáticas, como las funciones de Green y el teorema de reciprocidad, que serán explicadas en detalle. Todas las soluciones de este capítulo serán válidas solo en el caso de que la célula sea vista como un material elástico.

En el cuarto capítulo, una vez resuelto el problema de la viscoelasticidad en un medio infinito (capítulo 2) y el del efecto del soporte rígido en el cual se apoya la célula (capítulo 3), estudiaremos la combinación de ambos. Haciendo uso conjunto de las herramientas ya explicadas en los capítulos anteriores, obtendremos fórmulas cerradas para la fuerza en función de la indentación para el caso de una célula de grosor finito, suponiendo que la misma se comporta de forma viscoelástica. Proporcionaremos formulas generales así como soluciones concretas para los modelos viscoelásticos y geometrías de la punta más comunes.

Las soluciones encontradas para los modelos viscoelásticos (capítulos 2 y 4) son solo válidos cuando la punta del AFM está entrando en la muestra, pero no cuando la misma se está retirando. En el quinto capítulo analizaremos las causas de dicha limitación y estudiaremos las soluciones propuestas en la bibliografía. Resolveremos analíticamente el problema para los casos dados en los capítulos anteriores, de forma que el problema de la indentación de una célula viscoelástica de grosor finito quedará completamente resuelto.

Todo el estudio realizado en los capítulos anteriores supone que la célula se comporta de manera homogénea, es decir, que sus propiedades mecánicas son una “media” de las propiedades de los diferentes elementos que forman su estructura interna. En el último (sexto) capítulo veremos hasta qué punto podemos ir más allá de esta hipótesis, analizando la heterogeneidad, tanto en profundidad como en la dimensión lateral, de un fibroblasto. Dada la dificultad del problema, este capítulo combinará simulaciones de elementos finitos con datos experimentales, siendo la relevancia de las soluciones analíticas bastante más limitada que en los capítulos anteriores. Finalmente intentaremos combinar todo lo aprendido para obtener una tomografía mecánica en 3D de la célula.

ÍNDICE

1. Contexto histórico y objetivos.....	8
1.1 Física y biología.....	8
1.2 El AFM como instrumento de medida.....	11
1.3 Análisis mecánico de la célula con un AFM.....	13
1.4 Objetivos de esta tesis	16
2. Viscoelasticidad	19
2.0 Introducción	20
2.1 Ecuaciones básicas	20
2.2 Grados de libertad y coeficiente de Poisson	22
2.3 El problema de la indentación elástico	24
2.4 El problema de la indentación viscoelástico	27
2.5 Soluciones particulares para Kelvin-Voigt.....	28
2.6 Soluciones particulares para SLS.....	31
2.7 Soluciones particulares para un modelo Power-law.....	33
2.8 Comprobación numérica.....	36
2.9 Interpretación física y biológica de los modelos	38
2.10 Obtención de los parámetros en un experimento de AFM.	40
2.11 Ejemplo práctico: medición de las propiedades de un fibroblasto.....	42
2.10 Conclusiones.....	47
3. Efecto del substrato en un sistema elástico.....	49
3.0 Introducción	50
3.1 descripción matemática del problema	50
3.2 Solución de Dimitriadis.....	51
3.3 Extensión de la solución a otras geometrías.....	56
3.4 Solución “semilla” de un cilindro.	62
3.4 Fuerzas y áreas para un cilindro.....	66
3.5 Fuerzas y áreas para un cono	67
3.6 Fuerzas y áreas para una esfera	69
3.7 Fuerzas y áreas para una nanoaguja	71
3.8 Estudio numérico de los resultados	72

3.9 Conclusiones.....	78
4. Efecto del substrato en un sistema viscoelástico.....	80
4.0 Introducción	81
4.1 Combinación del substrato y viscoelasticidad.	81
4.2 Aplicación al modelo de Kelvin-Voigt.....	82
4.3 Aplicación al modelo de SLS.....	85
4.4 Aplicación al modelo de Power-law.	89
4.5 Comprobación numérica.....	92
4.6 Conclusiones.....	98
5. El Problema del área de contacto	99
5.0 Introducción	99
5.1 Desacople punta-muestra	100
5.2 Solución de Ting	101
5.3 Calculo de las soluciones para el caso de Kelvin-Voigt	104
5.4 Otros modelos.....	107
5.4 Comprobación numérica.....	108
5.5 Conclusiones.....	114
6. Tomografía 3D de la célula.....	115
6.0 Introducción	116
6.1 Método y procesamiento de los datos	116
6.2 Información de los diferentes canales	118
6.2 Consistencia de los mapas obtenidos	121
6.3 Análisis 2-D de los mapas mecanotopográficos.....	122
6.4 Análisis 3-D de los mapas de rigidez	125
6.4 Conclusiones.....	128
Apéndices.....	130
A. Simulación mediante FEM.	130
B. Transformadas integrales	132
C. Fundamentos de teoría de la elasticidad	135
D. Modelos de viscoelasticidad.....	138
Publicaciones.....	144
Referencias.....	145

1. Contexto histórico y objetivos

1.1 Física y biología

Durante la mayor parte de la historia de la humanidad, se pensó que el comportamiento de los seres vivos y de los seres inertes obedecía a reglas diferentes. Un pedrusco y un camello, una montaña y una vaca... pertenecían a mundos sin nada en común (el de las cosas “muertas” y el de las cosas “vivas”), por lo que no podrían explicarse usando las mismas teorías. En un principio, la ciencia no cuestionó tal separación pero, experimento a experimento, preparó el camino para una descripción unificada del universo. Poco a poco se fue viendo que las reglas del mundo inerte y las del mundo vivo eran las mismas, ya fuera en química (con la sintetización de la urea, lograda por Whöler en 1828, se vio que los compuestos químicos de un ser vivo se podían conseguir a partir de elementos “muertos”) o en física (por ejemplo los experimentos de Galvani, en 1728, donde aplicaba electricidad a las patitas de una rana). Actualmente, está casi totalmente aceptado que cualquier ser vivo tiene que obedecer las mismas reglas de funcionamiento que un objeto inerte.

En esta tesis vamos a tender puentes entre dos campos aparentemente alejados entre sí: uno de física (la mecánica de sólidos) y otro de biología (el estudio de una célula). Gracias a esta unión podremos estudiar el comportamiento mecánico de la célula ante diferentes cambios fisiológicos y de su entorno.

Un poco de historia

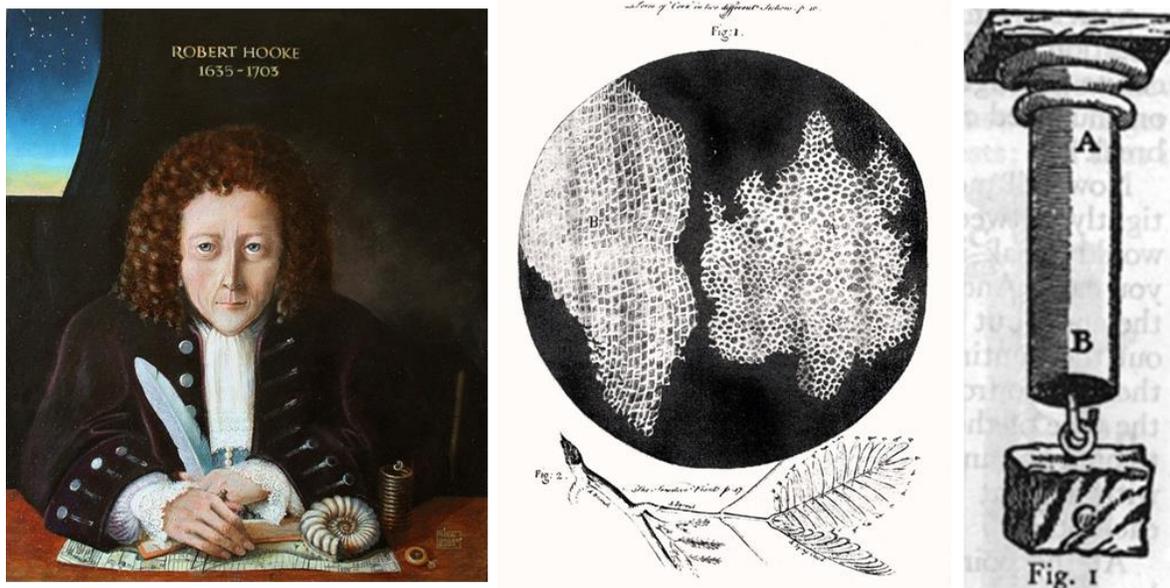


Fig. 1-0: Retrato (del que existe cierta discusión sobre su veracidad) de Robert Hooke, junto con uno de sus dibujos de las células (en el sentido de celdas, habitaciones de un monje[1]). Hooke dio solidez matemática a los primeros estudios y diagramas hechos por Galileo (derecha de la imagen).

Quizás el origen histórico de esta combinación entre células y propiedades mecánicas tiene un nombre propio: Robert Hooke (1635-1703). Si bien Hooke no estudió directamente la relación entre mecánica de estructuras y células, sí realizó estudios detallados de microscopía en diferentes seres vivos (plantas, animales...), siendo el primero en acuñar la palabra “célula”. Como las estructuras que veía en el microscopio se parecían a las “celdas” donde dormían los monjes en los monasterios, pues las llamo de la misma forma, dando origen al término. De forma independiente, desarrolló la primera formulación matemática de la elasticidad (conocida como “ley de Hooke”, ver capítulo 2), que es la base de todos los estudios posteriores de la elasticidad. Como curiosidad, era costumbre en aquella época “prepublicar” tus descubrimientos en forma de anagrama, para autentificar tu autoría de lo descubierto, pero sin darlo a conocer de manera prematura. De esta forma, la primera teoría de la elasticidad se publicó de la siguiente forma:

C E I I I N O S S S T T V V

El significado es... bueno, si lo explicáramos perdería el sentido original por el que se utilizaba un anagrama ¿no? Así que dejaremos que el lector interesado estudie latín por su cuenta, mientras seguimos con nuestra introducción histórica.

A pesar de estos primeros trabajos (y de algún estudio anacrónico, como por ejemplo Galileo en su obra magna “Las dos ciencias”, alrededor de 1638), una descripción científica completa de las fuerzas y deformaciones de los objetos tiene que esperar hasta el siglo XIX. Hasta ese momento, los estudios estuvieron limitados por la falta de herramientas matemáticas adecuadas (recordemos que el cálculo diferencial se inventa en el siglo XVII, pero su utilidad inicial es muy limitada) y por no ser un problema prioritario para la sociedad del momento. Sin embargo, el invento de la máquina de vapor crea la necesidad de explicar y mejorar las estructuras de acero de la revolución industrial, lo que con la sofisticación matemática alcanzada en aquella época, permite que florezca el estudio de la mecánica de sólidos. Es interesante notar que gran parte de la física utilizada en esta tesis (descripción de la micropalanca de un AFM, mecánica de contacto...) bebe directamente de soluciones dadas a esos viejos problemas de la revolución industrial (solución de Euler-Bernoulli al pandeamiento de una viga, solución de Hertz al problema de contacto de dos esferas...).

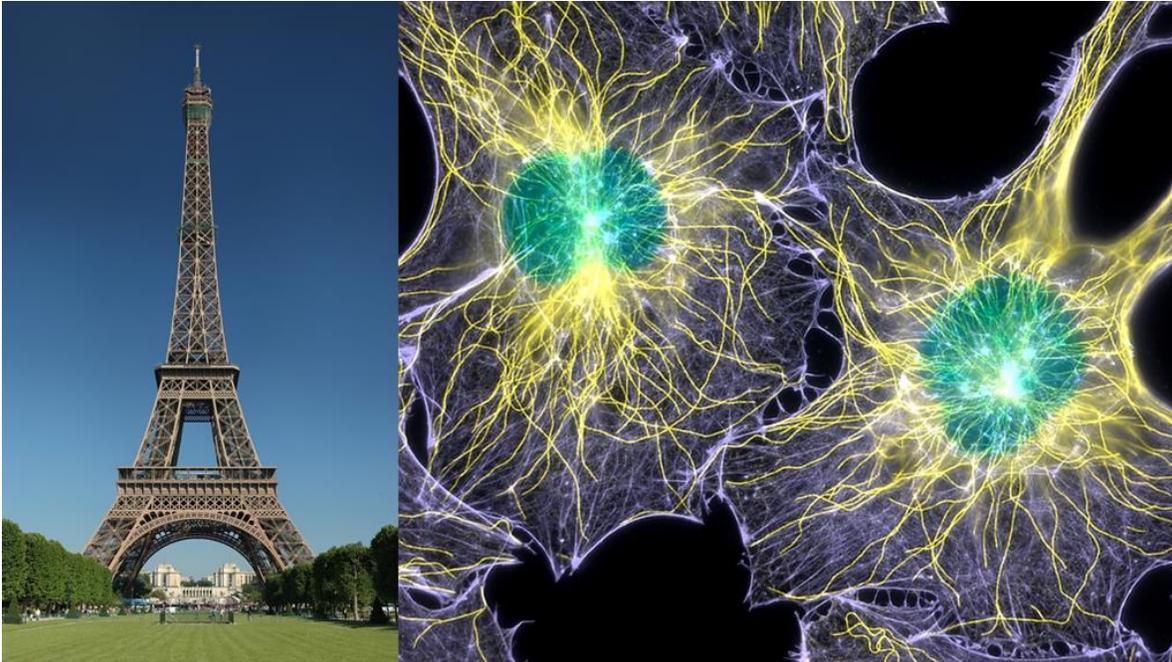


Fig. 1-1: Torre Eiffel, donde se usaron de forma extensiva las recién obtenidas ecuaciones de la elasticidad (¡calculadas a mano!). A la derecha vemos, en una imagen de fluorescencia, la estructura interna de la célula. (Imagen: Torsten Wittmann, Scripps Research Institute).

En este trabajo vamos a intentar analizar la célula como si fuera una de esas estructuras de acero, lo cual parece sorprendente a primera vista, pero es bastante razonable si lo pensamos un poco. Cuando vemos la configuración interna de una célula (véase la figura 1-1), compuesta de un entramado de fibras llamado citoesqueleto, nos podría recordar la celosía de vigas de un edificio como la torre Eiffel, por lo que parece razonable el utilizar las mismas herramientas de análisis para la una y para la otra. Es más, existen tres tipos de componentes en el esqueleto: fibras de actina, microtúbulos y fibras intermedias. Debido a las diferentes rigideces y grosores de cada una, se ha propuesto que algunas actúan como cables, y otras como vigas, de forma similar a un puente colgante [2-5]. Curiosamente, la rigidez de las “vigas” internas de la célula es similar a la de la madera [6] (del orden de los megapascals para el caso de la actina), así que, incluso en valores numéricos, la cosa no anda tan desencaminada.

Aceptando entonces la similitud entre nuestra célula y un puente, la pregunta es... ¿cómo podemos medir las propiedades de un animalillo tan pequeño?

Midiendo una célula

Desde esas primeras imágenes obtenidas por Hooke, han tenido que pasar 300 años para que podamos medir directamente las propiedades mecánicas de una célula. Actualmente existen varios métodos, todos ellos con sus fortalezas y debilidades [7].

Una opción consiste en colocar la célula entre dos placas rígidas paralelas. Si acercamos las placas entre sí, la célula se comprimirá, por lo que podemos medir la fuerza necesaria para alcanzar cierta compresión, con lo que calculamos un valor para la rigidez global de la célula. Este método es

llamado en la bibliografía “*Parallel plane rheometry*” [8] (reometría de planos paralelos). Una variante de este método consiste en colocar muchas células entre los dos platos de un reómetro tradicional, y medir la fuerza torsional necesaria para girar las dos placas [9]. De este experimento podemos obtener un valor medio para la rigidez a torsión de las células, que se puede relacionar fácilmente con la rigidez a compresión. Ambos métodos permiten medir no solo las propiedades de rigidez estáticas (módulo de Young y equivalentes), si no las propiedades viscoelásticas (viscosidad, tiempo de relajación....) realizando las medidas de forma dinámica. [7]

Otro método usado consiste en lanzar dos haces de luz sobre la superficie de la célula. Debido a la diferencia de índices de refracción entre el interior y el exterior de la misma, los haces de luz cambiarán su dirección y velocidad, causando una fuerza en la superficie [10-12]. Midiendo las deformaciones y fuerzas [13] provocadas por esta interacción se puede estimar la rigidez de la célula. Este método es llamado en la bibliografía “*optical stretching*” (estiramiento óptico).

Una tercera vía para medir las propiedades mecánicas de la célula es poner pequeñas bolitas en contacto con la célula, y medir como se mueven: A mayor dificultad de movimiento de las mismas, mayor valor de los valores mecánicos de la célula. Si las bolitas son magnéticas y se colocan en la superficie [12, 14] se puede usar un campo magnético para forzarlas a rotar, y, midiendo la magnitud de estos movimientos, calcular la rigidez [13, 15]. Este método es llamado “*magnetic twisting cytometer*” (citometría por torsión magnética). Otra opción para excitar el movimiento de las bolitas es utilizar un láser, que al interaccionar con las mismas proporcionará la fuerza necesaria. Esta técnica es llamada “*Optical tweezers*” (pinzas ópticas) [16, 17].

Siguiendo con la idea de las bolitas, si están son fluorescentes existe una tercera opción. En primer lugar se inyectan en el interior de la célula. Una vez que están dentro, midiendo sus movimientos brownianos (mediante métodos ópticos), se pueden de nuevo estimar los parámetros mecánicos buscados [18-20]. Este método es llamado “*Particle-tracking microrheology*” (microreología por seguimiento de partículas).

Por último, existe una herramienta llamada AFM (microscopio de fuerza atómica). Como es la que vamos a usar en esta tesis, vamos a explicar su historia y funcionamiento con más detalle.

1.2 El AFM como instrumento de medida.

En 1986, Gerd Binnig y Heinrich Rohrer recibieron el Nobel de física por inventar el microscopio de efecto túnel. Este aparato abrió un nuevo campo para la microscopía, que dejó de sacar simplemente “fotos” y empezó a “tocar” las muestras, dando lugar a una gran variedad de líneas de investigación, así como abriendo el camino a la invención de nuevos instrumentos para analizar y manejar la materia a escala nanométrica. Una de esas herramientas, variante directa del microscopio de efecto túnel, es el llamado Microscopio de Fuerza Atómica (AFM), creado en 1986 por Binnig, Quate, y Gerber [21]. Vamos a realizar una pequeña descripción del mismo y de su funcionamiento, que es bastante simple conceptualmente.

Descripción de un AFM

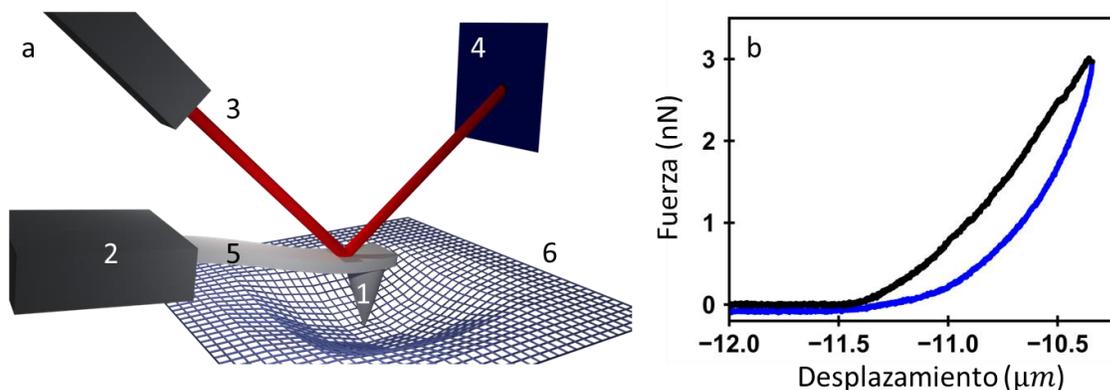


Fig. 1-2: (a) Esquema del funcionamiento de un AFM. (b) Curva fuerza-desplazamiento típica de un experimento de espectrometría de fuerzas.

Como podemos ver en la figura 1-2, el AFM no es más que un tocadiscos en miniatura. La parte principal es una micropalanca (5) (una palanca muy pequeña, de un tamaño del orden de micras) en voladizo, a cuyo extremo libre se le añade una punta (1) de una geometría determinada (punta cuyas dimensiones pueden ser realmente pequeñas, incluso del orden de nanómetros). Mediante elementos piezoeléctricos se puede controlar la posición, tanto vertical como en el plano horizontal, de la base de dicha micropalanca (2), haciendo que la punta toque (o simplemente se acerque lo suficiente como para detectar una interacción) al punto de la muestra (6) que se desee medir. La fuerza de dicha interacción se puede cuantificar midiendo la deflexión de la micropalanca, lo que actualmente se consigue mediante el llamado “*Optical beam deflection method*” (método de deflexión de un rayo óptico)[22]. Este método consiste en dirigir un láser (3) a la superficie superior de la micropalanca, el cual, al doblarse por la fuerza de una interacción, modificará la posición del reflejo del láser. Esta variación de la posición del reflejo se mide con un fotodiodo (4), lo que permite el cálculo de la deflexión de la micropalanca, y, por lo tanto, la intensidad de la interacción de la punta con el objeto a medir. Una vez realizadas las calibraciones adecuadas del sistema, la intensidad de la interacción se puede cuantificar en unidades de fuerza (del orden de nanonewtons, para medidas de células, por ejemplo). Esta fuerza se suele representar en función del movimiento vertical de la micropalanca, como podemos ver en la figura 1-2

Originalmente, en las primeras versiones del AFM, la punta siempre se encontraba en contacto con la muestra, mientras la micropalanca se desplazaba horizontalmente, escaneando la muestra y obteniendo la topografía. Sin embargo, a lo largo de los años se han estudiado y aplicado otros modos de funcionamiento. Vamos a describirlos de forma básica.

Modos de funcionamiento

El método más básico es el descrito anteriormente, llamado “*Contact AFM*” (AFM de contacto). En este método se varía la posición de la micropalanca durante el escaneo de la muestra, de forma que la fuerza máxima medida siempre sea constante. De esta forma, monitorizando los movimientos verticales de los piezoeléctricos que mueven la micropalanca, podemos obtener la topografía de la muestra. Aunque tiene la ventaja de su sencillez, esta técnica sufre varios problemas que hacen que ya no sea tan utilizada [23]. El primero es que la punta es arrastrada lateralmente mientras está en

contacto con el material, por lo que podría dañar la muestra a medir. Por otro lado, no es lo suficientemente sensible para medir fuerzas muy pequeñas, por lo que no es útil para medir muestras blandas. Además este método solo proporciona la topografía de la muestra, no ofrece información sobre la composición, propiedades mecánicas...

Para solucionar estos problemas se desarrolló otro método, llamado “*dynamic AFM*” (AFM dinámico)[24, 25]. En este método la palanca se hace oscilar de forma que toque la muestra intermitentemente. Este contacto intermitente varía diversos parámetros de oscilación de la punta (amplitud, fase, frecuencia), cuyo estudio permite obtener características mecánicas y topográficas de la muestra a medir. Este método se ha estudiado y mejorado en profundidad, obteniéndose variantes del mismo como el llamado “bimodal” [26], en el cual se hace vibrar la palanca a dos frecuencias a la vez, pudiéndose obtener diferente información analizando el comportamiento de los diferentes modos vibración de la micropalanca.

Si bien los modos dinámicos y de contacto se encuentran bien desarrollados, la interpretación física de los resultados obtenidos suele ser complicada. Otra opción que se ha estudiado es aproximar y separar la punta de la muestra en diferentes puntos de la misma, obteniéndose entonces curvas de fuerza-distancia en cada punto analizado. Mediante el análisis de estas curvas, se pueden mapear las distintas propiedades mecánicas y químicas de la muestra, lo cual complementa la imagen topográfica [23, 27]. En esta tesis desarrollaremos una variante de este método.

1.3 Análisis mecánico de la célula con un AFM

Dada la capacidad del AFM para poder propiedades mecánicas a escala nanométrica, su utilidad para el estudio de muestras de relevancia biológica es obvia. Se han realizado medidas de polímeros [28-33], proteínas [23, 34-39], cápsides víricas [40, 41], células [42-49] y tejidos [50]. Vamos a realizar un pequeño repaso a los logros obtenidos hasta el momento, centrándonos en el caso de las mediciones de células. Si bien en una célula el AFM permite hacer estudios tanto de topografía como de propiedades químicas y de adhesión [23], vamos a centrarnos en el estudio de las propiedades mecánicas.

Estudio elástico de la célula

La descripción más básica de una célula es suponer que es un medio infinito y elástico. Obteniendo una curva de fuerzas y aplicando un modelo de contacto adecuado, es posible calcular la rigidez del sistema (descrita por el valor de su módulo de Young). Usando esta simplificación, un gran número de investigadores han obtenido la respuesta mecánica de la misma usando el AFM como herramienta [42, 43, 46-48, 51-56] Básicamente, lo que se obtiene en dichos estudios es el módulo de Young como único parámetro del sistema. A pesar de la sencillez de la descripción, se ha observado que la rigidez de la célula está relacionada con distintos aspectos de interés biológico. Por ejemplo, el módulo de Young varía si una misma célula es maligna o no, o si la célula está sometida a ciertos estreses mecánicos o químicos [56-67]. En resumen, se ha visto que la rigidez es un buen marcador

de los diferentes procesos patológicos y fisiológicos a los que se encuentra sometida la célula y su entorno. No solo eso, si no que existen protocolos perfectamente desarrollados para realizar dichos análisis [27, 68]

Sin embargo, describir la célula mediante un solo parámetro relacionado con la elasticidad no es suficiente. Por un lado la alta complejidad interna de la célula [69, 70] incluye no solo elementos rígidos como el citoesqueleto, si no otros en fase líquida como el citosol. La respuesta mecánica de este sistema no puede ser puramente elástica, sino que tiene que tener cierta componente temporal. Por otro, si bien la descripción elástica proporciona información útil sobre la célula, ciertos procesos no se ven reflejados en el módulo de Young. Por ejemplo, células cancerígenas en diferentes estados de desarrollo ofrecen la misma rigidez estructural [62, 71, 72]. Debido a estas limitaciones del modelo elástico, se han propuesto y llevado a cabo estudios suponiendo que la célula se comporta como un material viscoelástico. Vamos a describirlos.

Descripción viscoelástica

Una primera ventaja de asumir viscoelasticidad es que nos ofrece, incluso en su versión más básica (modelo de Kelvin-Voigt), más de un grado de libertad al parametrizar el sistema. Este aumento de grados de libertad nos permite lidiar con la complejidad estructural y de comportamiento temporal de la célula. Además diversas investigaciones han mostrado la importancia de la viscosidad en los procesos internos en células de mamífero [6, 44, 46, 70, 73-79]. Sin embargo, no existe ni un modelo [30, 80-82] ni una metodología universalmente aceptada para realizar dichas medidas [27, 44, 68, 72, 75, 76, 83-85]. Las metodologías usadas para realizar medidas viscoelásticas en células usando un AFM se pueden dividir grosso modo en dos variantes: Métodos oscilatorios (similares a las de AFM dinámico) y de respuesta temporal.

En las primeras la punta penetra la muestra hasta cierta indentación, y una vez fijada esa posición, se provoca una oscilación sinusoidal de la micropalanca [74, 84, 85]. Una variante de dicha metodología serían los experimentos de multifrecuencia [46, 76, 84-86], en los cuales la oscilación es una suma de distintas sinusoidales a distintas frecuencias. El tratamiento teórico de estos métodos suele ser de gran complejidad [84], así como la interpretación de los parámetros obtenidos. Por ejemplo, un parámetro que se obtiene frecuentemente de estas medidas oscilatorias para cuantificar la viscosidad es el llamado “*Loss-tangent*” [71, 84]. Este parámetro, aunque natural en las teorías oscilatorias (representa el ratio entre la energía disipada y la energía conservada en el material durante un ciclo de oscilación [32]), no tiene un equivalente mecánico directo en el modelo del material.

La otra principal metodología para medir las propiedades viscoelásticas es la obtención de la respuesta temporal ante un estímulo mecánico constante en el tiempo. Este estímulo puede ser en fuerza (midiéndose en tal caso la respuesta en deformaciones en función del tiempo de la célula) o en deformaciones (donde se mediría la respuesta temporal de la fuerza). Los primeros son denominados de “*Creep*”, ya que miden como el material cede [44, 75, 76], mientras que los segundos son llamados experimentos de “*Load-relaxation*”, ya que se mide como la fuerza se relaja [49, 70, 83]. Estas metodologías requieren mantener un control continuo de la posición vertical de la micropalanca en función de la respuesta de la muestra, lo cual las hace relativamente complicadas de implementar.

El AFM ofrece otras metodologías para realizar las medidas, quizás no tan usadas como las anteriores. Una de ellas es medir directamente curvas fuerza-distancia penetrando la muestra a velocidad constante. De esta forma la energía absorbida por la muestra estará relacionada con la histéresis entre la curva de ida y la de vuelta [29, 87, 88]. Dado que esta energía mide indirectamente la viscosidad, parecería que el problema está resuelto. Sin embargo, los detalles para obtener los parámetros por este método distan de ser triviales, ya que requieren conocer tanto el modelo [89] como el comportamiento del área de contacto con la indentación. Uno de los principales objetivos de esta tesis es dar una respuesta lo más completamente posible a las cuestiones que plantea esta metodología.

Como hemos dicho, no existe un modelo comúnmente aceptado en la bibliografía para describir el comportamiento viscoelástico de la célula. De todas formas, los más extendidos son el Kelvin-Voigt [6] (debido a su sencillez), el *Standard-linear-solid* [6] (SLS, el más sencillo que describe correctamente tanto experimentos de *creep* como de *load-relaxation*) y el *Power-law* [6, 76] (que tiene una base teórica bastante sólida). En los apéndices se puede encontrar la descripción matemática de cada uno de ellos.

Heterogeneidad y dimensiones finitas

Dado que no existe un acuerdo generalizado sobre qué combinación de modelo viscoelástico y metodología es la más adecuada para describir una célula, se han estudiado en profundidad las distintas limitaciones de todos ellos. Se ha discutido el efecto de la no linealidad [90-93], del modelo mecánico para describir la deformación de la célula [90, 93-95], o de la relación entre viscosidad y energía disipada [71, 78, 86]. Por otro lado, existen otras cuestiones experimentales donde ha habido un intenso debate, como la localización del punto de contacto en las curvas de fuerza-distancia [96], la calibración de la punta [97, 98], o la influencia de los efectos hidrodinámicos [99, 100]. En esta tesis vamos a afrontar dos de las limitaciones más importantes, las cuales no cuentan con una solución en la bibliografía: la heterogeneidad interna célula (debida a los distintos componentes que forman la misma: citoesqueleto, citosol...) y las dimensiones finitas de la célula (del orden de 100 nm de grosor en algunos puntos). Es decir, la mayoría de modelos físicos usados para describir la indentación del AFM suponen que la célula es un objeto homogéneo de dimensiones infinitas.

Para corregir el problema de la dimensión finita se han propuesto varias alternativas. Por un lado existen modelos de contacto que tienen en cuenta las dimensiones laterales de la muestra [101], pero dado que las dimensiones laterales de una célula son relativamente grandes en comparación con el radio de contacto (del orden de decenas de micras), dichos modelos no ha sido usados mayoritariamente por la comunidad. Sin embargo, dado que el grosor de la célula si puede ser del orden de la profundidad de indentación, el problema de la dimensión vertical sí ha sido estudiado con más detalle. Normalmente, la célula se encuentra apoyada en una base sólida, cuya rigidez es varios órdenes de magnitud mayor que la de la propia célula. Por lo tanto, al realizar experimentos en las zonas de menor grosor, los parámetros mecánicos obtenidos se ven afectados por la presencia de dicho sustrato [102]. Se ha obtenido una solución particular para un indentador esférico sobre una muestra elástica [90]. Sin embargo, la extensión de dichas soluciones a otras geometrías no ha sido resuelta completamente [94, 103], y además esta solución solo es válida para el caso elástico. Si bien se ha estudiado el problema de forma más general usando métodos numéricos [104], hasta el momento no se ha obtenido una solución analítica general al problema del sustrato.

Por otro lado, tenemos el problema de la heterogeneidad interna de la célula [69, 105]. Si bien se han obtenido imágenes de altísima resolución lateral que permiten ver las estructuras de una célula [106] el problema de obtener la misma resolución en el eje vertical no ha tenido tanto éxito. Se ha probado que el AFM es capaz de localizar estructuras bajo una superficie usando métodos de holografía ultrasónica [107-109], resonancia de contacto [110] y de multifrecuencia [111, 112]. Sin embargo, en la tarea de realizar la tomografía de una célula usando solo las curvas de fuera-distancia de una célula los éxitos han sido más limitados. Aunque se han visualizado ciertas estructuras y procesos biológicos [45, 113, 114], hasta el momento no se ha podido obtener un mapa tomográfico completo del interior de la célula.

1.4 Objetivos de esta tesis

En esta tesis vamos a intentar mejorar las descripciones teóricas existentes para el estudio mecánico de una célula mediante AFM. Como hemos visto, hasta el momento se había analizado la célula principalmente como un medio puramente elástico, de dimensiones infinitas. Si bien se han planteado otros modelos (viscoelásticos) y otras geometrías (grosor finito), nuestro objetivo será extender y completar dichos análisis en la medida de lo posible. Un resumen general de los diferentes capítulos es el siguiente:

Capítulo 2:

En este capítulo analizaremos como serían las fuerzas obtenidas por el AFM en el caso de que la célula tuviera un comportamiento viscoelástico. Obtendremos soluciones exactas para la combinación entre los modelos más usados en la práctica (Kelvin-Voigt, SLS, Power-law) y las puntas más comunes en AFM (esférica, cónica y cilíndrica). Analizaremos en detalle dichas soluciones, así como las hipótesis en las que se basan. Finalmente aplicaremos nuestros resultados para analizar las propiedades mecánicas de un fibroblasto, así como la variación de dichas propiedades ante cambios temporales y químicos en el entorno de la célula.

Capítulo 3:

Hemos visto que el efecto del soporte rígido sobre el que se apoya la célula en las medidas mecánicas ha sido estudiado por diferentes investigadores, aunque no con la suficiente generalidad. Por lo tanto, extenderemos, completaremos (y en algunos caso corregiremos) las soluciones propuestas en la bibliografía, haciéndolas válidas para la mayoría de las geometrías usadas en las puntas de AFM. Para ello haremos uso de diferentes herramientas matemáticas, como las funciones de Green y el teorema de reciprocidad, que serán explicadas en detalle. Todas las soluciones de este capítulo serán válidas solo en el caso de que la célula sea vista como un material elástico.

Capítulo 4:

Una vez resuelto el problema de la viscoelasticidad en un medio infinito (capítulo 2) y el del efecto del soporte rígido en el cual se apoya la célula (capítulo 3), estudiaremos la combinación de ambos. Haciendo uso conjunto de las herramientas ya explicadas en los capítulos anteriores, obtendremos fórmulas cerradas para la fuerza en función de la indentación para el caso de una célula de grosor finito, suponiendo que la misma se comporta de forma viscoelástica. Proporcionaremos formulas generales así como soluciones concretas para los modelos viscoelásticos y geometrías de la punta más comunes.

Capítulo 5:

Las soluciones encontradas para los modelos viscoelásticos (capítulos 2 y 4) son solo válidos cuando la punta del AFM está entrando en la muestra, pero no cuando la misma se está retirando. En este capítulo analizaremos las causas de dicha limitación y estudiaremos las soluciones propuestas en la bibliografía. Resolveremos analíticamente el problema para los casos dados en los capítulos anteriores, de forma que el problema de la indentación de una célula viscoelástica de grosor finito quedará completamente resuelto.

Capítulo 6:

Todo el estudio realizado hasta ahora supone que la célula se comporta de manera homogénea, es decir, que sus propiedades mecánicas son una “media” de las propiedades de los diferentes elementos que forman su estructura interna. En este capítulo veremos hasta qué punto podemos ir más allá de esta hipótesis, analizando la heterogeneidad, tanto en profundidad como en la dimensión lateral, de un fibroblasto. Dada la dificultad del problema, este capítulo combinará simulaciones de elementos finitos con datos experimentales, siendo la relevancia de las soluciones analíticas bastante más limitada que en los capítulos anteriores. Finalmente intentaremos combinar todo lo aprendido para obtener una tomografía mecánica en 3D de la célula.

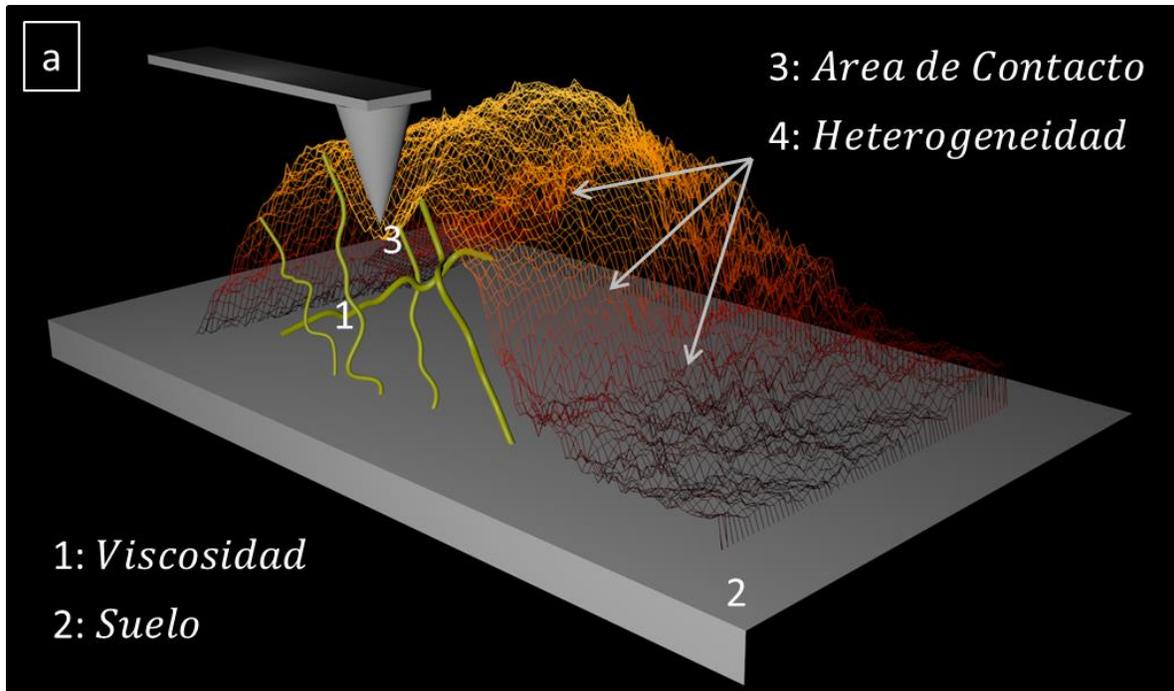


Fig. 1-3: Esquema 3D de la medida de una célula, con los diferentes problemas a explorar en esta tesis. (1) Viscosidad debido a la complejidad interna. (2) Efecto de la rigidez del suelo en las medidas. (3) Variación del área de contacto entre la punta y la muestra durante la indentación. (4) Análisis tridimensional de la heterogeneidad de la célula en diferentes puntos.

Enfoque

Aunque nuestro enfoque será principalmente teórico, nos apoyaremos fuertemente en el uso de métodos numéricos para confirmar o extender los resultados analíticos. En los apéndices explicaremos los paquetes comerciales usados (COMSOL para las simulaciones de elementos finitos y MATHEMATICA para los cálculos algebraicos). En esos mismos apéndices proporcionamos un resumen somero de diferentes resultados y conceptos, que, de ser explicados en el texto central, romperían la continuidad del mismo. Finalmente, hemos usado datos provenientes de experimentos con células reales. Debido a la falta de tiempo, no se ha podido realizar un estudio experimental completo de todos los resultados teóricos obtenidos en esta tesis. Dicha comprobación experimental, necesaria sin ninguna duda, quedará para el futuro.

Vamos entonces a intentar resolver el primer problema: La célula como elemento viscoelástico.

2. Viscoelasticidad

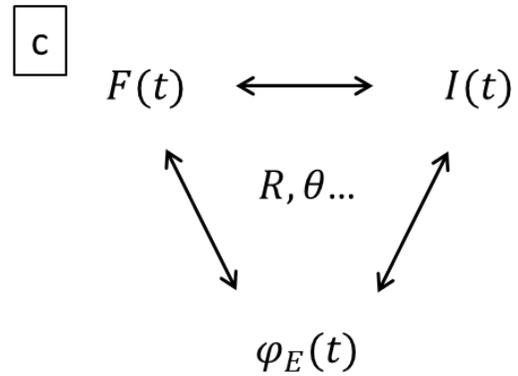
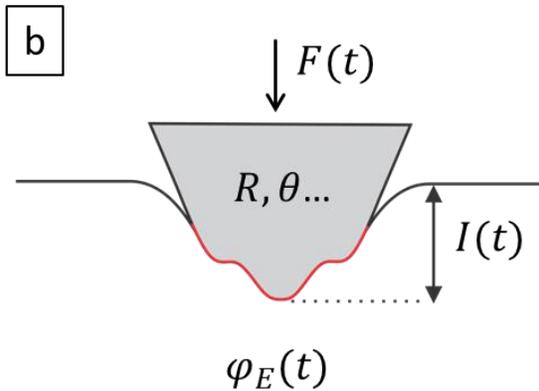
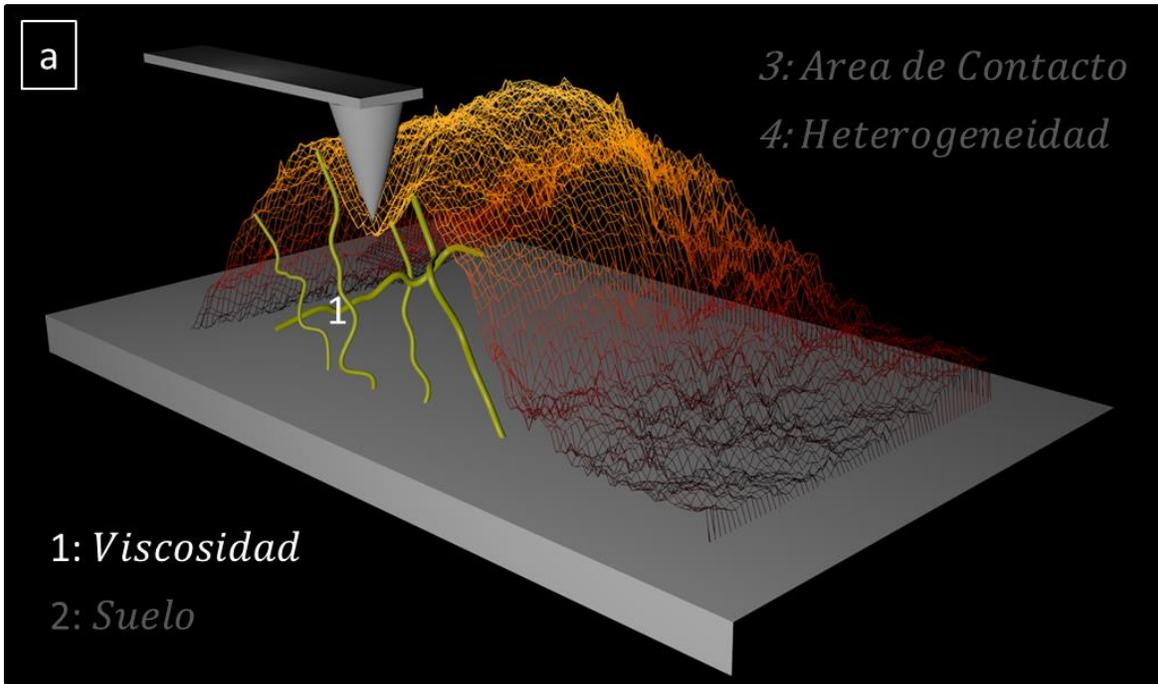


Fig. 2-0: (a) En este capítulo estudiaremos las propiedades viscoelásticas de una célula. (b) Dada una indentación en función del tiempo, este modelo de contacto simplificado nos dará una fuerza también en función del tiempo. (c) Para una geometría concreta de la punta (dada por una forma $f(r)$, pero normalmente resumida en un conjunto discreto de parámetros $R, \theta \dots$), la fuerza, la indentación y las propiedades viscoelásticas estarán relacionadas entre sí. Nuestro objetivo en este capítulo es encontrar dichas relaciones.

2.0 Introducción

En este capítulo vamos a intentar extender los modelos de contacto clásicos para un medio elástico seminfinito, al caso de que el medio incluya viscoelasticidad. Esto equivale a analizar la célula de la forma más simple posible: como un sólido homogéneo (sin partes diferenciadas espacialmente) e infinito (sin efectos del sustrato ni geometría propia). A pesar de estas limitaciones, veremos que la viscoelasticidad proporciona grados de libertad suficientes para explorar de forma adecuada algunas de las diferentes propiedades de la célula.

Si bien una célula real es un objeto altamente heterogéneo, dinámico y de dimensiones finitas [105], demostraremos que en la práctica podemos extraer información útil y relevante incluso con estas teorías limitadas, pero de gran simplicidad conceptual [6]. De todas formas, en los siguientes capítulos de esta tesis exploraremos y resolveremos algunas de estas limitaciones.

2.1 Ecuaciones básicas

Vamos en primer lugar a repasar las ecuaciones básicas de la elasticidad y de la viscosidad. Todo lo planteado en esta sección se puede encontrar en diferentes fuentes clásicas, por ejemplo [115, 116].

Elasticidad

En un sistema unidimensional, si asumimos que la fuerza es lineal con la deformación, solo existe una opción para la relación entre fuerza y deformación, la ley de Hooke:

$$F = kx \tag{2-1}$$

Donde k es un escalar que indica la rigidez del sistema unidimensional. En un sistema lineal tridimensional, se puede demostrar [116] que la generalización de 2-1 está dada por la siguiente relación tensorial:

$$\sigma_{ik} = C_{ijkl}u_{jk} \tag{2-2}$$

Donde el material está definido por 81 constantes de rigidez C_{ijkl} (que expresan la rigidez del material al ser deformado en cierta combinación de direcciones). σ_{ik} es el tensor que expresa las tensiones, mientras que u_{jk} está relacionado con las deformaciones (ver apéndice C.1 para una explicación más detallada de estos parámetros).

Afortunadamente, si suponemos que el material es isótropo (es decir, que no tiene direcciones preferenciales, que es igual de rígido en cualquier dirección que escojamos) solo necesitaremos dos constantes de rigidez para describir el material. En este caso la ecuación 2-2 se simplifica notablemente, pudiéndose escribir de forma explícita

$$\sigma_{ik} = Ku_{ll}\delta_{ik} + 2G\left(u_{ik} - \frac{1}{3}u_{ll}\delta_{ik}\right) \tag{2-3}$$

Donde K es el módulo de compresibilidad (dificultad para cambiar el volumen del material), y G es el módulo de rigidez a torsión (dificultad para “retorcer” el material).

Si bien la ecuación 2-3 está dada en función de los dos escalares K y G , podemos escoger cualquier otro conjunto de parámetros que se adapten mejor a nuestro problema experimental. Por ejemplo, si tenemos un sistema experimental que nos proporcione el valor de E (dificultad para comprimir el material en cierta dirección, dando libertad de movimientos en las otras direcciones) y de ν (relacionada con el cambio de volumen cuando comprimimos el material en una dirección determinada), la ecuación 2-3 sería

$$\sigma_{ik} = \frac{E}{3(1-2\nu)} u_{ll} \delta_{ik} + \frac{E}{(1+\nu)} \left(u_{ik} - \frac{1}{3} u_{ll} \delta_{ik} \right) \quad 2-4$$

que es la que vamos a usar en esta tesis. De todas formas, en el apéndice C.2 se proporciona una tabla con las relaciones entre los parámetros elásticos más usados en la práctica.

En principio, los parámetros elásticos (ya sean E y ν , o cualquier otra pareja válida), deberían variar de punto a punto. Obviamente, la rigidez de la célula será diferente en diferentes puntos de la misma (una zona donde hay un microtúbulo, por ejemplo, será más dura que otra donde solo hay citosol). Sin embargo, vamos a suponer que estas variables son constantes en toda nuestra célula. Es decir, en solo dos números estaría comprimida toda la información sobre el citoesqueleto, núcleo, orgánulos... Esta es la hipótesis de homogeneidad, que mantendremos hasta el capítulo 6, donde trataremos la heterogeneidad.

Viscoelasticidad

Si ahora la fuerza dependiera del historial de deformaciones, y no solo de la deformación en el instante de medida t , la expresión 2-1 para un sistema unidimensional lineal se trasformaría en [115]

$$F(t) = \int_0^t \varphi_k(t-\tau) \frac{d[x(\tau)]}{d\tau} d\tau \quad 2-5$$

Donde la función $\varphi_k(t)$ es el equivalente viscoelástico de la constante k de un muelle en el sistema elástico puro (ver apéndices). Esta función representa la respuesta en fuerza cuando aplicamos una deformación unitaria al sistema (es decir, comprimimos el sistema exactamente una unidad de deformación, y vemos cómo responde la fuerza con el tiempo). De ahí su nombre: función de relajación.

En la ecuación anterior podemos definir el operador integral que actúa sobre la deformación $x(\tau)$ como

$$\int_0^t \varphi_k(t-\tau) \frac{d[\]}{d\tau} d\tau \rightarrow \Psi_k(t) \quad 2-6$$

De forma que podemos reescribir 2-5 de una forma más compacta

$$F(t) = \Psi_k(t)x(t) \quad 2-7$$

Si nos fijamos, esta ecuación es formalmente igual a su equivalente elástico 2-1, solo que la constante de elasticidad k se ha convertido en un operador integral $\Psi_k(t)$, y la multiplicación ha de entenderse como la “aplicación” de dicho operador. Antes de pasar a la generalización de 2-5 al caso tridimensional, vamos a realizar una transformada de Laplace de la misma. Para ello debemos notar que el operador $\Psi_k(t)$ es una convolución (ver apéndice B.1.3), por lo que la transformada de 2-7 sería

$$\hat{F}(p) = \hat{\varphi}_k(p)p\hat{x}(p) = \hat{\Psi}_k(p)\hat{x}(p) \quad 2-8$$

donde el “sombrecito” $\hat{}$ encima de cada variable implica que se encuentran definidas en el dominio de Laplace. A partir de ahora, no pondremos explícitamente la variable independiente (t o p), sino que lo marcaremos implícitamente con la ausencia o no de sombrero.

De esta forma podemos ver que, al realizar la transformada de Laplace, la relación entre fuerza y deformación es lineal, como en el caso puramente elástico (las ecuaciones 2-8 y 2-1 son equivalentes). La única diferencia es que ahora, en vez de tener constantes elásticas, tenemos operadores lineales (que dependen directamente de funciones de relajación). Esto nos permite escribir la ecuación para el sólido viscoelástico 3D de forma similar al caso elástico (ecuación 2-3), solo que ahora las constantes elásticas son operadores del tipo 2-6 en dominio de Laplace.

$$\hat{\sigma}_{ik} = \hat{\Psi}_k \hat{u}_{ll} \delta_{ik} + 2\hat{\Psi}_G \left(\hat{u}_{ik} - \frac{1}{3} \hat{u}_{ll} \delta_{ik} \right) \quad 2-9$$

Si experimentalmente medimos otros parámetros y queremos expresar la ecuación de tensión-deformación en función de los mismos, en el dominio de Laplace las ecuaciones serán formalmente similares a las del caso elástico. Por ejemplo, el equivalente de la ecuación 2-4 sería

$$\hat{\sigma}_{ik} = \frac{\hat{\Psi}_E}{3(1 - 2\hat{\Psi}_\nu)} \hat{u}_{ll} \delta_{ik} + \frac{\hat{\Psi}_E}{(1 + \hat{\Psi}_\nu)} \left(\hat{u}_{ik} - \frac{1}{3} \hat{u}_{ll} \delta_{ik} \right) \quad 2-10$$

En principio las ecuaciones de tensión-deformación temporales para el caso viscoelástico 3D se obtendrían realizando la transformada de Laplace inversa de 2-10 (o de su equivalente 2-9). Esto es habitualmente muy difícil, ya que las transformadas inversas de Laplace solo tienen solución analítica en algunos casos particulares. Sin embargo, para los problemas de indentación a los que nos enfrentaremos con un AFM, existe una solución alternativa que explota una combinación entre las soluciones de problema elástico con la relación formal 2-6. Para utilizar esta vía, primero tendremos que ver cómo es la solución explícita del problema de indentación elástico, que daremos en la sección 2.3. Pero antes, intentaremos simplificar un poco más la ecuación 2-10.

2.2 Grados de libertad y coeficiente de Poisson

Tanto las ecuaciones elásticas (2-4) como las viscoelásticas (2-10) dependen de dos parámetros (o funciones de relajación, en el caso viscoelástico) para describir el material. Dado que cada parámetro está relacionado con un experimento, requeriríamos dos sistemas experimentales diferentes para

caracterizar perfectamente el material. Podríamos, por ejemplo, realizar un experimento de extensión longitudinal para obtener E, y otro de torsión para obtener G. Pero dado que solo contamos con datos experimentales provenientes de un AFM, solo podemos resolver un grado de libertad de los dos posibles ¿Cómo podemos resolver esta dificultad?

La contante plana de elasticidad

En realidad, cada experimento que inventemos tendrá asociada una constante de elasticidad. De la misma forma que la compresión longitudinal está relacionada con E, o que la torsión está relacionada con G, nada nos impide inventar nuestra propia constante de elasticidad para nuestro experimento particular. En el caso de la indentación de un sistema con una punta axisimétrica, se puede probar que nuestra nueva constante de elasticidad E^* sería

$$E^* = \frac{E}{1 - \nu^2} \quad 2-11$$

En la sección 2.3.2 veremos las soluciones clásicas para un indentador axisimétrico dadas por Sneddon [117] se podrían escribir en función de esta constante equivalente.

Para el sistema viscoelástico tendríamos una función de relajación nueva, definida (en el dominio de Laplace) por una expresión similar al de su equivalente elástico

$$\hat{\Psi}_E^* = \frac{\hat{\Psi}_E}{1 - (\hat{\Psi}_\nu)^2} \quad 2-12$$

Esta opción, aunque general, no resuelve el problema central de la existencia de dos grados de libertad. Es más, en el caso viscoelástico podemos encontrar la relación entre la nueva función de relajación $\hat{\Psi}_E^*$ y las clásicas ($\hat{\Psi}_E$ y $\hat{\Psi}_\nu$) solo en el dominio de Laplace, pero no en el dominio temporal (en el dominio del tiempo 2-12 no tendría la misma forma, es más, posiblemente no se podría escribir un ecuación cerrada al hacer la transformada inversa de Laplace). Sin embargo, dado que trabajamos con células, tenemos otra opción para lidiar con el problema: Usar la incompresibilidad de la célula.

Incompresibilidad de la célula

Como el contenido en agua de la célula es muy alto, podemos considerar la misma como incompresible[91, 118]. Si bien es cierto que a escalas grandes de tiempo la célula es capaz de modificar su volumen ante estímulos externos[119] (y quizás de forma intrínseca[120]), este cambio volumétrico es debido a un intercambio de agua forzado con el entorno. Por lo tanto, en las medidas puntuales (tanto desde el punto de vista espacial como temporal) de un AFM se puede considerar que este mecanismo no se activa, y por lo tanto, el volumen es constante. Es decir, el coeficiente de Poisson es prácticamente constante y muy cercano a 0.5. De esta forma nuestro sistema solo tiene un grado de libertad mecánico. Esto implica que en la ecuación básica de la elasticidad 2-4 el único parámetro que nos quedaría por obtener experimentalmente es E.

En el caso viscoelástico, el operador para el coeficiente de Poisson sería también una constante [121] en el dominio de Laplace (bajo las mismas hipótesis que en el caso elástico)

$$\hat{\Psi}_\nu = \nu \quad 2-13$$

Por lo que la relación fundamental 2-10 estaría dada por

$$\hat{\sigma}_{ik} = \frac{\hat{\Psi}_E}{3(1-2\nu)} \hat{u}_{ll} \delta_{ik} + \frac{\hat{\Psi}_E}{(1+\nu)} \left(\hat{u}_{ik} - \frac{1}{3} \hat{u}_{ll} \delta_{ik} \right) \quad 2-14$$

De la cual podemos calcular su equivalente directamente en el dominio del tiempo (usando el teorema de convolución)

$$\sigma_{ik} = \frac{\Psi_E}{3(1-2\nu)} u_{ll} \delta_{ik} + \frac{\Psi_E}{(1+\nu)} \left(u_{ik} - \frac{1}{3} u_{ll} \delta_{ik} \right) \quad 2-15$$

Podemos ver que tanto 2-14 como su equivalente temporal 2-15 solo dependen de una función de relajación φ_E (ya que el operador Ψ_E depende de ella directamente), que será la única incógnita para definir nuestro sistema. Por lo tanto, toda la información mecánica de la célula estará comprimida en dicha función.

Si bien podríamos pensar que existe una divergencia en las ecuaciones 2-4, 2-14 y 2-15 en el caso de la incompresibilidad (ya que $\nu = 0.5$ hace que el denominador del primer término sea infinito), la propia definición de incompresibilidad soluciona el problema. Se puede demostrar que el cambio de volumen en un deformación está dado por $\Delta V = u_{ll}$, por lo que la incompresibilidad equivale a decir que $u_{ll} = 0$. De esta forma, en el caso incompresible, al no haber cambio de volumen el primer término de las ecuaciones es igual a cero, eliminando la divergencia[116].

2.3 El problema de la indentación elástico

Supongamos que tenemos un medio elástico seminfinito, regido por la ecuación 2-4. Si penetramos este medio con una punta de simetría axial, cuya forma está dada por una función $f(t)$... ¿Cuál será la fuerza F necesaria para alcanzar cierta indentación I ? Esta cuestión es conocida como problema de Boussinesq, y se adapta perfectamente a la situación experimental que encontramos con un AFM (Ver figura 2-1). Una cuestión paralela que sería interesante explorar es cómo evoluciona el área de contacto (definido mediante el radio de la misma r) con la indentación. Aunque el AFM no puede medir este parámetro (aunque se puede estimar usando microscopios de confocal [78]), veremos más adelante que es de importancia para comprender el comportamiento de una muestra viscoelástica.

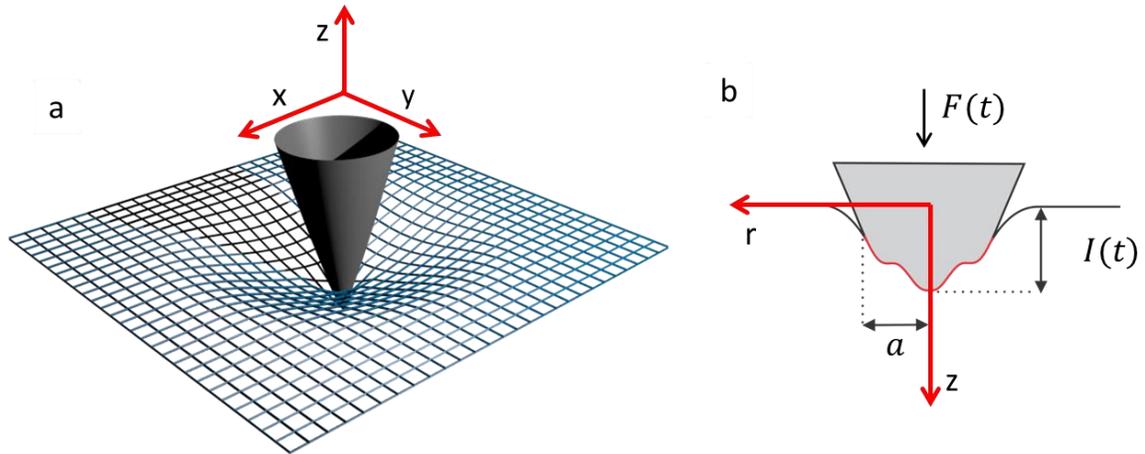


Fig. 2-1: Problema de la indentación. (a) Una punta penetra una muestra (visco)elástica, la cual tiene un grosor infinito. (b) Esquema del problema 2D equivalente una vez aplicada la simetría axial. El objetivo es hallar $F(t)$ en función de $I(t)$.

Es interesante notar que, aunque el problema es claramente tridimensional, la simetría axial del indentador (junto con la isotropía del medio a indentar), permiten utilizar coordenadas cilíndricas. La relación entre las coordenadas generales y las que usaremos en el resto de la tesis están dadas por:

3D	2D cilíndrico	
x, y	$r = \sqrt{x^2 + y^2}$	2-16
$z > 0$ fuera de la muestra	$z > 0$ dentro de la muestra	

Hemos definido z como positivo hacia dentro de la muestra, de forma que las indentaciones correspondan con una coordenada positiva. Vamos a ver las condiciones de contorno en este sistema de coordenadas.

Condiciones de contorno

Para resolver este problema necesitamos indicar unas condiciones de contorno, que nos permitirán resolver la ecuación 2-4. En primer lugar sabemos que, dentro de la zona de contacto ($r < a$, donde a es el radio del área de contacto), la superficie de la muestra tiene que adaptarse a la forma de la punta (que suponemos conocida: $f(r)$). Fuera de la zona de contacto ($r > a$), las presiones verticales deben ser igual a cero, ya que no hay nada que ejerza fuerzas sobre la muestra. También supondremos que no hay fricción, por lo que las presiones laterales deben ser nulas en toda la superficie de la muestra. Las ecuaciones que resumen todas estas condiciones físicas son:

$$\begin{aligned}
 u_z &= I - f(r) & r < a, z = 0 \\
 \sigma_{zz} &= 0 & r > a, z = 0 \\
 \sigma_{zy} = \sigma_{zx} &= 0 & \forall r, z = 0
 \end{aligned}
 \tag{2-17}$$

Para resolver un sistema de ecuaciones diferenciales las condiciones de contorno deberían estar especificadas en todo el contorno del problema, pero hasta ahora solo hemos hablado de la superficie superior de la muestra. Otra condición de contorno que no suele aparecer explícitamente

en la literatura (aunque se asume implícitamente) es la de que las tensiones tienden a cero en el infinito.

$$\begin{aligned} \sigma_{ij} &= 0 & r &\rightarrow \infty \\ \sigma_{ij} &= 0 & z &\rightarrow \infty \end{aligned} \quad 2-18$$

Experimentalmente esto implica que la célula es muy grande en comparación con el área de contacto entre la célula y la punta del AFM. Esta hipótesis es razonable cuando medimos en el centro de la célula, pero es claramente falsa cuando realizamos el experimento en los bordes de la misma, que son bastante más finos. En el capítulo 3 veremos cómo solucionar este problema.

Con el AFM solo podemos medir la fuerza total F , no la distribución de presiones vertical $\sigma_{zz}(r)$. Sin embargo, la fuerza no es más que la integral de las presiones verticales en el área de contacto

$$F = 2\pi \int_0^a \sigma_{zz}(r)rdr \quad 2-19$$

Por lo que si encontramos la solución para 2-4 tendremos la fuerza total.

Soluciones clásicas elásticas

Para las condiciones de contorno dadas en la sección anterior existían soluciones particulares para el punch y para la esfera [122, 123]. Sin embargo Sneddon [117] obtuvo en 1965 una solución general para cualquier indentador asimétrico de geometría conocida. Dichas soluciones están dadas por expresiones de la forma

$$F = \alpha EI^\beta \quad 2-20$$

Donde los parámetros α y β dependen de la geometría del indentador. En la siguiente tabla ofrecemos los valores para las tres geometrías más comunes:

	α	β
Cilindro	$\frac{2R_c}{(1-\nu^2)}$	1
Cono	$\frac{2\tan[\theta]}{\pi(1-\nu^2)}$	2
Esfera	$\frac{4\sqrt{R_t}}{3(1-\nu^2)}$	1.5

2-21

Sneddon no solo resolvió el problema de calcular la fuerza en función de la indentación, sino que también el de calcular el área de contacto. El radio de esta área de contacto está dado por una forma similar a la de la fuerza, pero con unos coeficientes diferentes

$$a = \lambda I^\theta \quad 2-22$$

De nuevo, resumimos los coeficientes más comunes calculados por Sneddon

	λ	θ
Cilindro	R_c	0
Cono	$\frac{2\tan[\theta]}{\pi}$	1
Esfera	$\sqrt{R_t}$	0.5

2-23

Hasta aquí, nada nuevo que no pudiéramos encontrar en la abundante bibliografía sobre el tema [117, 122]. Vamos a ver como añadir viscoelasticidad.

2.4 El problema de la indentación viscoelástico

La idea es solucionar el mismo problema que en el caso puramente elástico, pero ahora la ecuación del material estará dada por la inversa temporal de 2-9 (o de cualquiera de sus equivalentes, por ejemplo 2-10) en vez de por 2-3. Las condiciones de contorno serán exactamente las mismas que en el caso elástico.

Podríamos pensar en transformar todo el problema al dominio de Laplace, ya que ahí las ecuaciones de tensión-deformación tienen una estructura similar a las del problema elástico (del que ya sabemos la solución). Dada esta similitud entre estructuras, si sabemos la solución del problema elástico, conoceremos automáticamente la solución en el caso viscoelástico. Las dificultades surgen al intentar transformar las condiciones de contorno (ecuación 2-17). Estas condiciones no son exclusivamente de desplazamiento o de presión para todos los instantes de tiempo, si no que dependen del área de contacto en un momento dado. Es decir, un mismo punto de la superficie tiene, para diferente t , distintas condiciones de contorno, según esté dentro o fuera del área de contacto.

De esta forma, no podemos encontrar un equivalente de las condiciones de contorno 2-17 en el dominio de Laplace. Esto impide utilizar esta estrategia para el caso viscoelástico [124, 125]. Cabe destacar que en el caso de un cilindro, al ser el área constante durante todo el experimento, sí se puede encontrar una solución directamente. Vamos a analizar el resto de las geometrías.

Procedimiento de Lee y Radok

Lee y Radok [125] propusieron una solución al problema de indentación viscoelástico basada en las relaciones formales 2-6 y 2-7. En ellas podemos ver (para el problema 1-D) que la constante de rigidez en el problema elástico es equivalente a un operador de convolución $\Psi_k(t)$. Siguiendo esta analogía, podemos aplicar la siguiente transformación formal a la solución del problema 3-D elástico

$$E \rightarrow \Psi_E = \int_0^t \varphi_E(t - \tau) \frac{d[\]}{d\tau} d\tau \quad 2-24$$

Es decir, a la solución elástica descrita en 2-20 le aplicaremos la transformación 2-24, obteniendo

$$F_{elastico} = \alpha EI^\beta \rightarrow F_{visco} = \alpha \Psi_E I^\beta = \alpha \int_0^t \varphi_E(t - \tau) \frac{d[I^\beta]}{d\tau} d\tau \quad 2-25$$

A pesar de lo sugerente de la idea, dado que las soluciones elásticas no son en general lineales con la indentación (el exponente β es mayor que uno salvo en el caso del cilindro), el demostrar que 2-25 es realmente la solución al problema de indentación tridimensional viscoelástico no es obvio. En esta tesis no entraremos en detalles sobre dicha demostración, si no que nos limitaremos a calcular las ecuaciones concretas para ciertos casos de relevancia práctica, validando las soluciones encontradas comparándolas con simulaciones FEM.

2.5 Soluciones particulares para Kelvin-Voigt.

Si suponemos que la función de relajación está dada por el modelo de Kelvin-Voigt (ver apéndice D.2.1), la ecuación 2-25 será:

$$F = \alpha \int_0^t [E + \eta_E \delta(t - \tau)] \frac{d[I^\beta]}{d\tau} d\tau \quad 2-26$$

En este caso podemos encontrar una solución independientemente de la forma de la indentación con el tiempo, integrando directamente la expresión anterior.

$$F = \alpha EI^\beta + \alpha \beta \eta_E I^{\beta-1} \dot{I} \quad 2-27$$

Es interesante notar que en esta solución tiene la parte elástica y viscosa claramente separada en dos sumandos, lo cual facilita la interpretación. Al final del capítulo daremos una posible interpretación física para cada uno de los sumandos en el caso de una célula. En la bibliografía de reología [115] se suele hablar a menudo del coeficiente de viscosidad en cortante (η_G), mientras que la expresión 2-27 está expresada en función de la viscosidad en compresión (η_E). La relación entre ellos estará dada, en el caso incompresible, por (ver apéndice D.2.1)

$$\eta_E = 3\eta_G \quad 2-28$$

De esta forma, para comparar valores, es más conveniente reescribir la fuerza como

$$F = \alpha EI^\beta + 3\alpha \beta \eta_G I^{\beta-1} \dot{I} \quad 2-29$$

Vamos a calcular las diferentes expresiones de la fuerza para algunas geometrías de punta comunes.

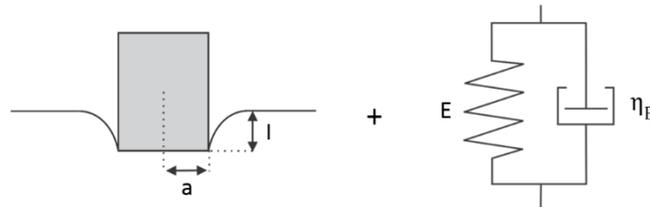


Fig. 2-2: Esquema de indentación de un cilindro combinado con el modelo de Kelvin-Voigt.

En este caso tendremos que $\beta = 1$ y $\alpha = \frac{2a}{(1-\nu^2)}$, lo que junto con la expresión para la velocidad convierten la ecuación 2-27 en

$$F = \frac{2a}{(1-\nu^2)}(EI + \eta_E \dot{l}) \quad 2-30$$

El primer sumando coincide con el caso puramente elástico resuelto por Sneddon. Es interesante notar que la fuerza es lineal con la penetración y con la velocidad. Esta linealidad es debida a que el radio de contacto es independiente de estas variables.

En el caso de que la muestra sea incompresible (por ejemplo, en la aplicación particular de la célula), sabemos que $\nu = 0.5$ y que $\eta_E = 3\eta_G$, por lo que la fuerza sería

$$F = \frac{8}{3}a(EI + 3\eta_G \dot{l}) \quad 2-31$$

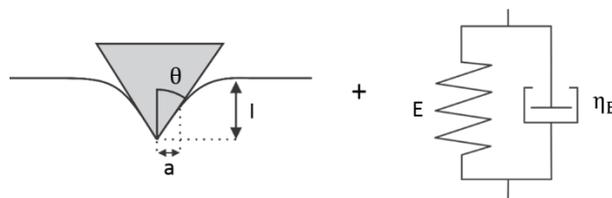


Fig. 2-3: Esquema de indentación de un cono combinado con el modelo de Kelvin-Voigt.

En este caso tendremos que $\beta = 2$ y $\alpha = \frac{2\tan[\theta]}{\pi(1-\nu^2)}$, lo que junto con la expresión para la velocidad convierten la ecuación 2-27 en

$$F = \frac{2\tan[\theta]}{\pi(1-\nu^2)}I(EI + 2\eta_E \dot{l}) \quad 2-32$$

De nuevo, el primer sumando es exactamente igual que el obtenido en el caso elástico. Sin embargo, en este caso hemos perdido la linealidad con la indentación. Esto es debido a que el radio de contacto va variando en función de la indentación (la relación entre ambas variables estaría dada por la geometría del cono).

La simplificación al caso incompresible sería

$$F = \frac{8 \text{Tan}[\theta]}{3\pi} I (EI + 6\eta_G \dot{I}) \quad 2-33$$

Esfera

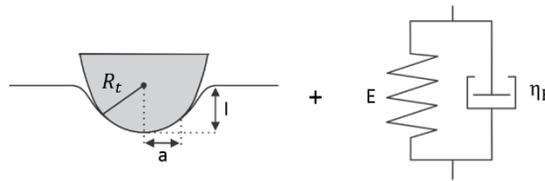


Fig. 2-4: Esquema de indentación de una esfera combinada con el modelo de Kelvin-Voigt.

En este caso tendremos que $\beta = 1.5$ y $\alpha = \frac{4\sqrt{R_t}}{3(1-\nu^2)}$, lo que junto con la expresión para la velocidad convierten la ecuación 2-26 en

$$F = \frac{4\sqrt{IR_t}}{3(1-\nu^2)} \left(EI + \frac{3}{2} \eta_E \dot{I} \right) \quad 2-34$$

De nuevo, la primera parte es la solución clásica de Hertz para el problema de indentación elástico. Para nuestro ejemplo particular de una célula incompresible tendríamos

$$F = \frac{16\sqrt{IR_t}}{9} \left(EI + \frac{9}{2} \eta_G \dot{I} \right) \quad 2-35$$

Nótese que estas expresiones difieren de algunas encontradas habitualmente en la bibliografía de AFM [89]. Estas diferencias son debidas a que en algunos estudios no se ha analizado la tridimensionalidad del problema, asumiéndose una extensión del caso unidimensional como válida

2.6 Soluciones particulares para SLS

Si suponemos que la función de relajación está dada por el modelo de SLS (ver apéndice D.2.2), la ecuación 2-25 será

$$F = \alpha \int_0^t \left[E_1 + E_2 e^{-\frac{E_2}{\eta_E}(t-\tau)} \right] \frac{d[I^\beta]}{d\tau} d\tau \quad 2-36$$

Si intentamos realizar la integración, veremos que se compone de dos sumandos

$$F = \alpha E_1 I^\beta + \alpha \beta E_2 \int_0^t e^{-\frac{E_2}{\eta_E}(t-\tau)} I^{\beta-1} \dot{I} d\tau \quad 2-37$$

El primero es exactamente igual al caso puramente elástico, y tiene solución cerrada para cualquier función de indentación temporal. El segundo término se podrá integrar solo para ciertos casos particulares. Uno de ellos es cuando la indentación es lineal con el tiempo (es decir, la velocidad es constante). Esta indentación también es llamada triangular.

$$I = vt \quad 2-38$$

Dado que dicho esquema de indentación es de interés práctico, veamos cómo es la solución para la fuerza para diferentes geometrías bajo tal hipótesis.

Cilindro e indentación lineal

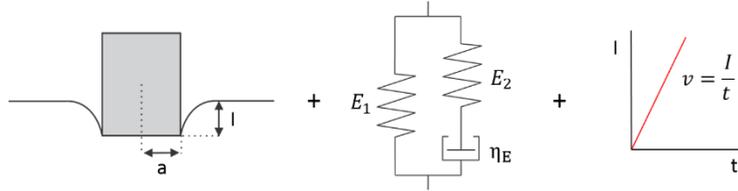


Fig. 2-5: Esquema de indentación de un cilindro combinada con el modelo SLS y con una indentación a velocidad constante.

En este caso tendremos que $\beta = 1$ y $\alpha = \frac{2a}{(1-\nu^2)}$, lo que junto con la expresión para la velocidad convierten la expresión 2-37 en

$$F = \frac{2a}{(1-\nu^2)} E_1 I + \frac{2a}{(1-\nu^2)} E_2 \int_0^t e^{-\frac{E_2}{\eta_E}(t-\tau)} v d\tau \quad 2-39$$

En este caso podemos integrar el segundo término, por lo que la solución general será

$$F = \frac{2a}{(1-\nu^2)} E_1 I + \frac{2a}{(1-\nu^2)} \eta_E v \left(1 - e^{-\frac{E_2 t}{\eta_E}} \right) \quad 2-40$$

Y en el caso incompresible

$$F = \frac{8}{3} a \left[E_1 I + \eta_E v \left(1 - e^{-\frac{E_2}{3\eta_E} t} \right) \right] \quad 2-41$$

Es interesante ver que, para tiempos muy grandes y para esta geometría en concreto, el modelo de SLS a velocidad constante equivale al de Kelvin-Voigt. En efecto, si en hacemos $t \rightarrow \infty$ en la expresión 2-40, obtenemos exactamente la solución de Kelvin-Voigt hallada anteriormente (ecuación 2-30). Esto es debido a que, para tiempos largos, el amortiguador llega a un equilibrio con el muelle con el que encuentra en serie.

Cono e indentación lineal

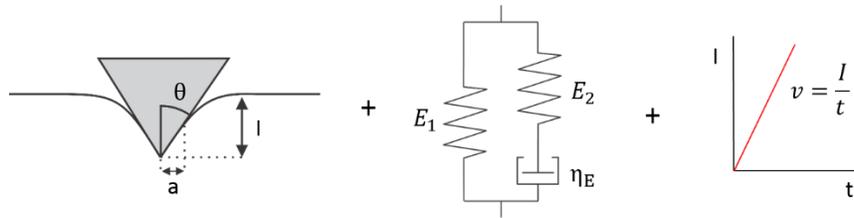


Fig. 2-6: Esquema de indentación de un cono combinada con el modelo SLS y con una indentación a velocidad constante.

En este caso tendremos que $\beta = 2$ y $\alpha = \frac{2 \tan[\theta]}{\pi(1-\nu^2)}$, lo que junto con la expresión para la velocidad convierten la ecuación 2-37 en

$$F = \frac{2 \tan[\theta]}{\pi(1-\nu^2)} E_1 I^2 + \frac{2 \tan[\theta]}{\pi(1-\nu^2)} E_2 2 \int_0^t e^{-\frac{E_2}{\eta_E}(t-\tau)} v^2 \tau d\tau \quad 2-42$$

En este caso podemos integrar el segundo término, por lo que la solución final será

$$F = \frac{2 \tan[\theta]}{\pi(1-\nu^2)} E_1 I^2 + \frac{4 \tan[\theta]}{\pi(1-\nu^2)} v \eta_E I + \frac{4 \tan[\theta]}{\pi(1-\nu^2)} \frac{(v \eta_E)^2}{E_2} \left(e^{-\frac{E_2}{\eta_E} t} - 1 \right) \quad 2-43$$

Y en el caso incompresible

$$F = \frac{8 \tan[\theta]}{3\pi} \left[E_1 I^2 + 2 v \eta_E I + 2 \frac{(v \eta_E)^2}{E_2} \left(e^{-\frac{E_2}{3\eta_E} t} - 1 \right) \right] \quad 2-44$$

Al contrario que en el caso del cilindro, para esta geometría no se cumple la equivalencia con la solución de Kelvin-Voigt cuando $t \rightarrow \infty$, ya que en este límite 2-43 no tiende a 2-32. Esto es debido a que el área de contacto nunca es constante, por lo que nunca se llega a alcanzar un equilibrio interno entre el amortiguador y el muelle con el que está en serie.

Sin embargo, sí que se puede comprobar que el término puramente elástico es igual al obtenido clásicamente por Sneddon.

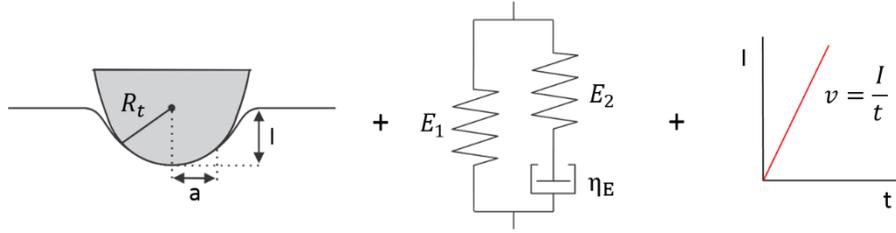


Fig. 2-7: Esquema de indentación de una esfera combinada con el modelo SLS y con una indentación a velocidad constante.

En este caso tendremos que $\beta = 1.5$ y $\alpha = \frac{4\sqrt{R_t}}{3(1-\nu^2)}$, lo que junto con la expresión para la velocidad convierten la ecuación 2-37 en

$$F = \frac{4\sqrt{R_t}}{3(1-\nu^2)} E_1 I^{1.5} + \frac{4\sqrt{R_t}}{3(1-\nu^2)} E_2 \frac{3}{2} \int_0^t e^{-\frac{E_2}{\eta_E}(t-\tau)} v^{\frac{3}{2}} \sqrt{\tau} d\tau \quad 2-45$$

En este caso podemos integrar el segundo término, pero usando la función de error para escribir la solución

$$F = \frac{4\sqrt{R_t}}{3(1-\nu^2)} E_1 I^{1.5} + \frac{4\sqrt{R_t}}{3(1-\nu^2)} \frac{3}{2} v \eta_E \sqrt{I} + \frac{4\sqrt{R_t}}{3(1-\nu^2)} \frac{3}{2} (v \eta_E)^{1.5} \sqrt{\frac{\pi}{E_2}} e^{-\frac{E_2}{\eta_E} t} \operatorname{erf} \left(\sqrt{\frac{E_2 t}{\eta_E}} \right) \quad 2-46$$

Donde $\operatorname{ERR}(x)$ es la función de error, la cual no tiene expresión analítica, pero se encuentra convenientemente estudiada y tabulada en la bibliografía.

De nuevo en el caso incompresible

$$F = \frac{16\sqrt{R_t}}{9} \left[E_1 I^{1.5} + \frac{9}{2} v \eta_G \sqrt{I} + \frac{3}{2} (3v \eta_G)^{1.5} \sqrt{\frac{\pi}{E_2}} e^{-\frac{E_2}{3\eta_G} t} \operatorname{erf} \left(\sqrt{\frac{E_2 t}{3\eta_G}} \right) \right] \quad 2-47$$

De la misma forma que en el caso del cono, cuando $t \rightarrow \infty$ no recuperamos la solución de Kelvin-Voigt para esta geometría.

2.7 Soluciones particulares para un modelo Power-law

Si suponemos que la función de relajación está dada por el modelo de Power-law (ver apéndice D.2.3), la ecuación 2-25 será:

$$F = \alpha \int_0^t \left[E_0 \left(\frac{(t - \tau)}{t_0} \right)^{-\gamma} \right] \frac{d[I^\beta]}{d\tau} d\tau \quad 2-48$$

De nuevo en este caso no podremos obtener una solución cerrada salvo para casos particulares de la indentación en función del tiempo. Dado que es de interés práctico, estudiaremos de nuevo el caso de velocidad constante para puntas de diferentes geometrías.

Cilindro e indentación lineal

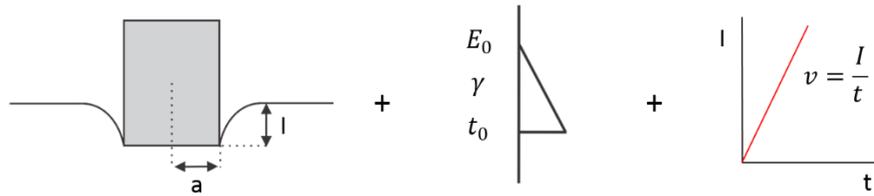


Fig. 2-8: Esquema de indentación de un cilindro combinada con el modelo Power-law y con una indentación a velocidad constante.

En este caso tendremos que $\beta = 1$ y $\alpha = \frac{2a}{(1-\nu^2)}$, lo que junto con la expresión para la velocidad transforman la ecuación 2-48 en

$$F = \frac{2a}{(1 - \nu^2)} E_0 \int_0^t \left[\left(\frac{(t - \tau)}{t_0} \right)^{-\gamma} \right] v d\tau \quad 2-49$$

La integral se puede resolver fácilmente, obteniendo la expresión final

$$F = \frac{2a}{(1 - \nu^2)} \frac{E_0 v}{(-\gamma + 1)} \frac{t^{-\gamma+1}}{t_0^{-\gamma}} \quad 2-50$$

Podemos ver que en los caso límites de un sólido ($\gamma = 0$) y de un líquido ($\gamma = 1$), recuperaremos, respectivamente, la parte elástica y viscosa del modelo de Kelvin-Voigt para un cilindro (ecuación 2-30). Sin embargo, en este modelo no tenemos una separación clara entre viscosidad y elasticidad, característica que se va a repetir en todas las geometrías.

Cono e indentación lineal

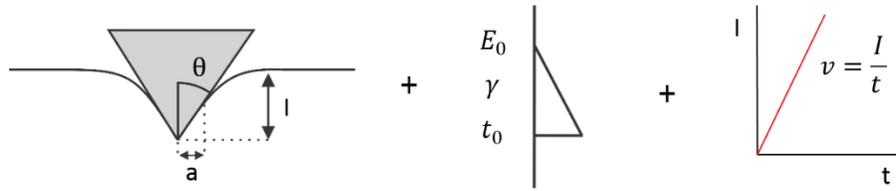


Fig. 2-9: Esquema de indentación de un cono combinada con el modelo Power-law y con una indentación a velocidad constante.

En este caso tendremos que $\beta = 2$ y $\alpha = \frac{2\tan[\theta]}{\pi(1-\nu^2)}$, lo que junto con la expresión para la velocidad convierten la ecuación 2-48 en

$$F = \frac{2\tan[\theta]}{\pi(1-\nu^2)} E_0 \int_0^t \left[\left(\frac{t-\tau}{t_0} \right)^{-\gamma} \right] 2\nu^2 \tau d\tau \quad 2-51$$

Si resolvemos la integral obtenemos

$$F = \frac{2\tan[\theta]}{\pi(1-\nu^2)} E_0 2\nu^2 \frac{t^{-\gamma+2}}{t_0^{-\gamma}} \frac{1}{2-3\gamma+\gamma^2} \quad 2-52$$

De nuevo observamos que en los caso límites de un sólido ($\gamma = 0$) y de un líquido ($\gamma = 1$), recuperaremos la parte elástica y viscosa del modelo de Kelvin-Voigt para un cono (ecuación 2-32).

Esfera e indentación lineal

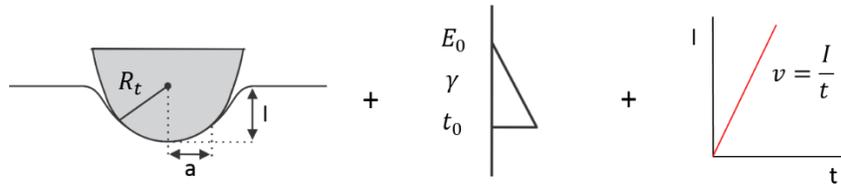


Fig. 2-10: Esquema de indentación de una esfera combinada con el modelo Power-law y con una indentación a velocidad constante.

En este caso tendremos que $\beta = 1.5$ y $\alpha = \frac{4\sqrt{R_t}}{3(1-\nu^2)}$, lo que junto con la expresión para la velocidad convierten la ecuación 2-48 en

$$F = \frac{4\sqrt{R_t}}{3(1-\nu^2)} E_0 \int_0^t \left[\left(\frac{t-\tau}{t_0} \right)^{-\gamma} \right] \frac{3}{2} \nu^{1.5} \sqrt{\tau} d\tau \quad 2-53$$

Si resolvemos la integral obtenemos

$$F = \frac{4\sqrt{R_t}}{3(1-\nu^2)} E_0 \frac{3}{2} \nu^{1.5} \frac{t^{-\gamma+\frac{3}{2}} \Gamma(1-\gamma)\sqrt{\pi}}{t_0^{-\gamma} 2\Gamma\left(\frac{5}{2}-\gamma\right)} \quad 2-54$$

Conociendo los valores tabulados de la función gamma volvemos a comprobar la concordancia entre los límites un sólido ($\gamma = 0$) y de un líquido ($\gamma = 1$), con lo predicho por el modelo de Kelvin-Voigt (ecuación 2-34).

2.8 Comprobación numérica

Para comprobar si las fórmulas que hemos derivado en las secciones anteriores son correctas, vamos a realizar unas simulaciones con FEM. La idea es obtener curvas fuerza-indentación y fuerza-tiempo, comparándolas con las que predicen nuestras ecuaciones. Por simplicidad calcularemos solo el caso del modelo de Kelvin-Voigt para las tres geometrías. Como la fuerza va a depender tanto de la indentación como de la velocidad, vamos a variar ambas sinusoidalmente, lo que os dará unas gráficas más interesantes que si hiciéramos una indentación a velocidad constante.

Curvas FEM de fuerza

La figura 2-11 muestra la evolución de la fuerza en función de la indentación y del tiempo para el caso de una indentación sinusoidal, así como un esquema de cómo fue hecha la simulación (ver los apéndices para más detalles sobre las simulaciones de FEM). Dado que la indentación es sinusoidal (línea discontinua en los paneles c, f, i), la fuerza también tiene una forma ligeramente sinusoidal. Sin embargo, podemos ver como el máximo de la indentación y de la fuerza difieren. Esto es normal, ya que podemos ver en la ecuación 2-27 que, dado que la fuerza se compone de una parte debida a la indentación y otra debida a la velocidad, el máximo de la fuerza se obtendrá cuando se alcance el máximo de la suma de ambas. En otras palabras, como la máxima indentación y la máxima velocidad ocurren a dos tiempos diferentes, la máxima fuerza también ocurrirá a un tiempo distinto. En las gráficas en función de la distancia (paneles b, e y h), podemos observar la histéresis entre las curvas de ida y las de vuelta, debido a la presencia de la viscosidad, que está relacionada con la absorción de energía por parte de la muestra. Las fuerzas máximas se encuentran en el orden de las decenas de nanonewtons, y, a pesar de que la indentación máxima es la misma para las tres geometrías, los picos de fuerza son diferentes. Esto es debido que las áreas de contacto en función de la indentación son diferentes para cada una de las geometrías. De nuevo, podemos comprobar esto de forma teórica, ya que en las ecuaciones el exponente para la indentación es distinto para cada geometría, dando, por lo tanto, diferentes valores de fuerza para la misma indentación.

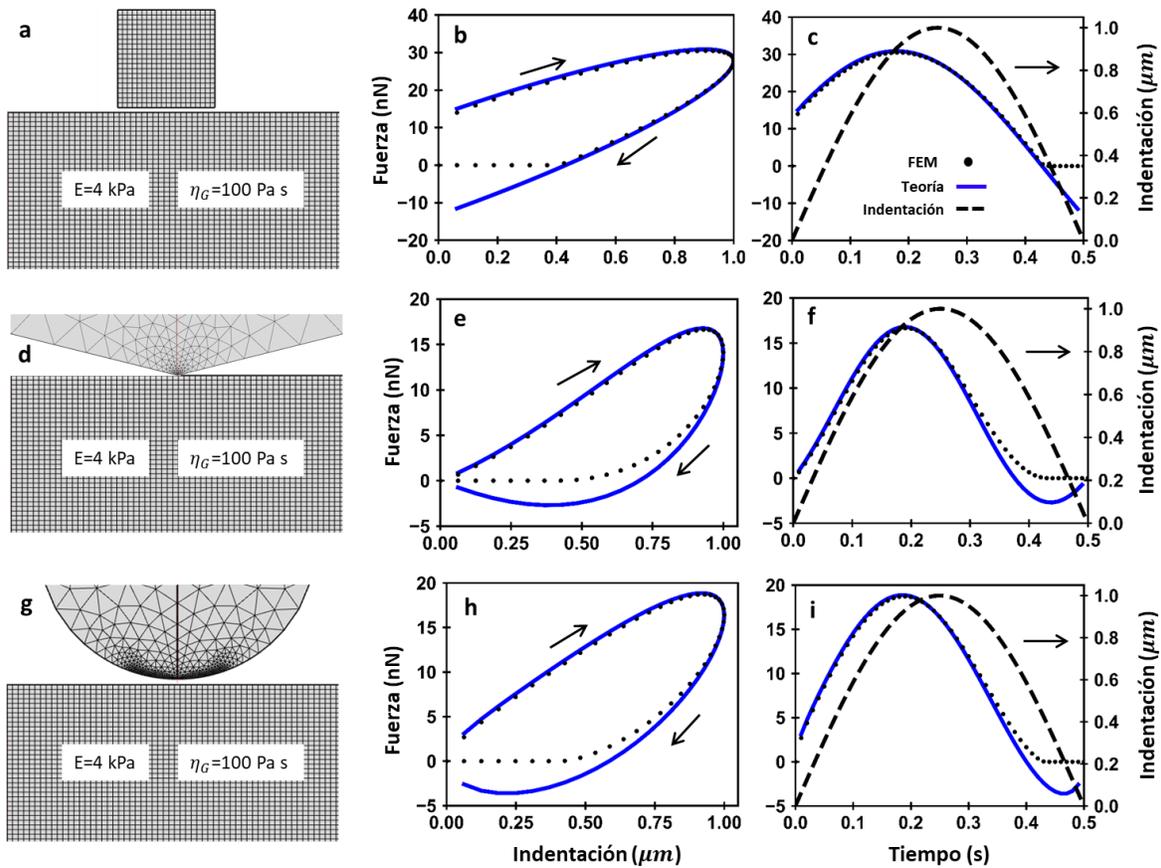


Fig. 2-11: Esquemas del modelo de FEM y fuerzas para una muestra viscoelástica y seminfinita. Esquema (a) y fuerzas en función de la penetración (b) y en función del tiempo (c) para un cilindro, $R = 2.5 \mu\text{m}$. Esquema (d) y fuerzas en función de la penetración (e) y en función del tiempo (f) para un cono, $\theta = 75^\circ$. Esquema (g) y fuerzas en función de la penetración (h) y en función del tiempo (i) para una esfera, $R = 5 \mu\text{m}$. Indentación sinusoidal, $A = 1 \mu\text{m}$, $T = 1\text{s}$. Muestra seminfinita, $E = 4 \text{kPa}$, $\eta_G = 100 \text{Pa} \cdot \text{s}$, $h = \infty \mu\text{m}$.

Podemos ver como las simulaciones de FEM coinciden bastante bien con las curvas teóricas. Sin embargo, en la curva de vuelta, las diferencias entre simulación y teoría se hacen más notables. Veamos por qué.

El problema de la vuelta

Se sabe que la solución propuesta por Lee y Radok no es válida cuando la punta se retira de la muestra, es decir, cuando la indentación está disminuyendo [122, 124-126]). Esto puede verse claramente en las simulaciones de FEM de la figura 2-11. Si nos fijamos, en todas las curvas teóricas (líneas azules) existe un momento en el cual la fuerza se hace negativa. Esto es debido a una limitación de nuestras ecuaciones teóricas: Suponer que el área de contacto en la ida y en la vuelta es la misma. Bajo esta hipótesis, dado que la viscosidad va en la dirección contraria al movimiento, cuando la velocidad es negativa (cuando la indentación está disminuyendo, en la vuelta), la muestra “chupa” la punta hacia abajo en vez de presionarla hacia arriba. Es decir, aparece una fuerza neta atractiva. En nuestros experimentos no existe una fuerza atractiva entre la punta y la muestra, por lo

que dicha solución negativa no puede existir en la realidad (ni existe, como podemos ver, en las simulaciones FEM).

¿Cómo solucionar la paradoja? La clave está en darse cuenta que, cuando la teoría predice una fuerza neta negativa, lo que sucede en realidad es que la punta se despega de la muestra, es decir, que el área se hace más pequeña de lo que esperaríamos según nuestra teoría. Si nos fijamos en los resultados de la simulación, podemos ver que las fuerzas nunca se hacen negativas (llegan a ser cero, pero no menores, véanse las líneas de puntos en la figura 2-11), ya que la simulación FEM predice correctamente este desacople punta-muestra. Todo esto nos obligaría a revisar las ecuaciones desarrolladas hasta el momento, para tener en cuenta este problema del desacoplamiento entre punta y muestra.

En el capítulo 5 exploraremos este problema con más detalle, viendo que la solución en la vuelta está basada en la solución de la ida [124]. Pero de momento vamos a intentar utilizar en los experimentos la teoría de la que disponemos, dejando una demostración formal para más adelante. Nos basaremos en la observación de que, al menos tanto en la ida, como en las primeras fases de la vuelta, las ecuaciones predicen razonablemente bien los resultados numéricos.

2.9 Interpretación física y biológica de los modelos

Hasta ahora hemos resuelto el problema de la indentación de un material viscoelástico para diferentes modelos, comprobando la validez de nuestras soluciones con simulaciones FEM. En las siguientes secciones veremos cómo utilizar la teoría en la práctica, e incluso daremos datos de una célula real. Pero antes que nada, como puente entre la teoría y los experimentos vamos a intentar dar significado físico y biológico a los diferentes modelos de viscoelasticidad que hemos utilizado (la derivación matemática de los mismos se encuentra en el apéndice D.2).

Kelvin-Voigt: Modelo poroelástico

En este modelo vemos que tenemos, independientemente de la geometría de la punta, una parte conservativa y una viscosa (ver ecuación 2-27). Esta es una de sus grandes ventajas, su sencillez, es el modelo más simple que incluye viscosidad. Sin embargo, también tiene una interpretación biológica muy interesante. La idea consiste en relacionarlo con el modelo poroelástico para una célula [70]. En dicho modelo, la respuesta viscoelástica está relacionada no solo con las propiedades del citoesqueleto en sí, si no con el movimiento del citosol a través del mismo. Siguiendo dicha interpretación, la parte elástica del modelo de Kelvin-Voigt caracteriza la respuesta de la estructura de la célula, es decir, mide directamente la rigidez del citoesqueleto. La parte viscosa, sin embargo, está relacionada con la interacción fluido-estructura entre el citosol y el citoesqueleto. A mayor viscosidad en este modelo, mayor dificultad del citosol para moverse a través de los huecos internos de la célula. Es importante recordar que, desde este punto de vista, la viscosidad que medimos no es la que tendría el citosol intrínsecamente como líquido, la cual tendría un valor bastante más bajo. En los experimentos veremos que dicha interpretación es consistente con los resultados obtenidos.

Una propiedad interesante es que, si tuviéramos cualquier otro modelo viscoelástico lineal y efectuáramos las medidas a cierta frecuencia, siempre podemos encontrar un Kelvin-Voigt que nos dé exactamente la misma respuesta. O dicho de otra forma, cualquier modelo viscoelástico lineal es equivalente a un conjunto de Kelvin-Voigts adecuados, uno diferente para cada frecuencia. Demostraremos esta propiedad en los apéndices, aunque debemos decir que solo para el caso unidimensional, por lo que tendremos que usar esta equivalencia con ciertas reservas para el caso tridimensional.

SLS: Un poco más realista

En este caso seguimos interpretando la célula como un sistema homogéneo, donde a pesar de las diferentes estructuras que la conforman podemos resumir su comportamiento en una respuesta de elementos elásticos y viscosos. Sin embargo, a diferencia del Kelvin-Voigt, ahora tenemos dos módulos de Young (lo que provoca que tengamos dos rigideces límites para este modelo, una a altas frecuencias y otra a bajas[115]). Este modelo se suele preferir al de Kelvin-Voigt debido a que predice de forma más realista el comportamiento de los experimentos de relajación de fuerzas. Como podemos ver tanto en cualquiera de las soluciones particulares de las geometrías (2-41, 2-44, 2-47), este modelo tiene una parte viscosa y otra elástica, pero ahora además tenemos una parte que se relaja exponencialmente con el tiempo. Podemos tener varias interpretaciones para esta componente de relajación, una de ellas, bastante sugerente, es que es debida al intercambio de fluido entre la célula y el entorno. Sin embargo podría ser que la célula modificara su citoesqueleto, o que simplemente fuera una componente del modelo poroelástico.

Sin embargo, aunque se ha visto que este modelo predice razonablemente bien las medidas hechas en hidrogeles, a tiempos muy cortos el modelo Power-law se adapta mejor a los datos experimentales[78].

Modelo Power-law: Diferentes tiempos de relajación

Dado que la célula está compuesta de muchos elementos diferentes, cada uno con diferentes características mecánicas... ¿tiene sentido hablar de un número pequeño de rigideces y viscosidades? Parece que no deberíamos usar un simple Kelvin-Voigt de dos elementos, o un SLS con solo uno más, para un sistema tan complejo como una célula. Podríamos intentar añadir más elementos obteniendo modelos más y más complejos, pero, a pesar de que conseguiríamos más exactitud, la interpretación sería también más oscura. Sin embargo, se puede demostrar que, bajo ciertas condiciones muy generales, un sistema compuesto por una gran variedad de elementos con diferentes características tendrá una función de relajación muy sencilla, dependiente del tiempo elevado a una potencia [127]. Este es el llamado modelo Power-law, que hemos utilizado en las secciones anteriores.

En dicho modelo no existe un solo tiempo de relajación, sino que, al ser una combinación de muchos elementos, tendremos una combinación de todas ellas. El principal parámetro de este modelo es la potencia a la que está elevado el tiempo: γ . Este parámetro, expresado como de sólida o líquida es la célula, es decir, cuánto importan los elementos de absorción de energía, en comparación con los elementos puramente elásticos. Cuando este valor es exactamente 0, todos los elementos de la célula son puramente elásticos, es decir, no hay ningún mecanismo de absorción de energía. En el

caso contrario, si fuera igual a uno, la célula estaría compuesta por elementos puramente líquidos, sin ninguna rigidez estructural.

2.10 Obtención de los parámetros en un experimento de AFM.

Una vez que hemos obtenido fórmulas e interpretaciones para diferentes modelos y geometrías, vamos a ver cómo podemos combinarlas con los datos experimentales del AFM, para así conseguir calcular los parámetros de los modelos.

Preproceso de los datos experimentales

En la introducción de esta tesis explicamos la utilidad de un AFM para la medición de las propiedades mecánicas en la nanoescala, así como sus fundamentos básicos. A nivel operativo, los datos que nos da el microscopio para cada pixel son dos curvas en función del tiempo., una de deflexión de la micropalanca $d(t)$ (mediada por el fotodiodo) y otra de posición de la base de la misma $Z_c(t)$ (respecto a un sistema arbitrario definido por el software de cada microscopio).

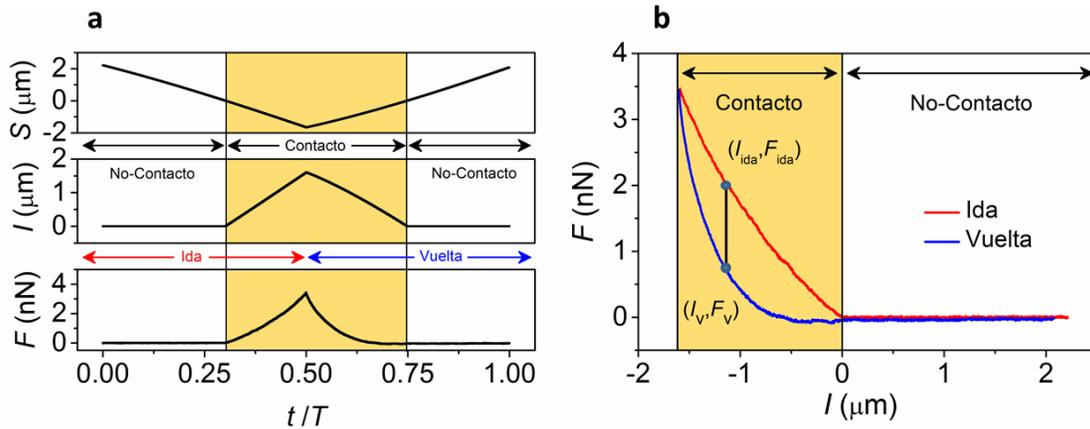


Fig. 2-12: Curvas experimentales. (a) Distancia punta muestra (S), indentación (I), y fuerza (F) en función del ratio entre tiempo y el periodo de modulación. (b) Curva de fuerza-indentación obtenida en las zonas centrales de un fibroblasto. Para cada indentación tenemos dos fuerzas, una a la ida y otra a la vuelta.

Partiendo de estas dos curvas, podemos obtener toda la información que necesitamos para correlacionarla con nuestros modelos. En nuestro caso particular, nos interesa tener las curvas de fuerza-indentación y velocidad-indentación. Para obtener la indentación nos basaremos en la siguiente relación geométrica para las distancias entre la punta y la muestra, llamada $S(t)$:

$$S(t) = Z_c(t) - Z_0 + d(t) \quad 2-55$$

Donde Z_0 es la posición de la base a la cual tenemos el contacto punta-muestra. La detección de este punto, a nivel teórico, consiste en ver en qué momento la palanca se empieza a doblar (cuando $d >$

0), ya que eso indica que estamos detectando una fuerza debido al contacto con la superficie. Sin embargo, en la práctica encontrar este punto con precisión es bastante complicado debido a imprecisiones experimentales [96]. Una vez calculado este punto de contacto definimos la indentación $I(t)$ como

$$\begin{aligned} I(t) &= -S(t) & S(t) &\leq 0 \\ I(t) &= 0 & S(t) &> 0 \end{aligned} \quad 2-56$$

Todo este procesamiento se hará gracias a un programa escrito en Python para esta tesis, una vez procesados los datos del microscopio para obtener las curvas adecuadas, veamos cómo podemos extraer los parámetros que nos interesan de las mismas.

Ajuste numérico o resolución analítica

Una vez que tenemos las curvas experimentales fuerza-distancia, podemos compararlas con las ecuaciones analíticas para obtener los parámetros elásticos del material. Para hacer esto tenemos dos opciones claramente diferenciadas. La primera es realizar un ajuste numérico [78]. La segunda es intentar despejar los parámetros de las ecuaciones.

La ventaja del ajuste numérico es que podemos utilizarlo para todos los modelos desarrollados, independientemente de la complejidad de la fórmula. Es decir, sería válido para cualquiera de las expresiones desarrolladas en esta tesis. Sin embargo, el problema es que un ajuste numérico debe hacerse en la totalidad de la curva (o al menos en una sección grande de la misma), por lo que perdemos resolución vertical de las propiedades mecánicas. En el caso de escoger esta opción, existen rutinas numéricas para el ajuste de curvas fácilmente disponibles en lenguajes como Python.

Las ventajas de intentar despejar los parámetros de las ecuaciones son varias. Por un lado siempre es conveniente trabajar con expresiones analíticas, ya que permiten obtener información útil mediante simple inspección visual de la ecuación. Por otro lado, si podemos despejar los parámetros tendremos un valor de los parámetros para cada punto de la curva experimental, así que no perderemos resolución espacial en profundidad. El problema de esta vía es que no es siempre posible despejar los parámetros en las ecuaciones, debido a la complejidad de las mismas.

Por simplicidad, vamos a detallar cómo calcular la opción analítica para el caso de Kelvin-Voigt, aunque se podría seguir un procedimiento similar para alguno de los otros modelos.

Resolución analítica de los parámetros

Supongamos que partimos de las ecuaciones resueltas para el modelo de Kelvin-Voigt. Hemos visto que estas ecuaciones son del tipo (2-27), por lo que tendríamos dos expresiones en función de la indentación, una para la ida y otra para la vuelta

$$\begin{aligned} F_{ida} &= \alpha EI^\beta + \alpha\beta\eta_E I^{\beta-1} \dot{I}_{ida} \\ F_{vuelta} &= \alpha EI^\beta + \alpha\beta\eta_E I^{\beta-1} \dot{I}_{vuelta} \end{aligned} \quad 2-57$$

Donde tanto F como I son las curvas experimentales, mientras que α y β dependerán de la geometría del indentador. La clave está en suponer que la curva de indentación I es simétrica tanto en la ida como en la vuelta, es decir que a cualquier indentación I , la velocidad es exactamente igual en la ida y en la vuelta, solo que de signo contrario

$$\dot{i}_{ida}(I) = -\dot{i}_{vuelta}(I) \quad 2-58$$

De esta forma podemos calcular la suma y la resta de las dos expresiones anteriores

$$\begin{aligned} F_{ida} + F_{vuelta} &= 2\alpha EI^\beta \\ F_{ida} - F_{vuelta} &= 2\alpha\beta\eta_E I^{\beta-1}\dot{i} \end{aligned} \quad 2-59$$

De donde podemos despejar fácilmente los parámetros del modelo (módulo de Young y viscosidad) en función de las curvas experimentales

$$\begin{aligned} E &= \frac{F_{ida} + F_{vuelta}}{2\alpha I^\beta} \\ \eta_E &= \frac{F_{ida} - F_{vuelta}}{2\alpha\beta I^{\beta-1}\dot{i}} \end{aligned} \quad 2-60$$

Expresiones que deberemos particularizar para distintas geometrías. Las ecuaciones 2-60 permiten transformar una curva de fuerzas en dos curvas, una de módulos de Young y otra de viscosidades.

Limitaciones

Hemos visto anteriormente que las soluciones obtenidas por el método de Lee y Radok no son válidas en la vuelta, así que... ¿cómo podemos aceptar la validez de las fórmulas para calcular los parámetros, si incluyen datos de la vuelta (F_{vuelta})?. La clave está en que, como vimos en las simulaciones, en el momento inicial de la curva de vuelta, las expresiones teóricas siguen siendo válidas. Es decir, alrededor del punto de máxima indentación, podemos usar con seguridad nuestra teoría.

En el capítulo 5 analizaremos en profundidad y resolveremos completamente este problema de forma analítica, explicando con más detalle hasta qué punto son válidas las expresiones 2-60 para los parámetros del material.

Vamos entonces a aplicar el método que acabamos de desarrollar a un caso experimental.

2.11 Ejemplo práctico: medición de las propiedades de un fibroblasto.

Finalmente, intentaremos en esta sección obtener y estudiar las propiedades mecánicas de una célula viva. La célula escogida es un fibroblasto de ratón (MEF, *Mouse Embryonic Fibroblast*), debido a su

facilidad de manejo en el laboratorio. Analizaremos el comportamiento de los parámetros en dos estudios: Uno en función de la frecuencia (estudio reológico) y otro aplicando un medicamento que afecta al citoesqueleto.

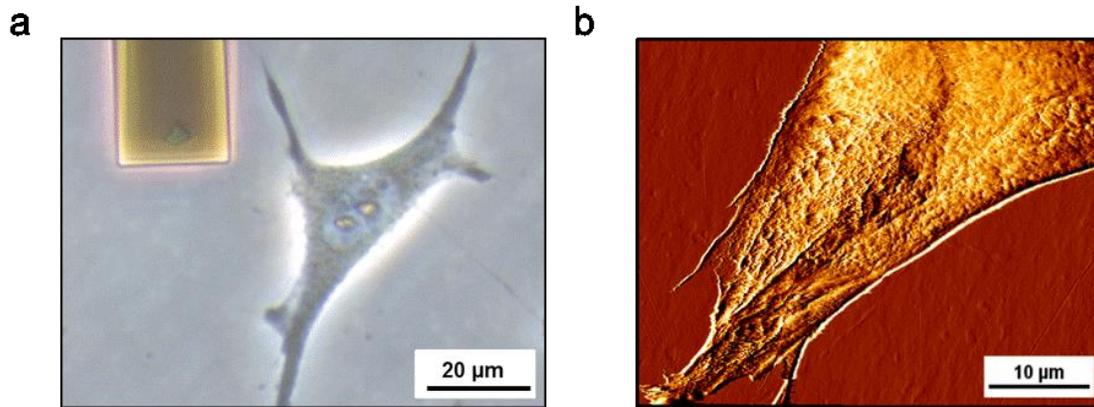


Fig. 2-13: Fibroblasto utilizado en las medidas. (a) Imagen óptica. (b) Imagen topográfica obtenida con el AFM en modo de contacto.

Procedimiento experimental

En primer lugar, escogemos mediante microscopia óptica una zona central de la célula, alejada de los bordes de la misma. Hemos evitado el realizar medidas en los bordes, ya que, al ser el grosor de la célula muy fino en estas zonas, deberíamos tener en cuenta el efecto del sustrato sobre el cual se encuentran. Si bien existen teorías para la corrección de dicho efecto [90, 103], en el siguiente capítulo veremos que el problema no está correctamente resuelto en la bibliografía, por lo que intentaremos evitar su efecto tanto como sea posible. Una vez escogida la zona de medida, realizamos un gran número de curvas de fuerza para poder obtener un estudio estadístico de los parámetros. Estas curvas de fuerza se obtendrán usando una indentación a velocidad constante. Analizando cada una de las curvas como hemos descrito en la sección 2.9, obtendremos un módulo de Young y una viscosidad media. Como se puede ver en los apéndices, con estos parámetros también podemos calcular dos variables derivadas: el tiempo de relajación, y el “*loss modulus*” (módulo de Young de disipación de energía).

Hemos repetido el experimento en unas 20 células diferentes, obteniendo resultados similares en todas ellas, de forma que podemos confiar en que nuestros resultados no se deben a una célula en particular. Sin embargo, las barras de error mostradas en las gráficas son obtenidas en las medidas de una sola célula, es decir, muestran la variabilidad interna de un fibroblasto, no la de una población de los mismos.

Variación con la frecuencia

En primer lugar vamos a estudiar como varían los parámetros en función de la velocidad a la que hacemos el experimento. En la figura 2-14 hemos representado el comportamiento de las cuatro variables de las que se compone el modelo de Kelvin-Voigt cuando variamos la velocidad.

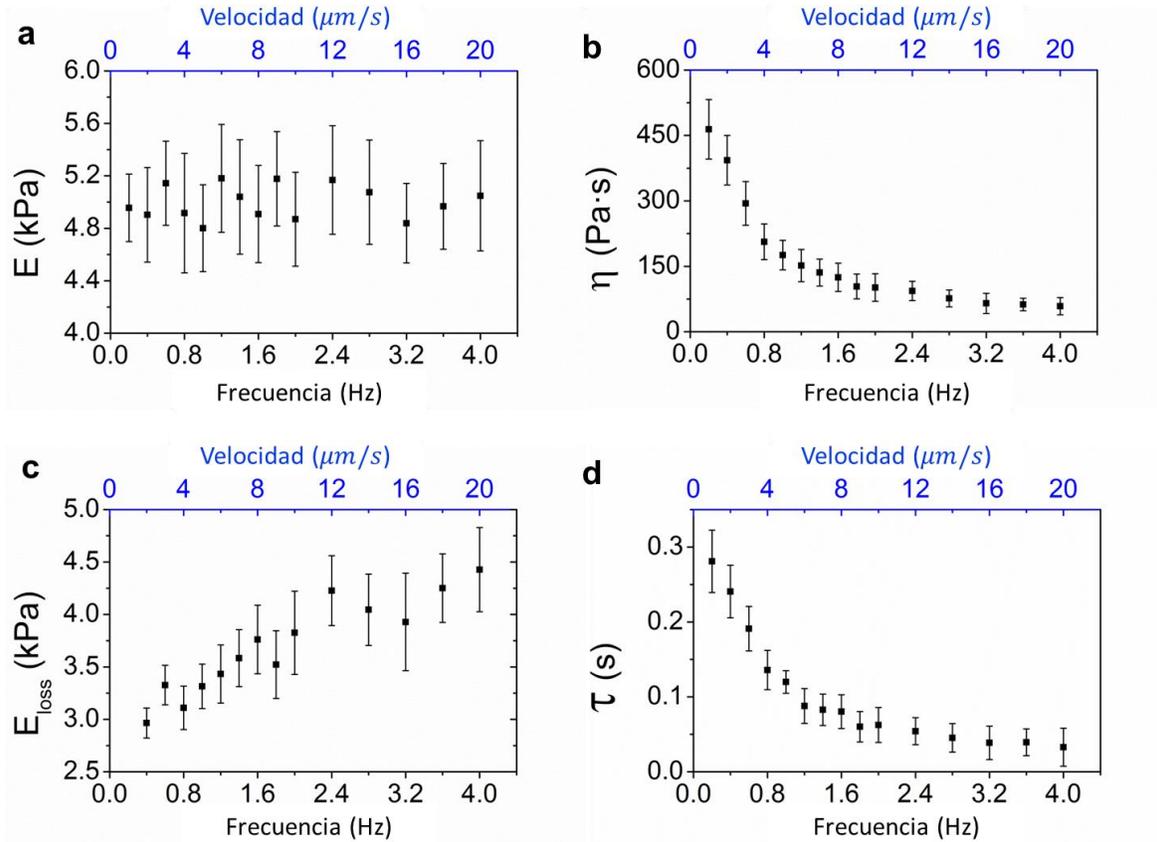


Fig. 2-14: Comportamiento de diferentes parámetros en función de la velocidad a la cual se hace el experimento. (a) Módulo de Young. (b) Viscosidad. (c) "Loss modulus". (d) Tiempo de relajación

En primer lugar podemos ver que el módulo de Young es constante en el rango de velocidades medido. Esto tiene sentido si recordamos que este parámetro indica la respuesta elástica del citoesqueleto. Si pensamos en un muelle, por ejemplo, su constante de rigidez no varía con la velocidad con la que lo comprimamos, por lo que también es natural que la rigidez del sistema de fibras que compone el citoesqueleto sea inmune a la velocidad de compresión. Sin embargo, en la bibliografía se ha comprobado que, en experimentos efectuados a frecuencias más altas, el módulo de Young aumenta con la frecuencia [6]... ¿Cómo podemos encajar estos resultados con los nuestros y con la interpretación antes dada? La clave está en que la rigidez del citoesqueleto a altas frecuencias podría incluir efectos termodinámicos, que no estudiaremos en este trabajo [128].

La viscosidad, sin embargo, disminuye claramente con la velocidad en nuestros experimentos. Recordando la interpretación que dimos con ayuda del modelo poroelástico, esto tiene sentido. En dicha interpretación la viscosidad está relacionada con las pérdidas de energía debidas a la dificultad del citosol para moverse a través de los huecos del citoesqueleto. Si hacemos el experimento de forma muy lenta (baja velocidad), daremos tiempo a que se mueva una gran cantidad de fluido (el tiempo de equilibrio del fluido es del orden de segundos (**nature sobre el citoesqueleto**)), por lo que la energía disipada será mayor y por lo tanto también lo será el coeficiente de viscosidad. Sin embargo, si hacemos el experimento a gran velocidad no daremos tiempo a que el sistema se

desequilibrio, por lo que las pérdidas de energía serán menores, con lo que la viscosidad efectiva también será menor.

En el caso del tiempo de relajación, vemos que disminuye con la velocidad. Esto implica que, si aplicamos la perturbación mecánica durante mucho tiempo, la célula tardará más en recuperarse.

Por último, el “*loss modulus*”, que está relacionado con las pérdidas de energía durante un ciclo en el caso de una medida oscilatoria, aumenta con la frecuencia. Esto tiene sentido, ya que al aumentar la velocidad, incluso aunque la viscosidad sea constante, las pérdidas energéticas son mayores.

Efecto de cambios en el citoesqueleto

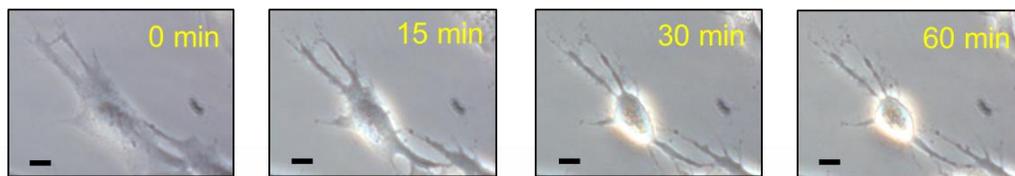


Fig. 2-15: Imágenes ópticas de la evolución de un fibroblasto ante la acción de la citocalasina-D, durante un periodo de una hora. La barra de referencia son 10 µm

Vamos a aplicar un medicamento que modifica las propiedades del citoesqueleto, observando los parámetros viscoelásticos en función del tiempo. El medicamento escogido es la citocalasina-D, la cual, al inhibir la síntesis de proteínas, bloquea la polimerización de las fibras de actina. De esta forma, dado que la creación y destrucción de las fibras es un proceso que se produce continuamente, a lo largo del tiempo se observará una disminución de las mismas. En la figura 2-15 podemos observar una secuencia de imágenes ópticas de la evolución de la forma de un fibroblasto sometido a los efectos de esta droga durante un periodo de una hora. Se puede observar como poco a poco la célula va perdiendo su forma definida y haciéndose cada vez más esférica. Esto tiene sentido, ya que parte de la función del citoesqueleto es mantener la forma [129], por lo que cualquier cambio en el mismo se refleja automáticamente en un cambio en la apariencia externa de la célula.

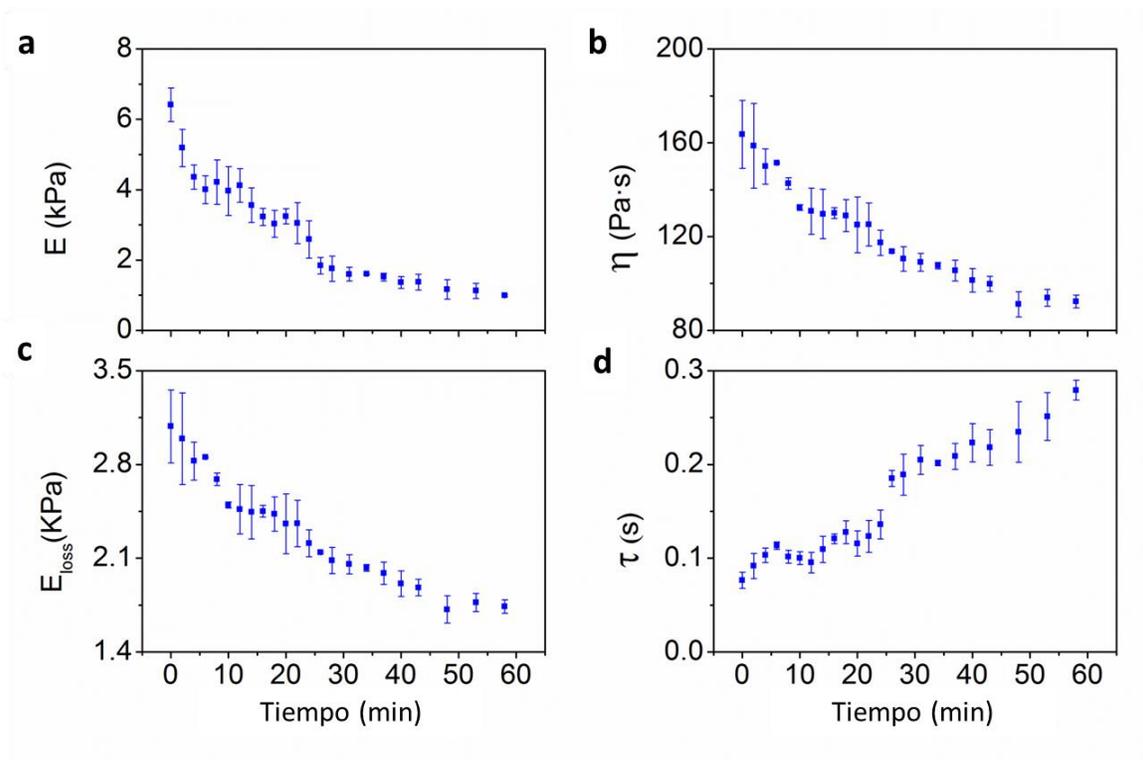


Fig. 2-16: Comportamiento de diferentes parámetros en función del tiempo, ante la acción del medicamento. (a) Módulo de Young. (b) Viscosidad. (c) “Loss modulus”. (d) Tiempo de relajación.

En cuanto a las variables viscoelásticas, vamos a medirlas a una frecuencia fija de 1Hz. Podemos ver que todas ellas varían de forma clara durante el periodo de tiempo analizado (ver figura 2-16). El módulo de Young disminuye (panel a), lo cual es lógico siguiendo la interpretación que le habíamos dado, ya que la misma decía que estaba relacionado con a la rigidez total del citoesqueleto. Como la citocalasina disminuye el número de fibras de actina, esto hace que la estructura total sea más débil y, por lo tanto menos rígida, disminuyendo el módulo de Young, como vemos en los datos experimentales. Otro efecto relacionado con la disminución del número de fibras es que aumentará el tamaño de los huecos entre las mismas, por lo que el citosol se podrá mover con una mayor facilidad por el interior de la célula. Como la viscosidad estaba relacionada con la dificultad de dicho movimiento, esperaríamos que este parámetro fuera descendiendo según actúa el medicamento, conclusión confirmada en nuestros datos (panel b). El “loss modulus” se comporta exactamente igual que la viscosidad, lo cual es normal, porque a menor viscosidad, menores pérdidas de energía durante un ciclo. La única variable que aumenta es el tiempo de relajación. Esto también tiene una fácil interpretación, ya que al eliminar parte de los elementos estructurales de la célula, su respuesta ante una perturbación mecánica se hará más lenta. O visto de otra forma, hemos reducido el número de “muelles” internos de la célula, por lo que le cuesta más tiempo recuperar su estado inicial ante una deformación.

Efecto combinado de frecuencia y medicamento

Como último estudio, es interesante ver qué sucede si combinamos los dos efectos antes descritos, es decir, si observamos el efecto de la citocalasina con el tiempo realizando las medidas a dos velocidades diferentes. Los resultados se pueden ver en la figura 2-17

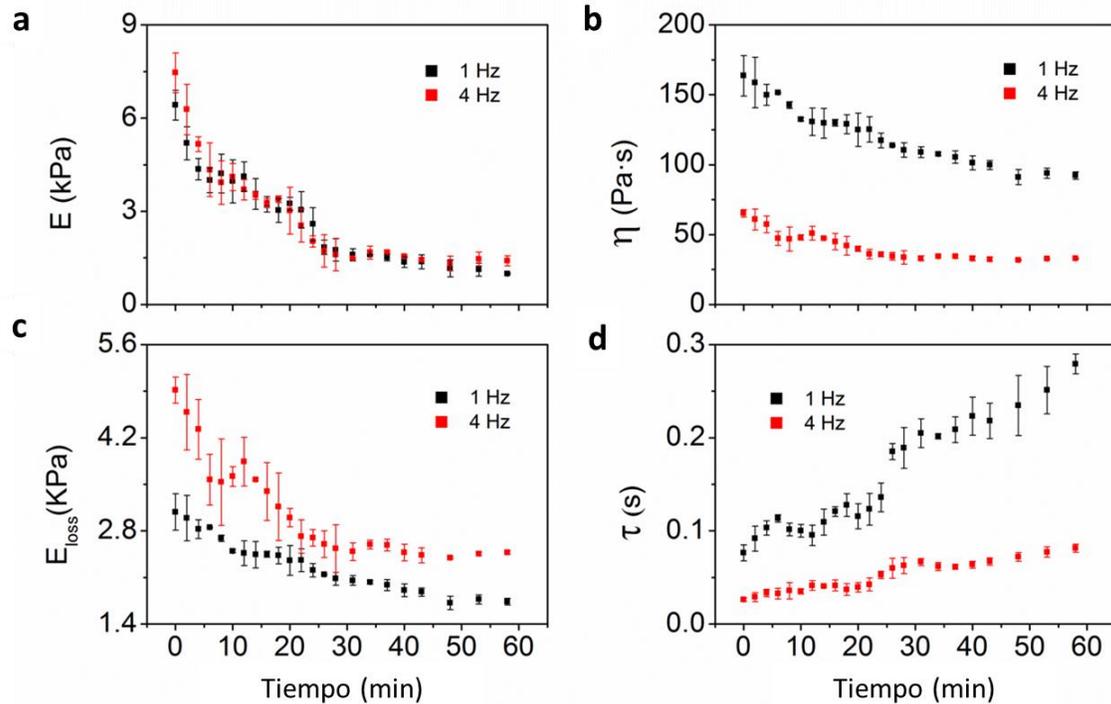


Fig. 2-17: Comportamiento de diferentes parámetros en función del tiempo, ante la acción del medicamento, cuando el experimento se realiza a dos velocidades distintas. (a) Módulo de Young. (b) Viscosidad. (c) "Loss modulus". (d) Tiempo de relajación.

Como era de esperar, las tendencias temporales de los diferentes parámetros ante la acción del medicamento son similares. Es más, en el caso del módulo de Young, dado que este parámetro no depende la velocidad del experimento, las curvas tomadas se superponen de manera casi perfecta. En los demás parámetros existe un desplazamiento vertical, debido a la dependencia de los mismos con la velocidad, pero las tendencias son similares entre diferentes curvas. Esto muestra que los análisis realizados en las secciones anteriores son consistentes.

2.10 Conclusiones

En este capítulo hemos analizado como obtener las propiedades viscoelásticas de una célula. En primer lugar, hemos obtenido la formulación teórica adecuada, y después la hemos aplicado al caso experimental de un fibroblasto, buscando una interpretación física y biológica de los resultados.

Para desarrollar la teoría, se han combinado las soluciones elásticas de mecánica de contacto con la hipótesis de Lee y Radok. Esto nos ha permitido obtener fórmulas explícitas para la fuerza en función de la indentación para las diferentes geometrías de la punta. Si bien nuestro estudio se ha centrado en los tres modelos de viscoelasticidad más usados (Kelvin-Voigt, SLS y Power-law), la extensión a cualquier otro tipo sería sencilla (solo necesitamos su función de relajación). Al comparar las expresiones obtenidas con los datos obtenidos en las simulaciones de elementos finitos, se ha visto una similitud magnífica entre ambas.

Como aplicación práctica de lo anterior, hemos visto cómo usar la teoría para analizar una célula en particular: un fibroblasto de ratón. Para ello nos centramos en el modelo de Kelvin-Voigt, optando por despejar analíticamente los parámetros del mismo (módulo de Young y viscosidad), en vez de aplicar directamente un ajuste numérico. Usando el modelo poroelástico de la célula, pudimos dar una interpretación de estos dos parámetros en términos de los elementos estructurales de la célula. En esta interpretación, el módulo de Young se corresponde con la rigidez del citoesqueleto, mientras que la viscosidad es la dificultad del citosol para moverse a través de los huecos del mismo. En los estudios efectuados, tanto reológicos como de comportamiento ante medicamentos, comprobamos que esta interpretación se corresponde con los resultados experimentales.

Sin embargo, quedan varias cuestiones por considerar. Una de ellas es que estamos considerando que la célula tiene un grosor infinito (relativo a la indentación usada en el experimento). Esto es cierto si medimos su parte central, pero no en las zonas laterales, donde su grosor es menor. Para solucionar esto, deberemos considerar como el “suelo” sobre el que se encuentra apoyada la célula afecta a las medidas de esas zonas de mayor fineza. Ese es el objetivo de los dos siguientes capítulos.

3. Efecto del sustrato en un sistema elástico

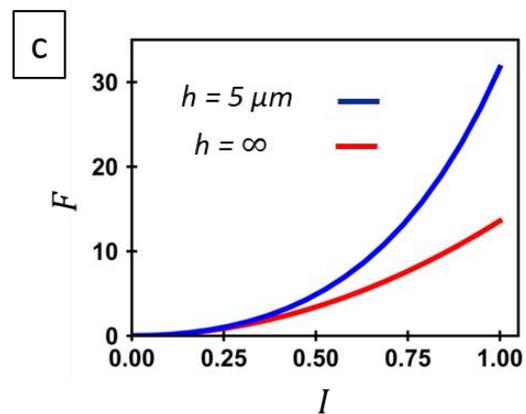
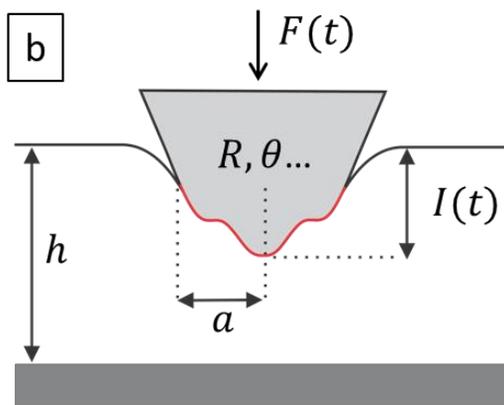
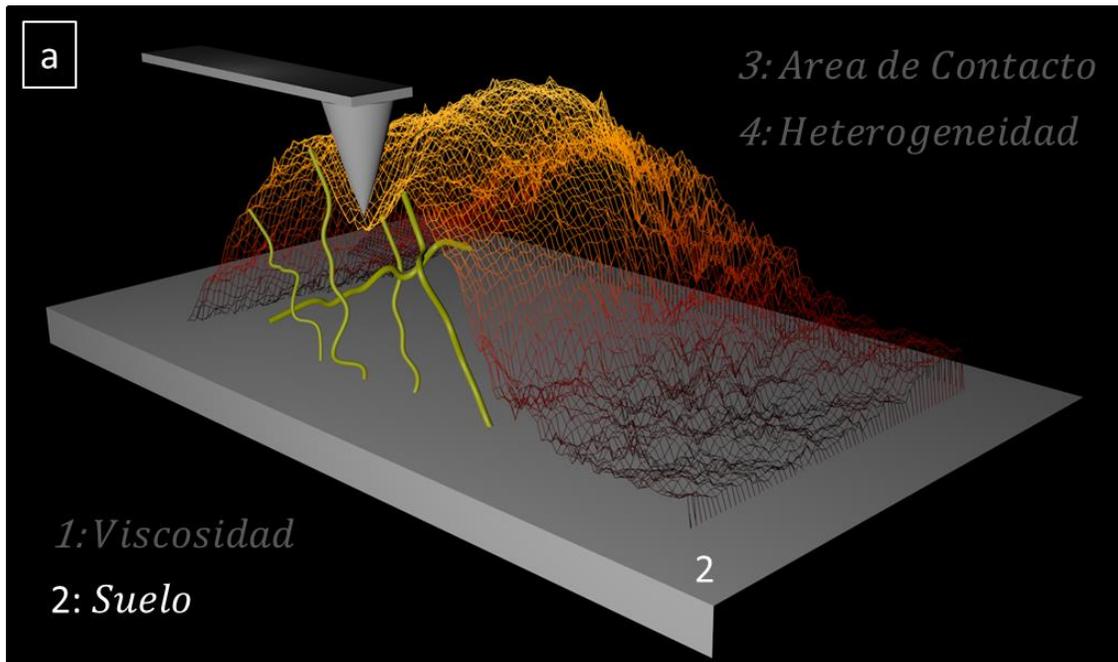


Fig. 3-0: (a) Este capítulo incluirá la geometría de la punta y el efecto del sustrato, siendo la célula puramente elástica. (b) La fuerza medida ahora dependerá explícitamente del grosor de la célula, h . (c) Con la disminución del grosor la fuerza es mayor, debido a un mayor efecto del sustrato. Intentaremos cuantificar este efecto.

En el capítulo anterior hemos medido las propiedades viscoelásticas de un fibroblasto en la zona central (cerca del núcleo). Si bien podemos extraer propiedades interesantes en estas regiones, puede que las mismas no sean representativas de la célula, ya que solo hemos medido en una región muy específica de la misma. Sin embargo, si intentamos medir en las zonas exteriores, la indentación será lo suficientemente grande para acercarse al sustrato, el cual se sabe que afectaría a nuestras medidas [90, 103]. Una opción sería indentar muy poco, de forma que el ratio indentación-grosor fuera muy bajo, pero entonces tendríamos problemas localizando el punto de contacto [96]. La única salida es intentar encontrar una corrección a las fórmulas analíticas del capítulo anterior, de forma que sepamos con precisión cual es el efecto del sustrato en nuestras medidas. Por simplicidad, en este capítulo vamos a centrarnos primero en solucionar el caso puramente elástico, antes de pasar al caso viscoelástico en el capítulo 4.

3.1 descripción matemática del problema

Una vez descrito el problema desde el punto de vista experimental, veamos a ver cómo expresarlo matemáticamente. La idea es que vamos a tener un problema muy similar al del capítulo anterior, pero tanto las condiciones de contorno como la ecuación diferencial serán diferentes.

Ecuación diferencial

Vamos a suponer por el momento que el sistema es elástico puro, por lo tanto la ecuación diferencial de tensión deformación será la 2-4. En el capítulo cuatro relajaremos esta hipótesis y veremos qué pasa al combinar viscoelasticidad junto con un sustrato, pero de momento nos conformaremos con atacar un problema más sencillo. No nos preocuparemos por la descripción elástica detallada del sustrato, ya que supondremos que es un objeto de infinita dureza, esto es, imposible de deformar. De esta forma la información mecánica del mismo aparecerá en forma de unas nuevas condiciones de contorno.

Nuevas condiciones de contorno

En la superficie superior (que se encuentra en contacto con el indentador) las condiciones son las mismas que las usadas en el capítulo 2 (ecuaciones 2-17), ya que suponemos que la física en la superficie de la muestra es la misma. Es decir:

$$\begin{aligned} u_z &= I - f(r) & r < a, z = 0 \\ \sigma_{zz} &= 0 & r > a, z = 0 \\ \sigma_{zy} &= \sigma_{zx} = 0 & \forall r, z = 0 \end{aligned} \tag{3-1}$$

donde recordamos que I es la indentación y $f(r)$ es la forma de la punta, siendo a el radio del área de contacto. De la misma forma, supondremos que la célula tiene una dimensión lateral infinita. Esto es más general de lo que pudiera parecer, ya que las dimensiones laterales de la célula son mayores

que su grosor. Esto implica que podemos mantener la condición (ecuación 2-18) que las tensiones tienden a cero cuando $r \rightarrow \infty$

$$\sigma_{ij} = 0 \quad r \rightarrow \infty \quad 3-2$$

Sin embargo, la condición usada en el caso de la muestra infinita de que las tensiones tiendan a cero a grandes profundidades (ecuación 2-18) no tiene sentido en este caso, porque estamos teniendo en cuenta el grosor finito de la célula, por lo que no podemos asumir que $z \rightarrow \infty$. La nueva condición de contorno estará dada por el contacto entre la célula y el substrato. Por un lado es claro que el substrato impide los movimientos verticales de la célula, ya que es infinitamente duro (en comparación con la misma), por lo que:

$$u_z = 0 \quad z = h \quad 3-3$$

El movimiento lateral dependerá de si la célula está o no totalmente agarrada al substrato. Si es así, no se podrá mover lateralmente, por lo que otra condición de contorno será

$$u_y = u_x = 0 \quad z = h \quad 3-4a$$

Sin embargo, podría ser que la célula solo estuviera apoyada, pudiendo deslizar lateralmente. En tal caso, la condición de contorno estaría dada por:

$$\sigma_{zx} = \sigma_{zy} = 0 \quad z = h \quad 3-4b$$

Veremos ahora como resolver el problema de la indentación con estas nuevas condiciones de contorno, mediante el método de Dimitriadis.

3.2 Solución de Dimitriadis

Dimitriadis et al. [90] solucionó nuestro problema matemático para el caso particular de un indentador esférico. Si bien su solución es original y relativamente buena en la práctica, tiene dos problemas. El primero es que no es fácil de generalizar para otro tipo de geometrías. El segundo es que asume que el área de contacto es independiente del grosor de la muestra. En este capítulo resolveremos estas dos cuestiones, pero para ello tenemos que explicar el planteamiento basado en funciones de Green propuesto por Dimitriadis.

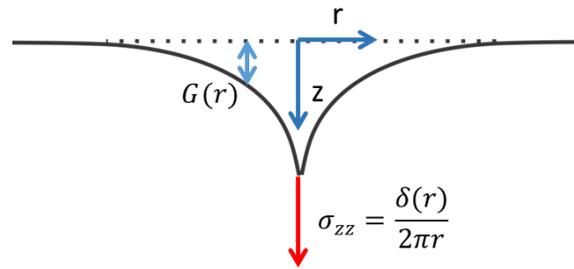


Fig. 3-1: Esquema de la función de Green. Si aplicamos una fuerza puntual la superficie se deformará en todas las direcciones. La componente vertical de esa deformación en la superficie es la llamada función de Green.

Si bien no entraremos aquí en los detalles de cómo calcularla, vamos a explicar la idea detrás de la función de Green para un sistema elástico. Supongamos que las condiciones de contorno para la superficie superior son las siguientes

$$\begin{aligned} \sigma_{zz} &= \frac{\delta(r)}{2\pi r} & \forall r, z = 0 \\ \sigma_{zy} = \sigma_{zx} &= 0 & \forall r, z = 0 \end{aligned} \tag{3-5}$$

Donde $\delta(r)$ es la función delta de Dirac. Es decir, en la superficie superior aplicamos una fuerza vertical justo en el centro ($r = 0$), por lo que toda la muestra se deformará debido a esta fuerza puntual. La función que nos da la deformación en función de la posición para cada una de las direcciones es la llamada función de Green [116].

$$G_i(r, z) = u_i(r, z) \quad \forall r, \forall z \tag{3-6}$$

Dado que experimentalmente solo tendemos acceso a las medidas en la superficie de la muestra ($z = 0$) en dirección vertical (G_z), nos restringiremos a la componente vertical de la función de Green en la superficie, es decir

$$G(r) = G_z(r, 0) = u_z(r, 0) \quad \forall r, z = 0 \tag{3-7}$$

En las siguientes subsecciones daremos soluciones explícitas para la función de Green. Es interesante notar que la función de Green no tiene dimensiones de longitud, como podría parecer viendo la fórmula 3-7. Para saber sus dimensiones correctas debemos recordar que esta función se calcula bajo unas condiciones de fuerza unitaria (condición 3-5), por lo que sus dimensionalidad correcta es unidad de longitud dividida entre unidad de fuerza.

La utilidad de las funciones de Green reside en la linealidad del problema. Imaginemos que aplicamos en la superficie de la muestra una distribución de presiones $P(x, y)$ cualquiera. Esta distribución de presiones podría escribirse como una suma (una integral en el límite) de distintas presiones puntuales en cada punto

$$P(x_0, y_0) = \iint P(x, y) \frac{\delta(\rho)}{2\pi\rho} dS \quad 3-8$$

Donde $\rho = \sqrt{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2}$ es la distancia entre el punto donde medimos la presión y los diferentes puntos de la superficie en los que calculamos la integral. La integral tiene que calcularse sobre toda la superficie superior de la muestra (dS es un diferencial de área). Como el problema es lineal, sabemos que la deformación total estará dada por la suma de las diferentes deformaciones debidas a cada presión puntual (las funciones de Green). Es decir, la combinación de 3-7 con 3-8 nos da [122]

$$u(x_0, y_0) = \iint P(x, y) G(\rho) dS \quad 3-9$$

Esta es la ecuación integral que relaciona presiones y deformaciones (recordemos, ambas en la dirección vertical y en la superficie) a través de la función de Green. Vamos a ver qué aspecto adquiere dicha función para diferentes problemas de indentación.

Funciones de Green para el problema infinito

En el caso de una muestra homogénea e infinita (Es decir, con las condiciones de contorno dadas por las ecuaciones 2-17), la función de Green será [116]:

$$G_\infty(\rho) = \frac{1 - \nu^2}{\pi E} \frac{1}{\rho} \quad 3-10$$

El subíndice ‘ ∞ ’ hace referencia a que el grosor de la muestra se supone infinito. Podemos ver que la deformación diverge en el centro (lo cual tiene sentido, ya que la presión σ_{zz} también se hace ilimitadamente grande cuando $\rho = 0$). También vemos que cuando nos alejamos infinitamente del punto de aplicación de la fuerza la deformación se hace nula (lo cual coincide con la condición de contorno 3-2). Utilizando esta función de Green podríamos recuperar las soluciones dadas por Sneddon (ecuaciones 2-21) para el sistema elástico infinito. Pero en nuestro caso tenemos que ver cómo sería la función de Green en el caso del problema del sustrato.

Funciones de Green para el problema del sustrato

Nuestro objetivo es encontrar un equivalente de 3-10 para el caso de que la muestra tenga un grosor finito h (condiciones de contorno 3-4a o 3-4b en la cara inferior). Dimitriadis [90] demostró que esta función está dada por

$$G(\rho) = G_\infty(\rho) \left[1 + \alpha_0 \frac{\rho}{h} + \beta_0 \left(\frac{\rho}{h} \right)^3 + \dots \right] \quad 3-11$$

Donde α_0 y β_0 son constantes que no dependerán de la geometría de la muestra (aunque sí de como este fijada al sustrato, así como de los coeficiente de Poisson) y donde G_∞ es la función de Green

para el caso infinito (ecuación 3-10). Como vemos la nueva función de Green para el caso finito es la del caso infinito multiplicada por una serie de factores de corrección, los cuales son potencias de $\frac{\rho}{h}$. Es decir, la función de Green corregida a cierto orden n ($G(\rho) = O\left(\frac{\rho}{h}\right)^n$) tendrá un mayor error según nos alejemos del punto de aplicación de la fuerza puntual.

La última cuestión que surge es el valor concreto de las constantes α_0 y β_0 . Dimitriadis calculó (combinando análisis teórico y numérico) expresiones para ellas en función del coeficiente de Poisson. Estas expresiones dependen de si suponemos que la muestra está agarrada totalmente al sustrato (condición 3-4a), o se encuentra simplemente apoyada, pudiendo deslizar lateralmente (condición 3-4b). En el primer caso, las expresiones serían

$$\begin{aligned}\alpha_0 &= -\frac{1.2876 - 1.4678\nu + 1.3442\nu^2}{1 - \nu} \\ \beta_0 &= \frac{0.6387 - 1.0277\nu + 1.5164\nu^2}{1 - \nu}\end{aligned}\tag{3-12a}$$

Mientras que en el segundo obtendríamos

$$\begin{aligned}\alpha_0 &= -0.347\frac{3 - 2\nu}{1 - \nu} \\ \beta_0 &= 0.056\frac{5 - 2\nu}{1 - \nu}\end{aligned}\tag{3-12b}$$

Nos será de gran utilidad reescribir la ecuación 3-11 introduciendo potencias de una variable muda I

$$G(\rho) = G_\infty(\rho) \left[1 + \alpha_0 \frac{\rho I}{h I} + \beta_0 \left(\frac{\rho}{h}\right)^3 \left(\frac{I}{I}\right)^3 + \dots \right]\tag{3-13}$$

Dichas potencias son exactamente iguales a uno, por lo que no varían la ecuación. Reescribiendo podemos ver que

$$G(\rho) = G_\infty(\rho) [1 + \alpha(\rho)\varepsilon + \beta(\rho)\varepsilon^3 + \dots]\tag{3-14}$$

Donde

$$\begin{aligned}\alpha(\rho) &= \alpha_0 \frac{\rho}{I} \\ \beta(\rho) &= \beta_0 \frac{\rho}{I}\end{aligned}\tag{3-15}$$

son funciones que dependerán de las constantes α_0 y β_0 , y

$$\varepsilon = \frac{I}{h}\tag{3-16}$$

es un número que depende del grosor de la muestra. La utilidad de esta reformulación, así como el significado de la variable muda I se verá en la siguiente subsección.

Veremos ahora como utilizar la función de Green para resolver el problema de la indentación. Hemos visto que la deformación (dentro de la zona de contacto) viene dada por la forma del indentador (condición 3-1), y que la función de Green para un sistema de grosor finito h viene dada por la ecuación 3-14. Sustituyendo ambas expresiones en la ecuación integral de Green para la deformación (3-9) obtenemos que

$$I - f(r_0) = \iint P(r) G_{\infty}(\rho) [1 + \alpha(\rho)\varepsilon + \beta(\rho)\varepsilon^3 + \dots] dS \quad 3-17$$

Si bien la única incógnita en la ecuación integral es la distribución de presiones $P(r)$, resolver una ecuación integral de este tipo no es tarea fácil. Sin embargo, podemos ver ahora la utilidad de haber introducido la variable muda I en la definición de la ecuación de Green. En la parte izquierda de la ecuación vemos que podemos interpretar I como la indentación máxima, por lo que ε es el ratio entre la indentación y el grosor de la muestra. Para indentaciones muy pequeñas en comparación con dicho grosor, podemos extender la presión P en serie de potencias de dicha variable

$$P(r) = P_0(r) + P_1(r)\varepsilon + P_2(r)\varepsilon^2 + P_3(r)\varepsilon^3 + P_4(r)\varepsilon^4 + \dots \quad 3-18$$

Lo que sustituido en la ecuación integral nos dará

$$I - f(r_0) = \iint [P_0(r) + P_1(r)\varepsilon + P_2(r)\varepsilon^2 + P_3(r)\varepsilon^3 + P_4(r)\varepsilon^4] G_{\infty}(\rho) [1 + \alpha(\rho)\varepsilon + \beta(\rho)\varepsilon^3] dS \quad 3-19$$

Podemos separar esta ecuación para los distintos exponentes de ε , obteniendo una serie de ecuaciones integrales

$$\begin{aligned} \varepsilon^0 & \iint [P_0 G_{\infty}] dS = I - f(r_0) \\ \varepsilon^1 & \iint [P_0 G_{\infty} \alpha + P_1 G_{\infty}] dS = 0 \\ \varepsilon^2 & \iint [P_1 G_{\infty} \alpha + P_2 G_{\infty}] dS = 0 \\ \varepsilon^3 & \iint [P_0 G_{\infty} \beta + P_2 G_{\infty} \alpha + P_3 G_{\infty}] dS = 0 \\ \varepsilon^4 & \iint [P_1 G_{\infty} \beta + P_3 G_{\infty} \alpha + P_4 G_{\infty}] dS = 0 \end{aligned} \quad 3-20$$

Para cada geometría concreta del indentador (que quedará establecida por la función $f(r_0)$) podremos resolver la primera ecuación integral, obteniendo P_0 , lo que a su vez nos permitirá obtener P_1 en la siguiente y así sucesivamente.

Ecuación clásica de Dimitriadis para la esfera

Dimitriadis resolvió el sistema de ecuaciones integrales para el caso de una esfera, obteniendo la siguiente distribución de presiones

$$\begin{aligned}
 P_0 &= \frac{2E}{\pi(1-\nu^2)} \frac{1}{R} (a-r^2)^{\frac{1}{2}} \\
 P_1 &= -\frac{4E\alpha_0}{3\pi^2(1-\nu^2)} \frac{a^3}{RI} \frac{1}{(a-r^2)^{\frac{1}{2}}} \\
 P_2 &= -\frac{8E\alpha_0^2}{3\pi^3(1-\nu^2)} \frac{a^4}{RI^2} \frac{1}{(a-r^2)^{\frac{1}{2}}} \\
 P_3 &= -\frac{16E}{15\pi^4(1-\nu^2)} \frac{a^3}{RI^3} \frac{[(5\alpha_0^3 - 2\pi^2 \beta_0)a^2 + 5\pi^2 \beta_0 r^2]}{(a-r^2)^{\frac{1}{2}}} \\
 P_4 &= -\frac{32E\alpha_0}{45\pi^4(1-\nu^2)} \frac{a^4}{RI^4} \frac{[(15\alpha_0^3 - \pi^2 \beta_0)a^2 + 15\pi^2 \beta_0 r^2]}{(a-r^2)^{\frac{1}{2}}}
 \end{aligned} \tag{3-21}$$

Para lograr obtener la fuerza, debemos integrar las presiones en toda el área de contacto. Dimitriadis asumió que el área de contacto sería igual que en la muestra infinita (más adelante veremos que esto es erróneo), obteniendo la siguiente fórmula para las fuerzas:

$$F = \frac{16}{9} ER_t^{\frac{1}{2}} I^{\frac{3}{2}} \left[1 + \frac{1.133\sqrt{IR_t}}{h} + \frac{1.283IR_t}{h^2} + \frac{0.769\delta R_t\sqrt{IR_t}}{h^3} + \frac{0.0975(I^2 R_t^2)}{h^4} \right] \tag{3-22}$$

Esta expresión (además del error debido a la hipótesis del área) tiene un error en el signo del último término (que debería ser negativo), como veremos más adelante.

3.3 Extensión de la solución a otras geometrías.

¿Qué pasará en el caso de que la punta no sea una esfera, si no que tenga otra geometría? Podríamos intentar plantear y resolver el mismo sistema de ecuaciones integrales 3-20, pero dado que la resolución de estos sistemas es bastante complicada para la mayoría de las geometrías, no parece una opción viable. No solo eso, si no que tendremos que asumir que el área de contacto varía con la penetración de la misma forma que en el caso infinito, lo cual podría no ser cierto. Sin embargo, existe una vía paralela que nos permitirá encontrar soluciones basadas en la solución para el cilindro. Es decir, solo tendremos que resolver el sistema de ecuaciones integrales una vez para la geometría cilíndrica, y la solución para cualquier otra geometría estará basada en esta solución “semilla”. No solo eso, si no que podremos calcular el área de contacto con precisión, sin tener que asumir la obtenida en el caso infinito.

El procedimiento se basa en un teorema integral que relaciona fuerzas y desplazamientos en la superficie de un cuerpo elástico, llamado “teorema de reciprocidad”

Teorema de reciprocidad

Imaginemos que tenemos un cuerpo elástico. La única condición que ponemos a dicho cuerpo es que su ecuación constitutiva sea puramente elástica (ecuación 2-2), pudiendo tener cualquier condición de contorno, asimetría o heterogeneidad. Si aplicamos un campo de presiones P_i en la superficie, dicho cuerpo se deformará, por lo que en su superficie obtendremos un campo de deformaciones u_i (recordamos que el índice i recorre todas las dimensiones: $i = x, y, z$). Si al mismo cuerpo le hubiéramos aplicado unas presiones distintas P^*_i , se habría deformado de forma distinta, por lo que en la superficie habríamos obtenido otro campo de deformaciones u^*_i . El teorema de reciprocidad nos dice que la integral de la multiplicación cruzada de las presiones y deformaciones en los dos casos, dará el mismo número[130]:

$$\iint_{\partial V} P^*_i u_i dS = \iint_{\partial V} P_i u^*_i dS \quad 3-23$$

Donde la integral se tiene que hacer en toda el área exterior del cuerpo (∂V significa “borde del volumen”).

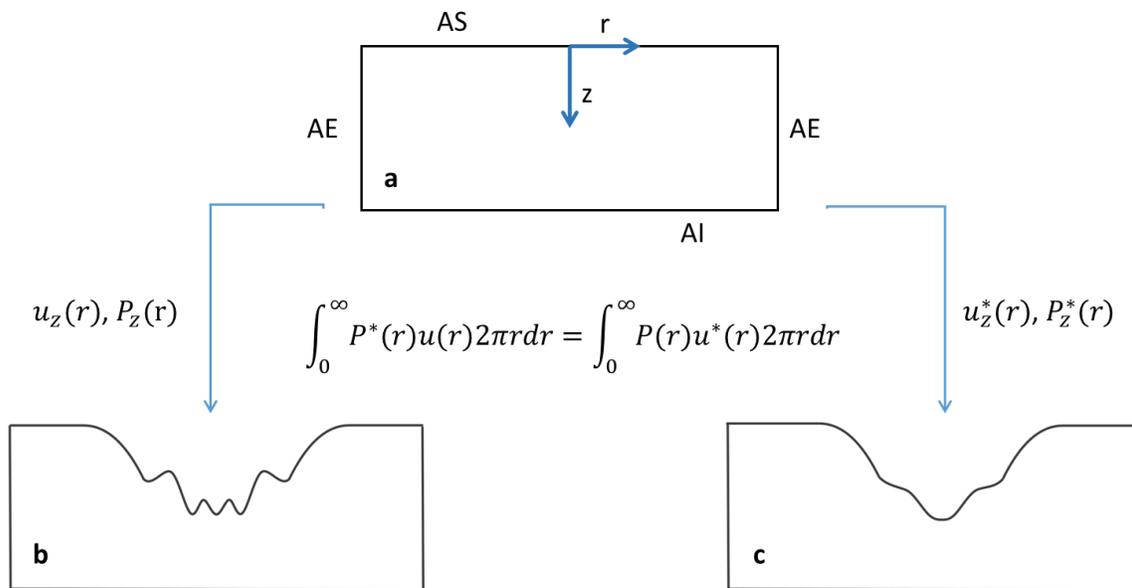


Fig. 3.2: Diagrama general del teorema de reciprocidad. (a) Esquema del sólido elástico a deformar con sus diferentes superficies. Realizamos dos deformaciones diferentes (b y c) cuyos valores de presiones y deformaciones estarán relacionados por la ecuación central.

En nuestro caso vamos a utilizar esa expresión para relacionar las deformaciones y presiones de la punta cilíndrica con las presiones y deformaciones de cualquier otra geometría. Pero primero vamos a simplificar y detallar la ecuación 3-23 para nuestro problema de indentación

Simplificación del teorema de reciprocidad

Supongamos que el cuerpo elástico es la célula, apoyada en el sustrato. Lo primero que haremos será descomponer 3-23 en una suma con las integrales para distintas áreas del sistema:

$$\begin{aligned} & \iint_{AS} P^*_i u_i dS + \iint_{AI} P^*_i u_i dS + \iint_{AE} P^*_i u_i dS \\ &= \iint_{AS} P_i u^*_i dS + \iint_{AI} P_i u^*_i dS + \iint_{AE} P_i u^*_i dS \end{aligned} \quad 3-24$$

Donde (ver figura 3.2) *AS* implica que la integral se hará en el área superior de la célula (en contacto con la punta), *AI* en el área inferior (en contacto con el sustrato) y *AE* en el área exterior (los bordes laterales de la célula). Esta última integral es nula debido a que los bordes laterales sufren una presión igual a cero (no están en contacto con nada, $P_x = P_y = P_z = 0$), por lo que

$$\begin{aligned} \iint_{AE} P^*_i u_i dS &= 0 \\ \iint_{AE} P_i u^*_i dS &= 0 \end{aligned} \quad 3-25$$

La segunda integral (superficie inferior de la célula, *AI*) también se reduce a cero. Podemos ver que esto es así recordando las condiciones de contorno del sustrato (ver 3-3 y 3-4a/b). El sustrato siempre impide el movimiento vertical (condición 3-3, $u_z = 0$) y, o bien impide el movimiento lateral (condición 3-4a, $u_x = u_y = 0$) o no ofrece resistencia en esa dirección (condición 3-4b, $P_x = P_y = 0$). Si hacemos explícitos los términos de la integral en la superficie inferior:

$$\begin{aligned} \iint_{AI} P^*_i u_i dS &= \iint_{AI} (P^*_x u_x + P^*_y u_y + P^*_z u_z) dS = 0 \\ \iint_{AI} P_i u^*_i dS &= \iint_{AI} (P_x u^*_x + P_y u^*_y + P_z u^*_z) dS = 0 \end{aligned} \quad 3-26$$

Vemos que todos ellos son iguales a cero, por lo que la integral del área inferior también es nula.

En el área superior (*AS*) vamos a suponer que la interacción entre la punta y la muestra no tiene fricción, por lo que las presiones en la dirección lateral son cero ($P_x = P_y = 0$), de tal forma que tendremos

$$\begin{aligned} \iint_{AS} P^*_i u_i dS &= \iint_{AS} (P^*_x u_x + P^*_y u_y + P^*_z u_z) dS = \iint_{AS} P^*_z u_z dS \\ \iint_{AS} P_i u^*_i dS &= \iint_{AS} (P_x u^*_x + P_y u^*_y + P_z u^*_z) dS = \iint_{AS} P_z u^*_z dS \end{aligned} \quad 3-27$$

De esta forma vemos que la condición 3-8 se convierte en una integral solo en el área superior:

$$\iint_{AS} P^*_z u_z dS = \iint_{AS} P_z u^*_z dS \quad 3-28$$

Donde tanto los desplazamientos como las presiones son medidos en la dirección vertical y en la superficie superior. Esta versión simplificada será la que utilizaremos en el resto del capítulo, por lo que a partir de ahora no pondremos los subíndices para facilitar la lectura de las expresiones. Ya que nuestro problema tiene simetría cilíndrica, podemos reescribir 3-23 en función solo de la coordenada radial

$$\int_0^\infty P^*(r)u(r)2\pi r dr = \int_0^\infty P(r)u^*(r)2\pi r dr \quad 3-29$$

Esta ecuación, que utilizaremos para solucionar nuestro problema, se encuentra estudiada ampliamente en la bibliografía de modelos de contacto para medios infinitos [130]. Veamos cómo utilizarla para nuestro problema particular, usando la solución de presiones y deformaciones para un indentador cilíndrico como referencia.

Cilindro como solución de referencia

Vamos a proponer dos experimentos diferentes, uno en el cual indentamos con un cilindro (donde las presiones y desplazamientos verticales estarán dados por P y u), y otro en el cual la sonda tendrá una geometría dada por $f(r)$ (en el cual describiremos el estado mecánico con las variables verticales P^* y u^*). La deformación en el caso del cilindro estará da por

$$\begin{aligned} u &= I & r < a \\ u &= \text{desconocido} & r > a \end{aligned} \quad 3-30a$$

Donde I es la indentación que hemos alcanzado en el experimento, y a es el radio del área de contacto (que tiene que ser exactamente el radio del cilindro). Veremos que no es necesario saber cuál es la deformación de la muestra fuera del área de contacto. Las presiones estarán dadas por

$$\begin{aligned} P &= \text{solución conocida} & r < a \\ P &= 0 & r > a \end{aligned} \quad 3-30b$$

Sabemos que la presión fuera del área de contacto deberá ser cero (la superficie está totalmente libre). Supondremos que la presión dentro de la zona de contacto es conocida, ya que la hemos hallado por otro método (en la sección 3.4 veremos su forma explícita, calculada solucionando el sistema de ecuaciones integrales propuesto por Dimitriadis). En el caso del indentador para el cual queremos resolver la presión, las condiciones de deformación estarán dadas por

$$\begin{aligned} u^* &= I^* - f(r) & r < a^* \\ u^* &= \text{desconocido} & r > a^* \end{aligned} \quad 3-30c$$

Donde I^* es la indentación máxima (justo en el centro del indentador) y $f(r)$ es la forma del mismo. a^* es el radio del área de contacto, que no tendrá por qué ser igual a la del experimento del cilindro. La condición dentro del área de contacto se debe a que suponemos que la muestra tiene que estar perfectamente en contacto con el indentador en esta zona. De nuevo, veremos que no necesitamos conocer la deformación fuera del área de contacto. Para las presiones tendremos

$$\begin{aligned} P^* &= \text{solución desconocida} & r < a^* \\ P^* &= 0 & r > a^* \end{aligned} \quad 3-30d$$

Como en el caso del cilindro, la presión deberá ser nula fuera del área de contacto. La presión dentro de dicha zona es desconocida, ya que es nuestro objetivo. Si la obtenemos solo tendremos que integrar en toda el área para obtener la fuerza que medirá el indentador, y nuestro problema estaría resuelto. Para obtener esta presión sustituiremos las expresiones 3-30 en la versión simplificada del teorema de reciprocidad 3-29, obteniendo:

$$2\pi \int_0^{a^*} P^*(r) I r dr = 2\pi \int_0^a P(r) r [I^* - f(r)] dr \quad 3-31$$

Las integrales solo se calculan dentro de los límites donde las presiones son distintas de cero, es decir, dentro de las áreas de contacto (de ahí los límites superiores en a^* y a , respectivamente).

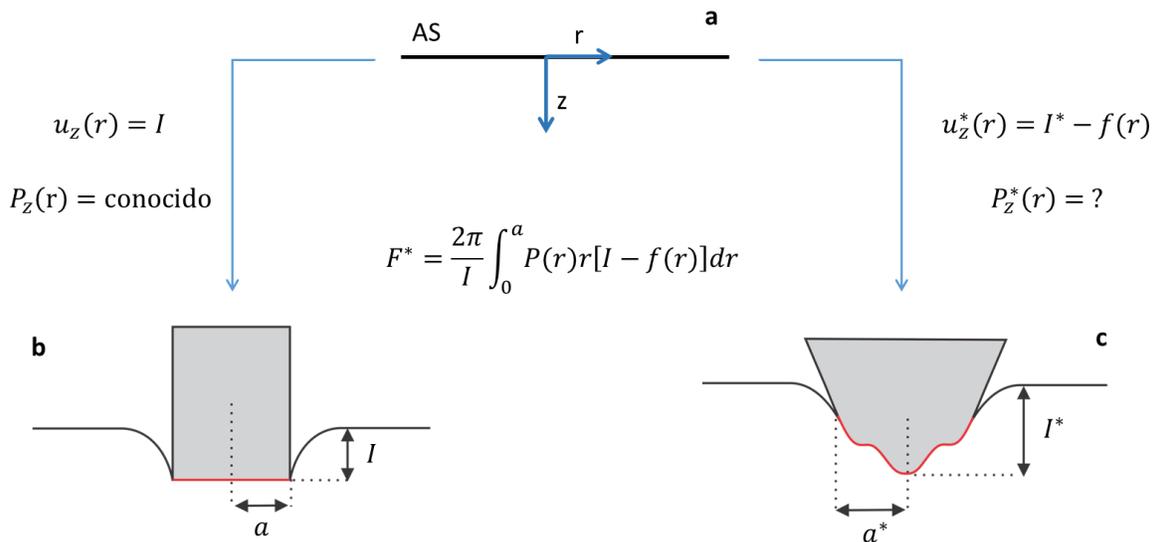


Fig. 3.3: Diagrama con las dos geometrías usadas en el teorema de reciprocidad. Partiendo de una superficie plana (a) realizamos dos deformaciones distintas, una cilíndrica (b) y otra de forma genérica $f(r)$ (c). La relación entre ambas deformaciones da la fuerza para la punta genérica, gracias a la ecuación central, suponiendo que conocemos la solución para el cilindro.

La siguiente hipótesis va a ser que tanto las áreas como las indentaciones máximas van a ser iguales en ambos experimentos:

$$\begin{aligned} a &= a^* \\ I &= I^* \end{aligned} \quad 3-32$$

Dado que tenemos libertad para escoger el radio del cilindro y la indentación del mismo, siempre podemos cumplir esta condición. De esta forma, manipulando ligeramente 3-31 obtendremos que

$$2\pi \int_0^a P^*(r)rdr = \frac{2\pi}{I} \int_0^a P(r)r[I - f(r)]dr \quad 3-33$$

Es interesante ver que la parte izquierda de la ecuación no es más que la integral de la presión en todo el área del contacto para el indentador axisimétrico, lo cual es la fuerza total que mide ese indentador (F^*), por lo que podemos reescribir esta expresión como

$$F^* = \frac{2\pi}{I} \int_0^a P(r)r[I - f(r)]dr \quad 3-34$$

Esta es la expresión que buscamos. Si sabemos la forma del indentador ($f(r)$) y la distribución de presiones para el caso del cilindro ($P(r)$), podemos conocer la fuerza (F^*) que ejerce dicho indentador a una indentación (I) y área de contacto dadas (a). Solo nos queda la duda de obtener una relación entre estas dos variables y el problema estará totalmente resuelto.

Calculo del área de contacto

La expresión 3-34 tiene la forma

$$F^* = F^*(I, a) \quad 3-35$$

Por lo que la fuerza está en función de tanto la indentación máxima I como del radio del área de contacto a . Es obvio que para una cierta indentación, el radio del área de contacto debería estar definido, es decir, que existe una función

$$a = a(I) \quad 3-36$$

que al remplazarla en la expresión 3-34 nos permite obtener la fuerza como función explícita de la indentación. Una opción es utilizar el radio del área de contacto obtenida por Sneddon para el caso infinito (ecuación 2-22).

$$a = a_{homogeneo}(I) \quad 3-37a$$

Esta hipótesis está implícita en la solución clásica obtenida por Dimitriadis. El problema es que el área de contacto a cierta indentación depende del grosor de la muestra, por lo que 3-37a no puede ser válida para este tipo de muestras finitas. La solución más general fue obtenida por Shield et al [131], que propuso la condición

$$\frac{\partial F^*(I, a)}{\partial a} = 0 \quad 3-37b$$

Esta condición nos permite obtener la relación entre indentación y radio del área de contacto, que hará que 3-34 dependa solo de la indentación, lo que nos permite resolver el problema de forma completa. Solo nos queda explicitar la forma de la distribución de presiones para el caso del cilindro ($P(r)$ en 3-34), y el problema estará totalmente resuelto

3.4 Solución “semilla” de un cilindro.

En la sección anterior hemos visto que, si tuviéramos la distribución de presiones para el caso de un cilindro, podríamos obtener la fuerza para una geometría de indentador arbitraria. Aunque esta fuerza está relacionada con las presiones del cilindro a través de la integral 3-34, resolver una integral de forma directa es muchísimo más sencillo que intentar resolver un sistema de ecuaciones integrales como el propuesto por Dimitriadis. No solo eso, si no que hemos demostrado que, una vez resulta la integral, la condición 3-37b nos indicará cual es el área de contacto en función de la geometría. Pero antes que nada, tenemos que obtener la distribución de presiones para el cilindro. Para ello plantearemos el sistema de ecuaciones 3-20 para la geometría del mismo ($f(r) = 0$). Resolviendo las ecuaciones consecutivamente obtendremos la presión $P(r)$ a usar en 3-34.

Obtención de P_0

La primera ecuación integral a resolver está dada por

$$\iint P_0 G_\infty dS = I \quad 3-38$$

Este problema es exactamente el de un indentador cilíndrico en un medio infinito. Dicho de otra manera... ¿Qué presión, en un sistema con la función de Green de un medio infinito, nos da una indentación constante en el área de contacto? Pues la presión del problema clásico resuelto por Sneddon. Por lo tanto, sabemos por la bibliografía la forma de este primer término

$$P_0 = \frac{EI}{\pi(1-\nu^2)} (a-r^2)^{-\frac{1}{2}} \quad 3-39$$

Esta distribución de presiones tiende a infinito en los bordes del cilindro ($a=r$), debido a la discontinuidad de la geometría.

Obtención de P_1

Para obtener P_1 usaremos la solución P_0 en la segunda ecuación integral

$$\iint P_1 G_\infty dS = - \iint P_0 G_\infty \alpha dS \quad 3-40$$

El término de la derecha se puede resolver, obteniendo

$$\iint P_1 G_\infty dS = - \frac{2\alpha_0 a}{\pi} \quad 3-41$$

Esta ecuación tiene la misma forma que la anteriormente resulta de orden cero, así que podemos obtener el valor de P_1 por simple inspección

$$P_1 = -P_0 \frac{2\alpha_0 a}{\pi l} \quad 3-42$$

Si multiplicamos por el factor ε tenemos cual es la primera corrección a la presión

$$P_1 \varepsilon = -P_0 \frac{2\alpha_0 a}{\pi h} \quad 3-43$$

Es decir, el primer término de la corrección a la presión tiene la misma forma que la presión para un medio infinito, solo que multiplicado por un término de corrección proporcional al ratio entre el radio de contacto y la profundidad de la muestra. Es interesante notar que este factor de corrección no depende la profundidad de la indentación.

Obtención de P_2

Para obtener P_2 partiremos de la ecuación integral

$$\iint P_2 G_\infty dS = - \iint P_1 G_\infty \alpha dS \quad 3-44$$

De forma similar al caso anterior, resolvemos el término de la derecha, obteniendo de nuevo una ecuación similar a la resuelta en término de orden cero

$$\iint P_2 G_\infty = \left(\frac{2\alpha_0 a}{\pi} \right)^2 \quad 3-45$$

Por lo que, mediante inspección, podemos llegar a la solución

$$P_2 = P_0 \left(\frac{2\alpha_0 a}{\pi l} \right)^2 \quad 3-46$$

Para obtener la corrección total a la presión de segundo orden, tendremos que multiplicar P_2 por el factor ε^2 , obteniendo

$$P_2 \varepsilon^2 = P_0 \left(\frac{2\alpha_0}{\pi} \right)^2 \left(\frac{a}{h} \right)^2 \quad 3-47$$

La solución vuelve a ser proporcional a la del medio infinito, multiplicada de nuevo por un factor de corrección, esta vez proporcional al cuadrado del ratio entre el área de contacto y el grosor de la muestra.

Obtención de P_3

La ecuación integral para obtener el tercer término es un poco más compleja

$$\iint P_3 G_\infty dS = - \iint [P_0 G_\infty \beta + P_2 G_\infty \alpha] dS \quad 3-48$$

Usando las expresiones para P_0 y P_2 obtenidas anteriormente podemos calcular el término de la derecha, por lo que

$$\iint P_3 G_\infty dS = - \frac{8\alpha_0^3 a^3}{\pi^3} - \frac{4\beta_0 a^3}{3\pi I^2} - \frac{2\beta_0 a r^2}{\pi I^2} \quad 3-49$$

Para solucionar la ecuación integral probaremos con una presión del tipo

$$P_3 = \frac{P_{31}}{(a-r^2)^{\frac{1}{2}}} + \frac{P_{32}}{(a-r^2)^{\frac{1}{2}}} r^2 \quad 3-50$$

Donde el primer término tiene la forma de la distribución de presiones en un medio infinito, mientras que el segundo está distribución de presiones está corregida por un término cuadrático. En realidad lo que estamos haciendo es coger los dos primeros términos de una serie de Taylor de la presión (centrada en el centro del área de contacto), con la esperanza de que de esta forma podamos encontrar una solución. El truco funciona, siendo los dos coeficientes obtenidos

$$P_{31} = - \frac{8a^3 E}{\pi^2(1-\nu^2)I^2} \left(\frac{\alpha_0^3}{\pi^2} - \frac{\beta_0}{3} \right) \quad 3-51$$

$$P_{32} = - \frac{8a^3 E}{\pi^2(1-\nu^2)I^2} \left(\frac{\beta_0}{a^2} \right)$$

Por lo que el término final de corrección $P_3 \varepsilon^3$ estará dado por

$$P_3 \varepsilon^3 = - \frac{8EI}{\pi^2(1-\nu^2)} \left(\frac{\alpha_0^3}{\pi^2} - \frac{\beta_0}{3} + \frac{\beta_0 r^2}{a^2} \right) (a-r^2)^{-\frac{1}{2}} \left(\frac{a}{h} \right)^3 \quad 3-52$$

Donde podemos ver de nuevo que el factor de corrección es proporcional al cubo del ratio entre el área de contacto y el grosor de la muestra.

Obtención de P_4

La última ecuación integral a atacar tendrá la forma

$$\iint P_4 G_\infty dS = \iint [P_1 G_\infty \beta + P_3 G_\infty \alpha] dS \quad 3-53$$

Donde la integral del término de la derecha se puede resolver, obteniendo

$$\iint P_4 G_\infty dS = -\frac{8a^4\alpha_0}{3I\pi^4} [\pi^3 + 6\alpha_0^3 + 2\beta_0\pi^2] + \frac{4\alpha_0 a^2 r^2}{\pi I^3} \quad 3-54$$

De nuevo probaremos con una distribución de presiones del tipo

$$P_4 = \frac{P_{41}}{(a-r^2)^{\frac{1}{2}}} + \frac{P_{42}}{(a-r^2)^{\frac{1}{2}}} r^2 \quad 3-55$$

Que tiene la misma forma que en el caso exitoso de P_3 . Resolviendo obtenemos los valores para las dos constantes

$$P_{41} = \frac{16a^4 E}{\pi^6(1-\nu^2)I^3} (\alpha_0^4) \quad 3-56$$

$$P_{42} = \frac{16a^4 E}{\pi^6(1-\nu^2)I^3} \left(\frac{\alpha_0\beta_0\pi^2}{a^2} \right)$$

Por lo que la forma final de la corrección de presiones de orden cuarto será

$$P_4 \varepsilon^4 = \frac{16EI}{\pi^6(1-\nu^2)} \left(\alpha_0^4 + \frac{\alpha_0\beta_0\pi^2 r^2}{a^2} \right) (a-r^2)^{-\frac{1}{2}} \left(\frac{a}{h} \right)^4 \quad 3-57$$

Donde de nuevo este término es proporcional a una potencia del ratio entre el área de contacto y el grosor de la muestra, en este caso a la cuarta.

Presión total y fórmula general para la fuerza

Si sumamos todos los términos obtenidos anteriormente tendremos la distribución de presiones para un indentador cilíndrico

$$P = P_0 - P_0 \frac{2\alpha_0 a}{\pi h} + P_0 \left(\frac{2\alpha_0}{\pi} \right)^2 \left(\frac{a}{h} \right)^2$$

$$- \frac{8EI}{\pi^2(1-\nu^2)} \left(\frac{\alpha_0^3}{\pi^2} - \frac{\beta_0}{3} + \frac{\beta_0 r^2}{a^2} \right) (a-r^2)^{-\frac{1}{2}} \left(\frac{a}{h} \right)^3 \quad 3-58$$

$$+ \frac{16EI}{\pi^6(1-\nu^2)} \left(\alpha_0^4 + \frac{\alpha_0\beta_0\pi^2 r^2}{a^2} \right) (a-r^2)^{-\frac{1}{2}} \left(\frac{a}{h} \right)^4 + \dots$$

Esta es la presión que deberemos introducir en la integral 3-34, que junto con la geometría del indentador nos dará la fuerza en función de la indentación.

Es interesante que en esta expresión la presión sea lineal con la indentación. Esto no quiere decir que para otras geometrías la fuerza total también vaya a ser lineal, ya que el área de contacto variará con la

indentación. Sin embargo, la dependencia sí será la misma en el sentido de que el parámetro que debemos analizar para ver si el efecto del sustrato va a ser importante es el ratio entre el radio del área de contacto y el grosor de la muestra. Ya tenemos todas las piezas (3-58 combinada con 3-34) para resolver el problema en otras geometrías. Empezaremos con un indentador cilíndrico.

3.4 Fuerzas y áreas para un cilindro

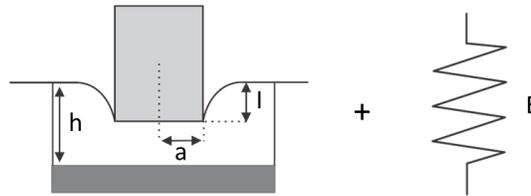


Fig. 3-4: Esquema de indentación de un sólido finito que sigue el modelo elástico, mediante una punta cilíndrica.

En el caso del cilindro el área de contacto no varía con la indentación, así que será el caso más sencillo de todos.

Ecuación general

La fuerza total estará dada simplemente por la integral de la presión 3-58 en toda el área de contacto

$$F = \frac{2aIE}{1-\nu^2} \left[1 - \frac{2\alpha_0 a}{\pi h} + \left(\frac{2\alpha_0}{\pi} \right)^2 \left(\frac{a}{h} \right)^2 - \frac{8a^3(3\alpha_0^3 + \pi^2 \beta_0)}{3\pi^3} \left(\frac{a}{h} \right)^3 - \frac{16\alpha_0(3\alpha_0^3 + 2\pi^2 \beta_0)}{3\pi^4} \left(\frac{a}{h} \right)^4 \right] \quad 3-59$$

Como podemos ver, la fuerza consiste en la fuerza para el caso infinito dada por Sneddon, multiplicada por un factor de corrección. Es interesante notar que este factor de corrección no depende de la profundidad, si no del ratio entre el área de contacto y el grosor de la muestra. Es decir, lo que indica cuanto va a afectar el sustrato a nuestras medidas no es cuanto indentaremos, si no cuanto área de contacto tengamos.

Radio de contacto

En el caso del cilindro el área de contacto es independiente de la indentación, siempre y cuando tengamos contacto entre el mismo y la muestra. Es decir, el radio de contacto es, o el radio del cilindro si este está en contacto, o cero cuando se desacopla de la muestra.

Fuerza para el caso de la célula

Si particularizamos la ecuación general de la fuerza para el caso de un material incompresible (es decir $\nu = 0.5$), y para una célula perfectamente fijada a la superficie (en este caso incompresible, las expresiones 3-12a tendrán los siguientes valores: $\alpha_0 = -1.7795$ and $\beta_0 = 1.0079$), obtendremos la siguiente formula:

$$F = \frac{8a}{3} EI \left[1 + \frac{1.133a}{h} + \frac{1.283a^2}{h^2} + \frac{0.598a^3}{h^3} - \frac{0.291a^4}{h^4} \right] \quad 3-60$$

Que es más sencilla de manejar que la expresión general. En esta expresión se ve aún más claramente que la corrección debida al sustrato solo depende del radio del área de contacto, no de la indentación.

3.5 Fuerzas y áreas para un cono

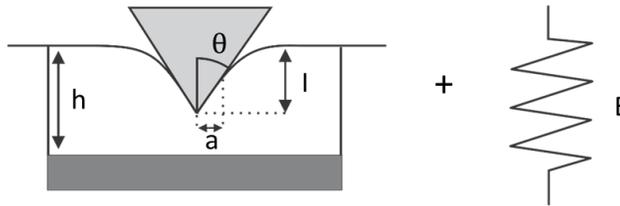


Fig. 3-5: Esquema de indentación de un sólido finito que sigue el modelo elástico, mediante una punta cónica.

Ecuación general

Si calculamos la integral 3-34 usando la geometría del cono, tenemos la siguiente expresión

$$\begin{aligned}
F &= \frac{aE(-4I + a\pi\cot[\theta])}{2(-1 + \nu^2)} - \frac{aE(-4I + a\pi\cot[\theta])}{2(-1 + \nu^2)} \frac{2\alpha_0 a}{\pi h} \\
&+ \frac{aE(-4I + a\pi\cot[\theta])}{2(-1 + \nu^2)} \left(\frac{2\alpha_0 a}{\pi h}\right)^2 \\
&- \frac{a^4 E(-16I(3\alpha_0^3 + \pi^2 \beta_0) + a\pi(12\alpha_0^3 + 5\pi^2 \beta_0)\cot[\theta])}{3\pi^3(-1 + \nu^2)} \frac{1}{h^3} \\
&+ \frac{2a^5 E\alpha_0(-16I(3\alpha_0^3 + 2\pi^2 \beta_0) + 3a\pi(4\alpha_0^3 + 3\pi^2 \beta_0)\cot[\theta])}{3\pi^4(-1 + \nu^2)} \frac{1}{h^4}
\end{aligned} \tag{3-61}$$

Debido a que en este caso el área de contacto va variando con la indentación, la fórmula es bastante más compleja que en el caso del cilindro. Para simplificarla tenemos que introducir la forma específica de la variación del radio de contacto con la indentación, por lo que vamos a calcularla.

Radio de contacto

Usando la fuerza general 3-61, e introduciéndola en la expresión 3-37b, tenemos

$$\frac{\partial F(I, a)}{\partial a} = \frac{\partial \left[\frac{aE(-4I + a\pi\cot[\theta])}{2(-1 + \nu^2)} - \frac{aE(-4I + a\pi\cot[\theta])}{2(-1 + \nu^2)} \frac{2\alpha_0 a}{\pi h} \right]}{\partial a} = 0 \tag{3-62}$$

Resolviendo esta ecuación y despejando para el radio de contacto, tenemos la expresión buscada:

$$a = \frac{2\tan[\theta]I}{\pi} \left[1 - \frac{2\alpha_0 \tan[\theta]I}{h\pi^2} \right] \tag{3-63}$$

Podemos ver que el área de contacto en función de la indentación sigue un esquema parecido al de la fuerza. Es decir, tenemos el área de contacto dada por Sneddon para el caso seminfinito, multiplicada por un factor de corrección dependiente del grosor de la muestra.

Fuerza para el caso de la célula

Vamos a simplificar la ecuación general de la fuerza 3-61 suponiendo que la muestra es incompresible y que está perfectamente fijada al sustrato. Si suponemos que el área de contacto es la clásica calculada por Sneddon para el caso infinito tendríamos que esta expresión sería

$$\begin{aligned}
F &= \frac{8 \tan \theta}{3\pi} EI^2 \left[1 + \frac{0.721I \tan[\theta]}{h} + \frac{0.5201I^2 \tan[\theta]^2}{h^2} + \frac{0.210I^3 \tan[\theta]^3}{h^3} \right. \\
&\quad \left. - \frac{0.008(I^4 \tan[\theta]^4)}{h^4} \right]
\end{aligned} \tag{3-64}$$

Sin embargo, sabemos que la variación del radio de contacto con la indentación depende del grosor, estando dada por la expresión 3-63. Si cogemos el primer término de corrección en dicha ecuación, obtenemos la siguiente simplificación de la fuerza general 3-61:

$$F = \frac{8 \tan \theta}{3\pi} EI^2 \left[1 + \frac{0.721 I \tan[\theta]}{h} + \frac{0.650 I^2 \tan[\theta]^2}{h^2} + \frac{0.491 I^3 \tan[\theta]^3}{h^3} + \frac{0.225 I^4 \tan[\theta]^4}{h^4} \right] \quad 3-65$$

Que será una expresión para la fuerza más precisa que 3-64.

3.6 Fuerzas y áreas para una esfera

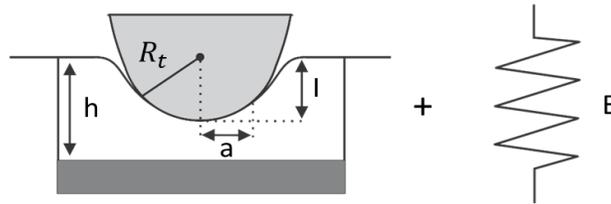


Fig. 3-6: Esquema de indentación de un sólido finito que sigue el modelo elástico, mediante una punta esférica.

Ecuación general

Si calculamos la integral 3-34 usando la geometría de la esfera, tenemos la siguiente expresión

$$F = \frac{2E(a^3 - 3aIR_t)}{3(-1 + \nu^2)R_t} - \frac{2E(a^3 - 3aIR_t)}{3(-1 + \nu^2)R_t} \frac{2\alpha_0 a}{\pi h} + \frac{2E(a^3 - 3aIR_t)}{3(-1 + \nu^2)R_t} \left(\frac{2\alpha_0 a}{\pi h} \right)^2 - \frac{8E \left(\frac{2}{15} a^6 (15\alpha_0^3 + 7\pi^2 \beta_0) - 2a^4 I (3\alpha_0^3 + \pi^2 \beta_0) R_t \right)}{3\pi^3 (-1 + \nu^2) R_t} \frac{1}{h^3} + \frac{32a^5 E \alpha_0 (a^2 (5\alpha_0^3 + 4\pi^2 \beta_0) - 5I (3\alpha_0^3 + 2\pi^2 \beta_0) R_t)}{15\pi^4 (-1 + \nu^2) R_t} \frac{1}{h^4} \quad 3-66$$

Donde de nuevo vemos que la expresión resultante es bastante complicada. El siguiente paso es usar esta expresión para calcular la variación del radio de contacto con la indentación.

Radio de contacto

Usando la condición 3-37b, como hicimos en el caso del cono, tenemos la siguiente expresión

$$\frac{\partial F(I, a)}{\partial a} = \frac{\partial \left[\frac{2E(a^3 - 3aIR_t)}{3(-1 + \nu^2)R_t} - \frac{2E(a^3 - 3aIR_t)}{3(-1 + \nu^2)R_t} \frac{2\alpha_0 a}{\pi h} \right]}{\partial a} = 0 \quad 3-67$$

Si resolvemos y despejamos el radio de contacto, tenemos (solo hasta el primer orden)

$$a = \sqrt{R_T I} \left[1 - \frac{2\alpha_0 \sqrt{R_T I}}{3h\pi} \right] \quad 3-68$$

El radio de contacto, como era de esperar, es el calculado clásicamente por Hertz, multiplicado por un factor de corrección dependiente del grosor de la muestra. Vamos entonces a calcular una expresión simplificada de la fuerza para el caso de la célula.

Fuerza para el caso de la célula

Supongamos que la célula es incompresible y que está perfectamente fijada al sustrato. Si suponemos que el área de contacto es la clásica calculada por Sneddon tendríamos que la ecuación general 3-66 sería

$$F = \frac{16}{9} ER_t^{\frac{1}{2}} I^{\frac{3}{2}} \left[1 + \frac{1.133\sqrt{IR_t}}{h} + \frac{1.283IR_t}{h^2} + \frac{0.769\delta R_t \sqrt{IR_t}}{h^3} - \frac{0.0975(I^2 R_t^2)}{h^4} \right] \quad 3-69$$

Sin embargo, si introducimos el radio de contacto corregido dado por 3-68, encontramos una expresión más precisa:

$$F = \frac{16}{9} ER_t^{\frac{1}{2}} I^{\frac{3}{2}} \left[1 + \frac{1.133\sqrt{IR_t}}{h} + \frac{1.497IR_t}{h^2} + \frac{1.469IR_t \sqrt{IR_t}}{h^3} + \frac{0.755(I^2 R_t^2)}{h^4} \right] \quad 3-70$$

La primera expresión coincide perfectamente con la calculada por Dimitriadis et al [90] (ecuación 3-22), salvo por el último término.

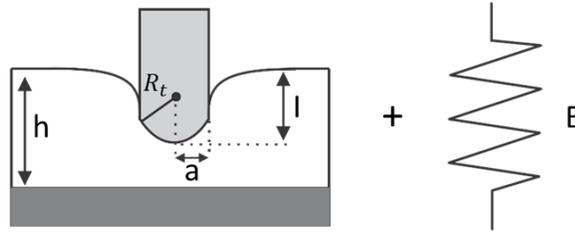


Fig. 3-7: Esquema de indentación de un sólido finito que sigue el modelo elástico, mediante una nanoaguja

Una nanoaguja es un cilindro muy fino, cuyo extremo podemos aproximar a una semiesfera de radio R_T . Para analizar su mecánica de contacto distinguiremos entre dos fases distintas.. En la primera, el radio del área de contacto (a) es menor que el radio de la nanoaguja en sí (R_T), por lo que el comportamiento será el de un indentador esférico. Sin embargo, a partir de cierta indentación crítica I_c , el área de contacto será toda la base da la nanoaguja, por lo que el problema de contacto se podrá estudiar como una combinación lineal entre un cilindro y una esfera. Es decir:

$$\begin{array}{ll} I < I_c & \text{Esfera pura} \\ I > I_c & \text{Esfera + cilindro} \end{array} \quad 3-71$$

Vamos a intentar calcular una expresión para la indentación crítica.

Cálculo de la indentación crítica

La condición de indentación crítica es que el radio de contacto sea igual que el radio de la propia nanoaguja. Usando la expresión de radio de contacto para la esfera (ecuación 3-68), vemos que la condición está dada por

$$R_T = \sqrt{R_T I_c} - \frac{2\alpha_0 R_T I_c}{3h\pi} \quad 3-72$$

Si despejamos la indentación crítica tendremos

$$I_c = R_T + \frac{4\alpha_0 R_T^2}{3h\pi} + \dots \quad 3-73$$

Donde hemos calculado solo la primera potencia del inverso del grosor de la muestra. De nuevo la indentación crítica depende del grosor de la muestra.

Área de contacto

El área de contacto será, en función de la indentación crítica

$$\begin{aligned} a &= \sqrt{R_T I} - \frac{2\alpha_0 R_T I}{3h\pi} & I < I_c \\ a &= R_T & I > I_c \end{aligned} \quad 3-74$$

Donde para profundidades menores que la crítica el área será la de una esfera normal, mientras que para indentaciones mayores será constante, igual a la base de la nanoaguja.

Fuerza

Para las fuerzas tendremos en los diferentes regímenes

$$\begin{aligned} F &= F_s(I) & I < I_c \\ F &= F_s(I_c) + F_p(I - I_c) & I > I_c \end{aligned} \quad 3-75$$

Donde F_s es la fuerza para una esfera (ecuación 3-70), mientras que F_p es la fuerza para un cilindro (ecuación 3-60). A partir de la indentación crítica hemos hecho uso de la linealidad de las ecuaciones del sistema, de forma que la fuerza total es la suma de una esfera indentada hasta la indentación crítica, más un cilindro de base plana para el resto de la indentación.

3.8 Estudio numérico de los resultados

Una vez obtenidos los resultados analíticos, vamos a realizar un estudio numérico de los mismos, comparando los resultados obtenidos para las diferentes geometrías. En algunos casos también utilizaremos simulaciones FEM como forma de chequear “experimentalmente” nuestras ecuaciones.

Influencia del grosor

Vamos a ver como varía la fuerza en función de la indentación, para distintos grosores de la muestra y diferentes geometrías. Dichas curvas (así como una descripción de la geometría del experimento) se puede ver en la figura 3.8.

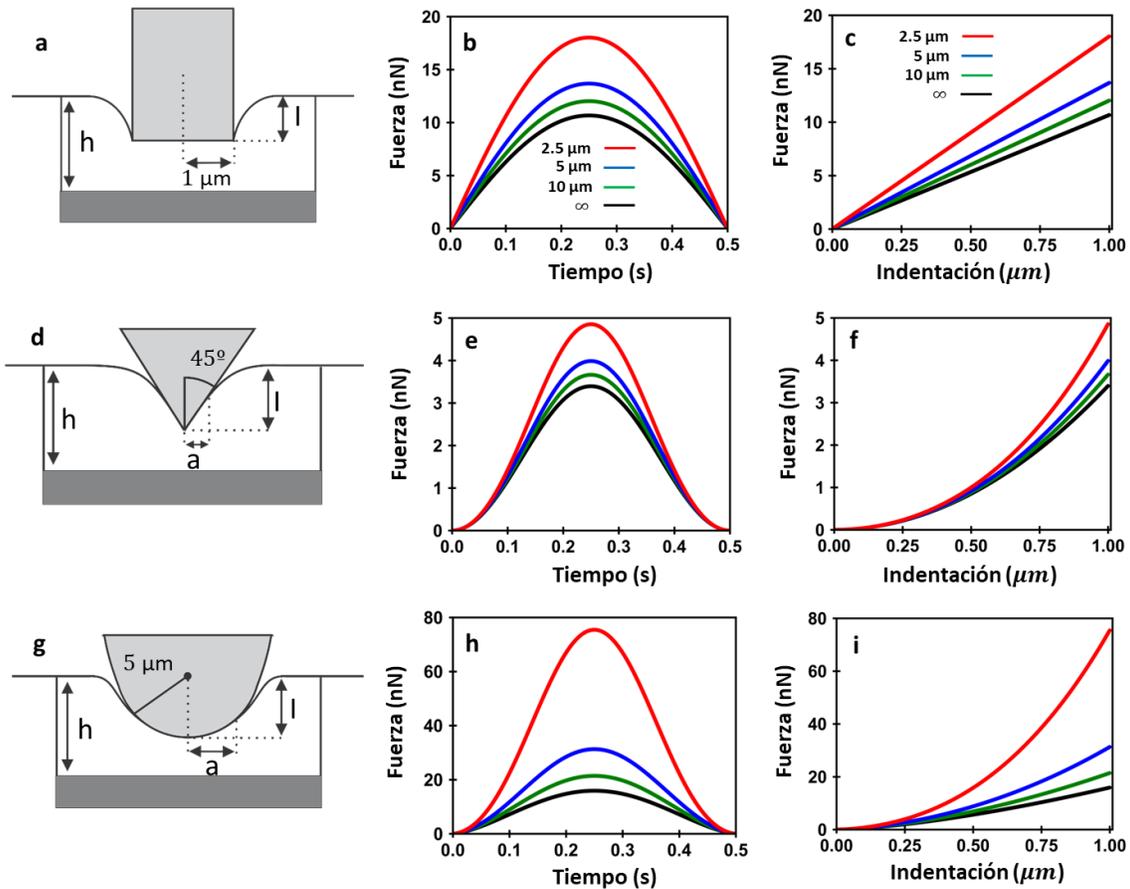


Fig. 3-8: Fuerzas para una muestra finita elástica en función del grosor. Esquema (a) y fuerzas en función de la penetración (b) y en función del tiempo (c) para un cilindro, $R = 1 \mu\text{m}$. Esquema (d) y fuerzas en función de la penetración (e) y en función del tiempo (f) para un cono, $\theta = 45^\circ$. Esquema (g) y fuerzas en función de la penetración (h) y en función del tiempo (i) para una esfera, $R = 5 \mu\text{m}$. Muestra, $E = 4 \text{ kPa}$, $h = \text{variable}$.

Dado que vamos a analizar un problema completamente elástico, no importa qué tipo de indentación temporal usemos, ya que las curvas de fuerza son independientes de la velocidad. Esto se puede ver tanto en las curvas de fuerza en función del tiempo (paneles b, e y h) como en las que están en función de la profundidad (paneles c, f, i). En las primeras existe una simetría claramente visible respecto al punto de máxima fuerza, debido a que la curva es simétrica tanto en la ida como en la vuelta. En las segundas se puede ver que no hay ningún tipo de histéresis, lo que indica que el material no absorbe energía durante todo el experimento. Es interesante notar que esto es debido no solo a que el material es puramente elástico, si no a que las condiciones de contorno en el sustrato son del tipo 3-4a o 3-4b. Es decir, si la célula, en vez de estar totalmente agarrada (condición 3-4a) o totalmente libre para deslizar (condición 3-4b) tuviera algún tipo de rozamiento o fuerza adhesiva con la base, tendríamos pérdidas de energía y por lo tanto histéresis en las curvas. Recordemos que las figuras están calculadas suponiendo que la célula se encuentra totalmente fijada al sustrato.

Podemos observar que la fuerza a cierta indentación y para cada una de las geometrías aumenta según disminuimos el grosor de la muestra. Esto tiene todo el sentido del mundo, ya que, si la muestra es

más fina, el efecto de un sustrato de infinita dureza debería ser más visible. Las correcciones llegan el algunos casos multiplicar por tres la fuerza en el caso infinito (por ejemplo en la esfera, paneles g, h, i), ya que el radio de contacto es comparable al grosor de la muestra. Sin embargo, no es fácil distinguir en las curvas que porcentaje de la fuerza es debida al sustrato y cuanta debida a la respuesta elástica de la célula en sí. Para analizar esta cuestión vamos a reescribir las fórmulas de la fuerza.

Estudio de los términos de corrección

Hemos deducido teóricamente que la fuerza siempre tiene la forma (ecuaciones 3-60, 3-65, 3-70)

$$F = F_0(1 + C_1 + C_2 + C_3 + C_4 + \dots) \quad 3-76$$

Donde F_0 es la fuerza en el caso infinito y los términos de corrección C_i dependen de la indentación y del grosor de la muestra. Podemos entonces definir la fuerza total F_n como la fuerza cuando hemos aplicado hasta el término C_n , es decir

$$F_n = F_0 \left(\sum_{i=0}^{i=n} C_i \right) = F_0 K_n \quad 3-77$$

Donde K_n es la corrección total que aplicamos a la fuerza debido a la presencia del sustrato.

Esperaríamos que el sumatorio convergiera, es decir, que según aumentamos n, tanto $F_{n+1} - F_n$ como $K_{n+1} - K_n$ fueran más y más pequeños. Para comprobar si esto es así en nuestras ecuaciones, vamos a representar ambas cantidades, F_n y K_n , para las tres principales geometrías en función de la indentación.

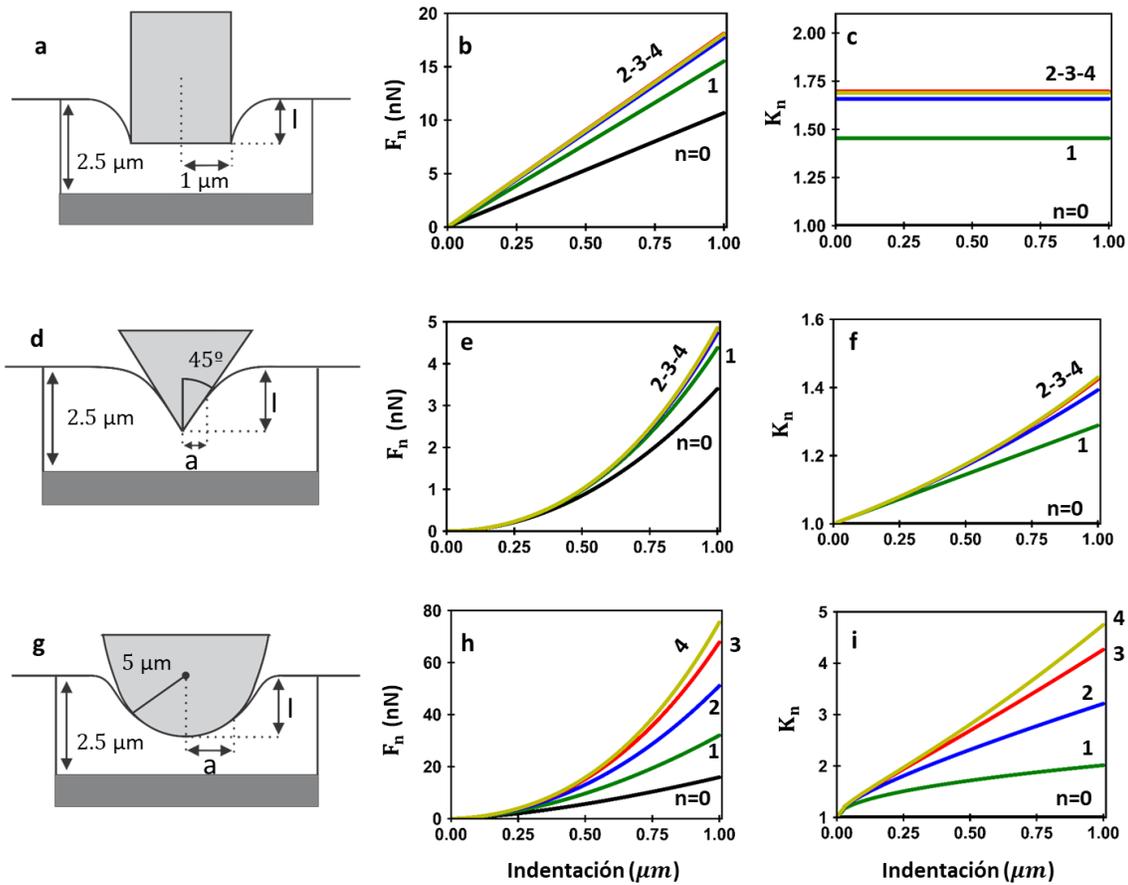


Fig. 3-9: Fuerzas para una muestra finita elástica en función del número de términos de corrección.. Esquema (a), fuerzas en función de la penetración (b) y factor de corrección (c) para un cilindro, $R = 2.5 \mu\text{m}$. Esquema (d), fuerzas en función de la penetración (e) y factor de corrección (f) para un cono, $\theta = 45^\circ$. Esquema (g), fuerzas en función de la penetración (h) y factor de corrección (i) para un esfera, $R = 5 \mu\text{m}$. Muestra, $E = 4 \text{ kPa}$, $h = 2.5 \mu\text{m}$.

A la izquierda (paneles a, d, y g) de la figura 3-9 podemos ver las tres geometrías que vamos a calcular, todas ellas para un grosor de muestra de $2.5 \mu\text{m}$. Lo primero que vamos a observar es la convergencia de los términos (paneles c, f, e i) de corrección, así de cómo las fuerzas totales hasta cierto orden de corrección (paneles b, e y h). Podemos ver cómo, a partir del 2 término, para las geometrías del cilindro (b, c) y del cono (e, f) las curvas se encuentran visiblemente juntas, lo cual quiere decir que estamos obteniendo convergencia, es decir, que no necesitaríamos más términos de corrección para calcular correctamente la fuerza. En el caso de la esfera esta convergencia comienza a un orden más alto (entre el tercer y el cuarto orden de corrección), lo que quiere decir que estamos al límite de necesitar más términos de corrección para obtener una fuerza correcta. Sin embargo, veremos en la siguiente subsección que con los cuatro términos calculados podemos predecir bastante bien el comportamiento del sistema, al menos en este orden de indentaciones y grosores de muestra.

Módulo de Young aparente: Simulaciones FEM

Vamos a intentar comprobar si nuestra teoría nos permite calcular el módulo de Young en un experimento. Para ello, utilizaremos simulaciones de FEM para obtener una curva de fuerzas “real”. Por un lado, esta curva experimental debería coincidir con nuestros desarrollos teóricos. Por otro lado, si intentamos ajustar estos datos a un modelo teórico, podremos obtener el módulo de Young, que debería coincidir con el que hemos puesto en el modelo FEM al hacer la simulación.

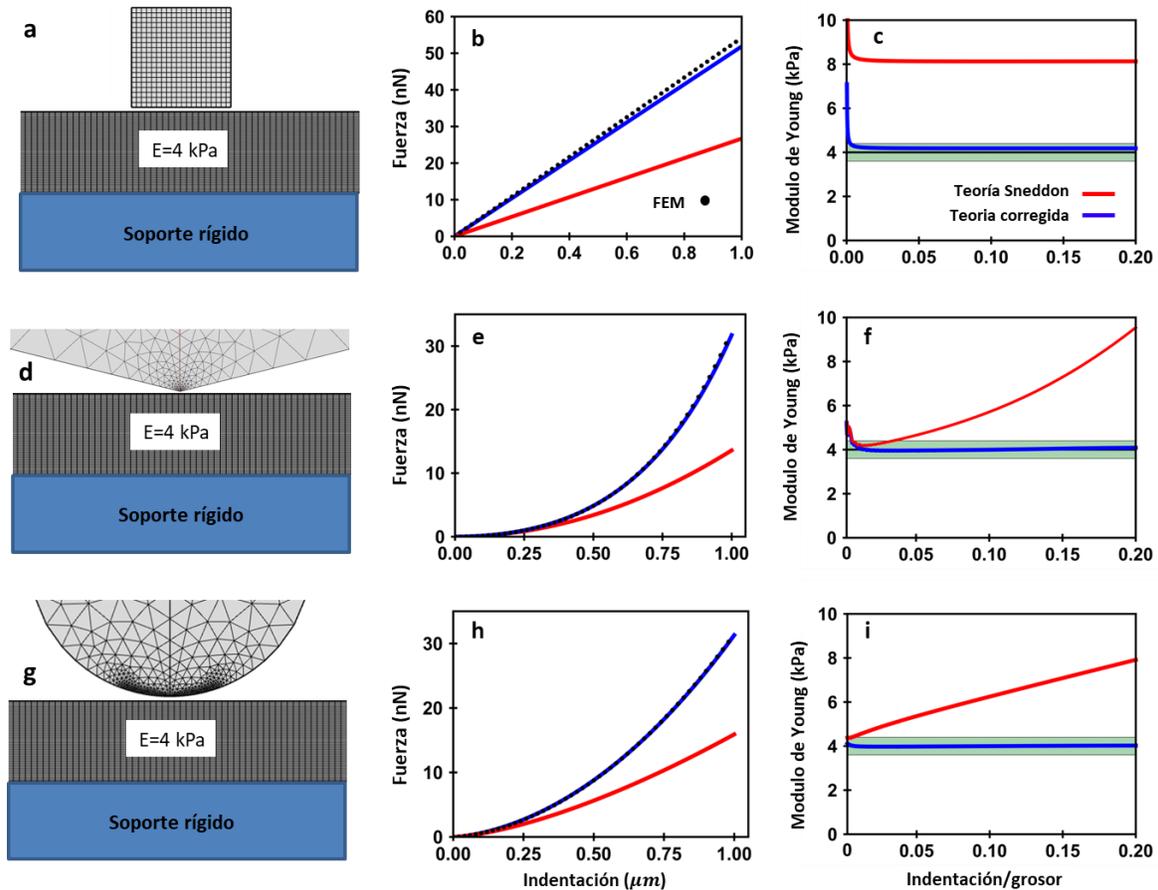


Fig. 3-10: Esquema de simulación, fuerzas, y módulos de Young calculados para una muestra finita elástica. Esquema (a), fuerzas en función de la penetración (b) y módulos de Young calculados (c) para un cilindro, $R = 2.5 \mu\text{m}$. Esquema (d), fuerzas en función de la penetración (e) y módulos de Young calculados (f) para un cono, $\theta = 75^\circ$. Esquema (g), fuerzas en función de la penetración (h) y módulos de Young calculados (i) para un esfera, $R = 5 \mu\text{m}$. Muestra, $E = 4 \text{ kPa}$, $h = 5 \mu\text{m}$.

En la figura 3-10 podemos ver los diferentes esquemas utilizados para dicha simulación en las tres geometrías diferentes (paneles a, d y g). Cuando representamos las fuerzas en función de la indentación (paneles b, e y h) obtenidas en la simulación, vemos que encajan bastante bien con la teoría que hemos desarrollado para las distintas geometrías (ecuaciones 3-60, 3-65 y 3-70). Como referencia se puede ver la curva teórica de fuerzas en el caso de que la muestra fuera infinita (teoría de Sneddon), viéndose que la corrección debida a sustrato es notable.

En la misma figura (paneles c, f, i) podemos ver el módulo de Young efectivo calculado mediante un ajuste de las curvas de fuerza obtenidas en la simulación FEM. Se han realizado dos ajustes, uno a la ecuación clásica de Sneddon para un medio infinito (es decir, que no tiene en cuenta el efecto del sustrato, ecuaciones 2-20 con los coeficientes dados en 2-21) y otra a las ecuaciones obtenidas en esta tesis, las cuales sí tienen en cuenta el grosor finito de la muestra. Se puede ver que el ajuste a las ecuaciones obtenidas en este trabajo permite recuperar el módulo de Young que habíamos usado en la simulación (4 kPa). Es decir, nuestras ecuaciones nos permiten obtener la elasticidad correcta de una célula a partir de las curvas de fuerza, independientemente del grosor de la célula. Si no tuviéramos en cuenta la presencia del sustrato e intentáramos obtener el módulo de Young usando la teoría clásica seminfinita de Sneddon, sobreestimaríamos la rigidez de la célula, como podemos ver en la figura. Esta sobreestimación sería mayor cuando mayor fuera la indentación, excepto para el cilindro, en cuyo caso el error solo dependería del radio de contacto.

Comparación con otros resultados de la bibliografía

Aunque el problema del efecto del sustrato no había sido resuelto completamente, si había sido estudiado por diversos autores. En primer lugar Dimitriadis encontró, como hemos visto, una solución para el indentador esférico. Dicha ecuación (eq 3-22) está obtenida bajo la hipótesis de que el radio del área de contacto no depende del grosor de la muestra. Sin embargo, hemos podido demostrar que dicho radio sí depende de la cercanía del sustrato, por lo que la solución de Dimitriadis es menos precisa. Para cuantificar el error, vamos a compararla con la solución que hemos obtenido usando el teorema de reciprocidad, ya que esta contiene una corrección adecuada del radio de contacto.

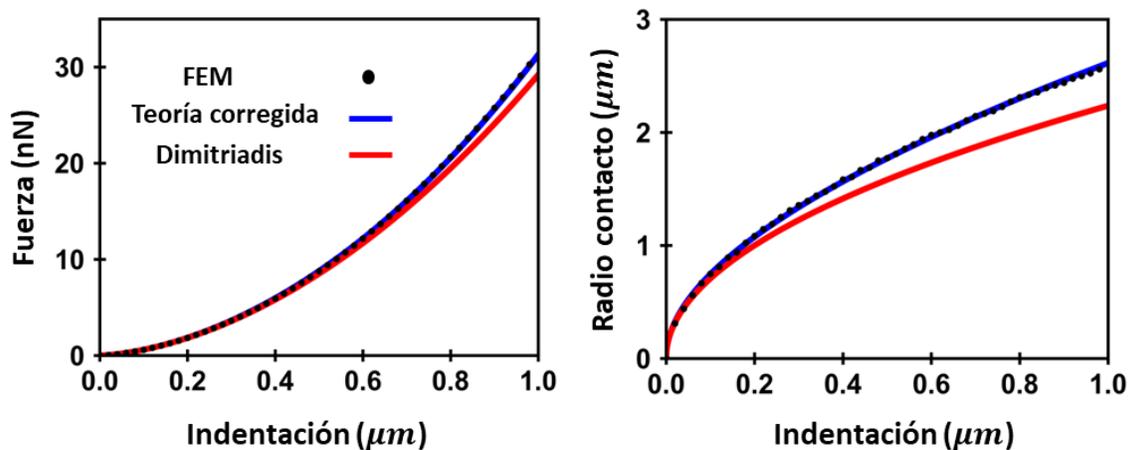


Fig. 3-11: Comparativa entre la teoría de Dimitriadis (ecuación 3-22) y la desarrollada en esta tesis (ecuación 3-70). Fuerza (a) y radio de contacto (b) en función de la indentación. Muestra, $E = 4 \text{ kPa}$, $h = 5 \mu\text{m}$. Radio de la esfera, $R = 5 \mu\text{m}$.

En la figura 3-11 se puede ver que tanto la fuerza como el radio de contacto calculados con las simulaciones FEM coinciden mejor con la ecuación obtenida en esta tesis que con la obtenida por Dimitriadis, si bien la variación no es muy grande, aunque apreciable.

Posteriormente, otros investigadores han intentado extender la solución de Dimitriadis para otras geometrías [103]. Sin embargo, dichas soluciones no convergen correctamente al aumentar el número de términos de corrección, y, sobre todo, no coinciden con los resultados dados por las simulaciones FEM. Como hemos visto, los resultados obtenidos en esta tesis sí cumplen estas dos condiciones.

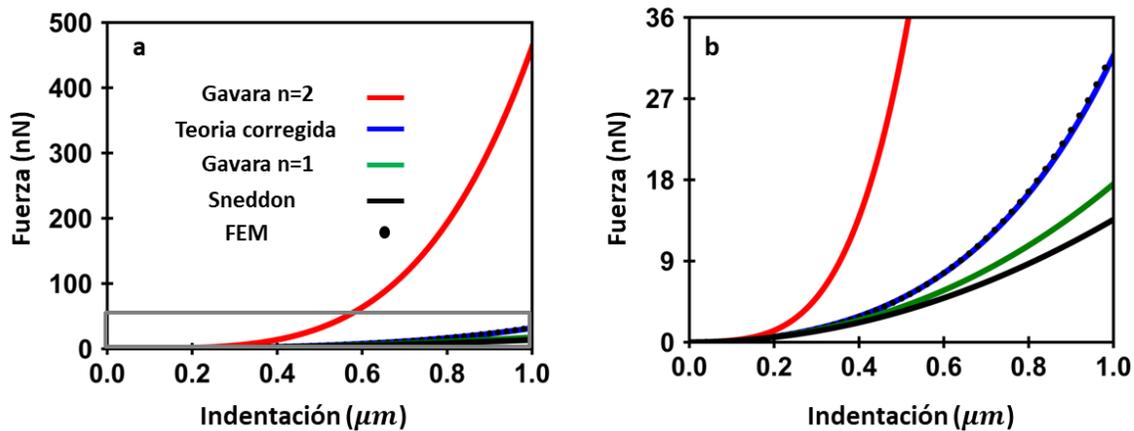


Fig. 3-12: Convergencia y similitud con las simulaciones FEM de la teoría ofrecida pro Gavara et al. en [103] y la teoría presentada en esta tesis para una punta cónica. (a) Fuerza en función de la indentación. (b) Detalle de la región gris. Muestra, $E = 4 \text{ kPa}$, $h = 5 \mu\text{m}$. Angulo del cono, $\theta = 75^\circ$.

En la figura 3-12 se puede ver la comparación entre la simulación de FEM, la teoría propuesta en esta tesis para un indentador cónico (ecuación 3-65), y las ofrecidas en la bibliografía [103]. Como se puede ver la corrección ofrecida en la bibliografía diverge rápidamente, siendo el segundo término de corrección gigantesco en comparación con el primero. Además la simulación FEM encaja bastante mejor con la ecuación ofrecida en esta tesis, como se observa en la figura.

3.9 Conclusiones

En este capítulo hemos resuelto completamente el problema del efecto de un sustrato rígido en las medidas de elasticidad obtenidas con un AFM. Este problema era de gran interés para el caso de las medidas de células, ya que el grosor de las mismas (en zonas alejadas del núcleo) es del orden de la indentación. Debido a este grosor limitado, las medidas de fuerza están afectadas por la cercanía del

sustrato, cuya rigidez hace que se calcule un valor erróneo para el módulo de Young (mayor que el real del sistema a medir).

Basándonos en la función de Green obtenida por Dimitriadis y su planteamiento de ecuaciones integrales, hemos obtenido la distribución de presiones para el caso de un indentador cilíndrico. Con ayuda del teorema de reciprocidad, hemos podido extender esta solución a cualquier otra geometría de indentador. Como ejemplo, hemos obtenido y detallado las soluciones analíticas para cuatro geometrías particulares muy usadas en la práctica: Cilindro, esfera, cono y nanoaguja. Una propiedad interesante común a todas las soluciones es que el efecto del sustrato depende del ratio entre el radio de contacto y el grosor de la muestra, no del ratio entre la indentación y el grosor de la misma, como era de esperar a priori. Es decir, a una misma indentación, una medida hecha con una punta muy fina es menos sensible a la rigidez del sustrato que una hecha con una punta muy gruesa. Otra forma de interpretar este resultado es que el grosor de la punta afecta no solo la resolución lateral de un AFM, sino también su resolución vertical.

Todas las soluciones teóricas obtenidas han sido validadas mediante su comparación con simulaciones de elementos finitos. Por otro lado, se ha comprobado que ciertas soluciones propuestas en la bibliografía a este problema eran erróneas, corrigiéndose las mismas.

En definitiva, usando la teoría desarrollada en este capítulo se pueden usar las curvas de fuerza para obtener el módulo de Young correcto de una muestra, independientemente de su grosor. Queda por resolver el mismo problema pero incluyendo viscoelasticidad. Eso es lo que haremos en el siguiente capítulo.

4. Efecto del sustrato en un sistema viscoelástico

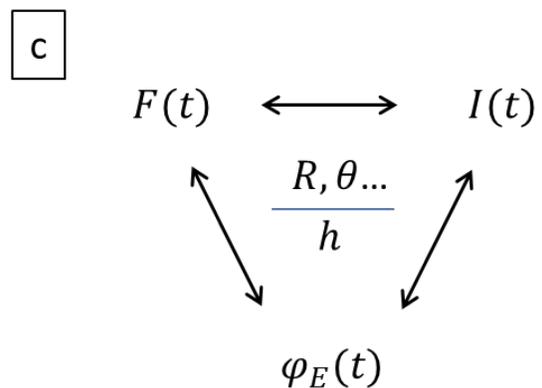
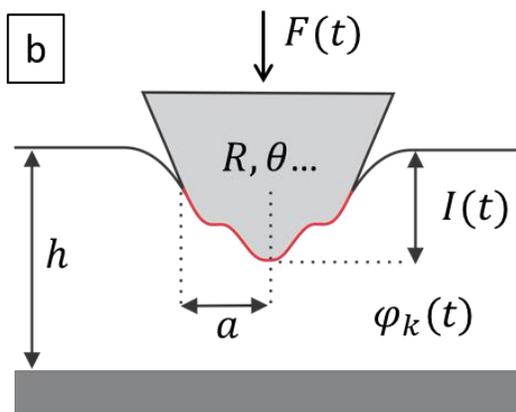
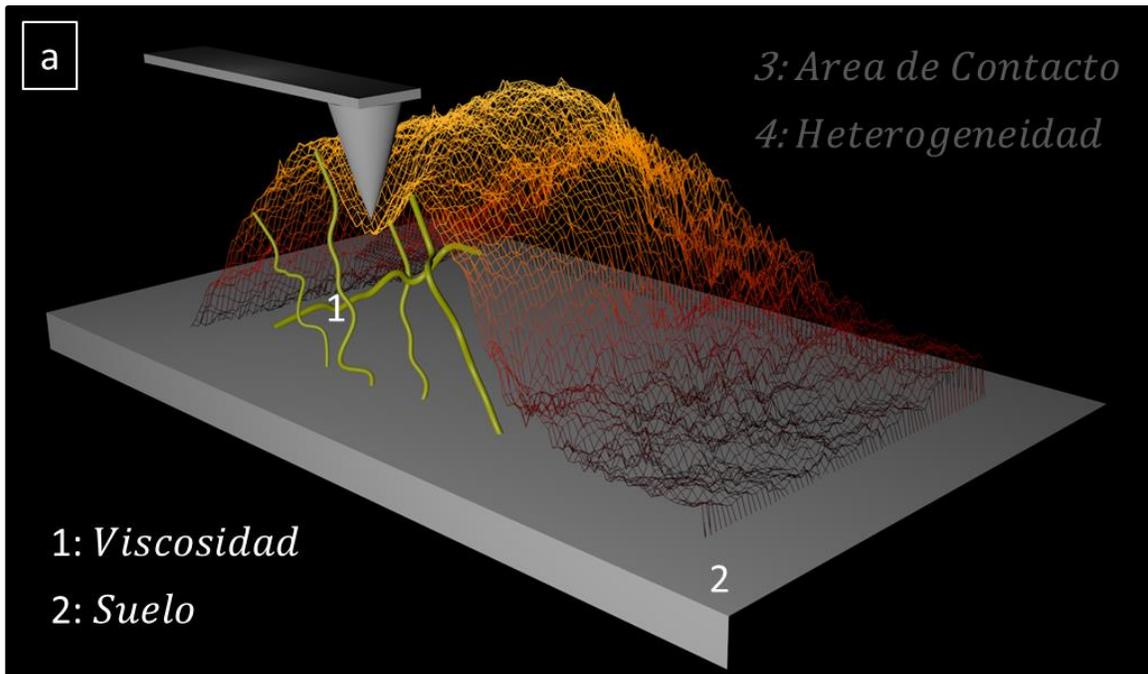


Fig. 4-0: (a) Este capítulo incluirá, como el anterior, el efecto del sustrato, solo que esta vez combinado con la viscoelasticidad de la célula. (b) Esquema del modelo a usar, donde incluimos todas las variables en juego. (c) Intentaremos encontrar las relaciones entre fuerzas, penetraciones y modelos viscoelásticos, en función de la geometría de la punta (dada por los parámetros $R, \theta \dots$) y del grosor h de la célula.

En el capítulo 2 hemos calculado cual es la respuesta mecánica de un sistema teniendo en cuenta la viscoelasticidad, mientras que en el capítulo 3 hemos analizado el efecto que tiene el sustrato en la respuesta elástica. La pregunta que surge de forma automática es ¿Se pueden combinar ambos efectos? Desde el punto de vista experimental la respuesta a esta pregunta es vital, ya que hemos visto que la célula se comporta claramente de forma viscoelástica, y además es suficientemente fina para ser afectada por el sustrato en sus zonas laterales. En este capítulo daremos una teoría combinada de ambos efectos.

4.1 Combinación del sustrato y viscoelasticidad.

Modelo matemático

Las condiciones de contorno serán ahora las mismas que las explicadas en el capítulo 3, pero la ecuación diferencial del sistema será la estudiada en el capítulo 2. Es decir, el problema a resolver estará dado por las siguientes condiciones de contorno (condiciones 3-1, 3-2, 3-3, y 3-4a):

$$\begin{aligned}
 u_z &= I - f(r) & r < a, z = 0 \\
 \sigma_{zz} &= 0 & r > a, z = 0 \\
 \sigma_{zy} = \sigma_{zx} &= 0 & \forall r, z = 0 \\
 \sigma_{ij} &= 0 & r \rightarrow \infty \\
 u_i &= 0 & z = h
 \end{aligned}
 \tag{4-1}$$

Cuya interpretación es exactamente la misma que la dada en el capítulo anterior. La ecuación diferencial a resolver será (igual a la usada en capítulo 2, ecuación 2-15)

$$\sigma_{ik} = \frac{\Psi_E}{3(1-2\nu)} u_{ll} \delta_{ik} + \frac{\Psi_E}{(1+\nu)} \left(u_{ik} - \frac{1}{3} u_{ll} \delta_{ik} \right)
 \tag{4-2}$$

Donde recordemos que Ψ_E es el operador integral definido en la ecuación 2-6. Dicho operador contiene la información viscoelástica del material, en forma de función de relajación (que dependerá del modelo viscoelástico a utilizar).

Aplicación de Lee y Radok

Vemos que el problema es similar al del capítulo 2, solo que ahora han cambiado las condiciones de contorno. Por lo tanto, vamos a aplicar de nuevo la misma estrategia que en dicho capítulo. La idea, recordamos, era, un vez que sepamos las soluciones del problema elástico, realizar el siguiente cambio formal en dichas ecuaciones

$$E \rightarrow \Psi_E = \int_0^t \varphi_E(t - \tau) \frac{d[\quad]}{d\tau} d\tau \quad 4-3$$

La demostración de Lee y Radok no incluye hipótesis de ningún tipo sobre la geometría o las condiciones de contorno del sistema, por lo que no existen limitaciones en teoría para aplicar dicho principio a nuestro caso[125]. La única salvedad es que todo lo que desarrollemos solo será válido en la ida... Por lo que tendremos que esperar hasta el capítulo 5 para resolver el problema completo incluyendo la vuelta de la curva de fuerzas.

Recordemos que las soluciones para el caso elástico fueron calculadas en el capítulo anterior, y tenían una forma genérica del tipo

$$F = \sum_{j=0}^N \alpha_j E I^{\beta_j} \quad 4-4$$

Donde los coeficientes dependían de la geometría del indentador (véase las ecuaciones para la fuerza obtenidas en el capítulo anterior, de donde podemos obtener explícitamente los coeficientes mediante inspección visual). Aplicando el cambio formal dado en 2-6 a la fórmula elástica 4-4, obtenemos las fórmulas centrales para el problema de una muestra viscoelástico de grosor finito:

$$F = \sum_{j=0}^N \alpha_j \int_0^t \varphi_E(t - \tau) \frac{d[I^{\beta_j}]}{d\tau} d\tau = \sum_{j=0}^N F_j \quad 4-5$$

Vamos a calcular casos concretos de dicha fórmula para diferentes funciones de relajación y geometrías. Por simplicidad, vamos a utilizar las soluciones para la fuerza simplificadas para el caso de un sistema incompresible y perfectamente anclado al sustrato (ecuaciones 3-60, 3-65 y 3-70). Sin embargo, la solución más general sería utilizar las ecuaciones de las fuerzas generales 3-59, 3-61 y 3-66, las cuales aún no tienen las simplificaciones de incompresibilidad y fijación al sustrato.

Dada la complejidad de las fórmulas que vamos a obtener, expresaremos los resultados en forma de tablas, donde en cada fila j daremos los coeficientes α_j y β_j , así como el término de la fuerza F_j .

4.2 Aplicación al modelo de Kelvin-Voigt.

En el caso de un modelo de Kelvin-Voigt, podemos encontrar (como en el caso infinito), una solución analítica para cualquier tipo de indentación temporal. Sustituyendo la función de relajación para dicho modelo en 4-5 encontramos que

$$F = \sum_{j=0}^N \alpha_j \int_0^t [E + \eta_E \delta(t)] \frac{d[I^{\beta_j}]}{d\tau} d\tau \quad 4-6$$

Si resolvemos las integrales encontramos la fórmula general para cualquier indentación temporal

$$F = \sum_{j=0}^N \alpha_j I(t)^{\beta_j - 1} [3\beta_j \eta_G \dot{I}(t) + EI(t)] = \sum_{j=0}^N F_j \quad 4-7$$

Donde hemos aplicado la relación $\eta_E = 3\eta_G$. Vamos a calcular los términos F_j en función de la geometría del indentador.

Cilindro

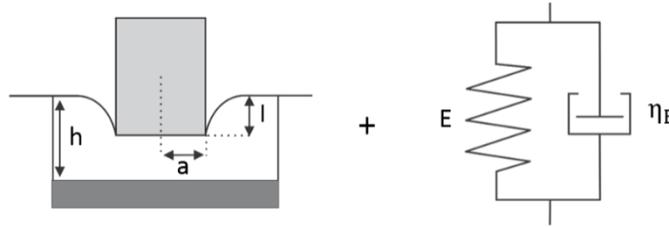


Fig. 4-1: Esquema de indentación de un sólido finito que sigue el modelo del Kelvin-Voigt, mediante una punta cilíndrica.

Usando los coeficientes obtenidos en 3-60, e introduciéndolos en 4-7 podemos obtener los diferentes términos F_j para la fuerza.

j	α_j	β_j	F_j
0	$\frac{8}{3}a$	1	$\frac{8a}{3} [3\eta_G \dot{I}(t) + EI(t)]$
1	$1.133 \frac{8}{3} a \left(\frac{a}{h}\right)^1$	1	$1.133 \frac{8}{3} a \left(\frac{a}{h}\right)^1 [3\eta_G \dot{I}(t) + EI(t)]$
2	$1.283 \frac{8}{3} a \left(\frac{a}{h}\right)^2$	1	$1.283 \frac{8}{3} a \left(\frac{a}{h}\right)^2 [3\eta_G \dot{I}(t) + EI(t)]$
3	$0.598 \frac{8}{3} a \left(\frac{a}{h}\right)^3$	1	$0.598 \frac{8}{3} a \left(\frac{a}{h}\right)^3 [3\eta_G \dot{I}(t) + EI(t)]$
4	$-0.291 \frac{8}{3} a \left(\frac{a}{h}\right)^4$	1	$-0.291 \frac{8}{3} a \left(\frac{a}{h}\right)^4 [3\eta_G \dot{I}(t) + EI(t)]$
4.8			

Vemos como de nuevo el efecto del sustrato depende del cociente $\frac{a}{h}$, pero no de la indentación. Esto es exactamente igual que en el caso elástico.

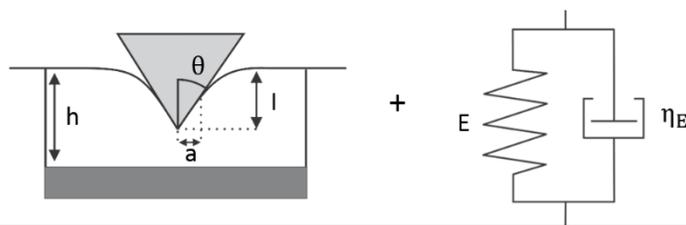


Fig. 4-2: Esquema de indentación de un sólido finito que sigue el modelo del Kelvin-Voigt, mediante una punta cónica.

En este caso los coeficientes están dados por la ecuación 3-65

j	$\alpha(j)$	$\beta(j)$	E_j
0	$\frac{8 \tan \theta}{3\pi}$	2	$\frac{8 \tan(\theta)}{3\pi} I [6\eta_G \dot{I}(t) + EI(t)]$
1	$0.721 \frac{8 \tan^2 \theta}{3h\pi}$	3	$0.721 \frac{8 \tan^2 \theta}{3h\pi} I^2 [9\eta_G \dot{I}(t) + EI(t)]$
2	$0.650 \frac{8 \tan^3 \theta}{3h^2\pi}$	4	$0.650 \frac{8 \tan^3 \theta}{3h^2\pi} I^3 [12\eta_G \dot{I}(t) + EI(t)]$
3	$0.491 \frac{8 \tan^4 \theta}{3h^3\pi}$	5	$0.491 \frac{8 \tan^4 \theta}{3h^3\pi} I^4 [15\eta_G \dot{I}(t) + EI(t)]$
4	$0.225 \frac{8 \tan^5 \theta}{3h^4\pi}$	6	$0.225 \frac{8 \tan^5 \theta}{3h^4\pi} I^5 [18\eta_G \dot{I}(t) + EI(t)]$
4.9			

Si bien ahora las correcciones son función del cociente $\frac{l}{h}$, por lo que si dependen de la indentación, sabemos que $\frac{l}{h} \propto \frac{a}{h}$, por lo que el efecto del sustrato sigue estando relacionado con el radio del área de contacto, igual que en el caso del cilindro.

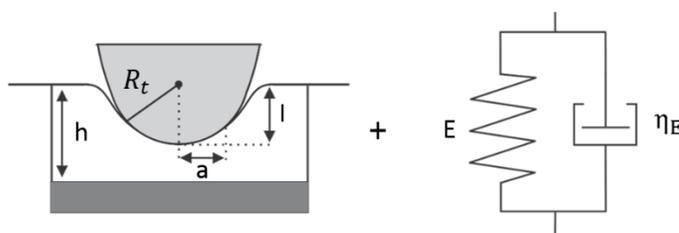


Fig. 4-3: Esquema de indentación de un sólido finito que sigue el modelo del Kelvin-Voigt, mediante una punta esférica.

Para calcular la fuerza en el caso de la esfera utilizaremos los coeficientes obtenidos en la ecuación 3-70. Por lo que la fuerza total viscoelástica para una muestra finita será

j	$\alpha(j)$	$\beta(j)$	E_j
0	$\frac{16}{9}R^{\frac{1}{2}}$	$\frac{3}{2}$	$\frac{16}{9}R^{\frac{1}{2}}I(t)^{\frac{1}{2}}\left[\frac{9}{2}\eta_G\dot{I}(t) + EI(t)\right]$
1	$1.133\frac{1}{h}\frac{16}{9}R$	2	$1.133\frac{1}{h}\frac{16}{9}RI(t)[6\eta_G\dot{I}(t) + EI(t)]$
2	$1.497\frac{1}{h^2}\frac{16}{9}R^{\frac{3}{2}}$	$\frac{5}{2}$	$1.497\frac{1}{h^2}\frac{16}{9}R^{\frac{3}{2}}I(t)^{\frac{3}{2}}\left[\frac{15}{2}\eta_G\dot{I}(t) + EI(t)\right]$
3	$1.469\frac{1}{h^3}\frac{16}{9}R^2$	3	$1.469\frac{1}{h^3}\frac{16}{9}R^2I(t)^2[9\eta_G\dot{I}(t) + EI(t)]$
4	$0.755\frac{1}{h^4}\frac{16}{9}R^{\frac{5}{2}}$	$\frac{7}{2}$	$0.755\frac{1}{h^4}\frac{16}{9}R^{\frac{5}{2}}I(t)^{\frac{5}{2}}\left[\frac{21}{2}\eta_G\dot{I}(t) + EI(t)\right]$
4.10			

En esta geometría vemos como el factor de corrección es proporcional a potencias de $\frac{\sqrt{RI}}{h}$. Pero de nuevo, recordando que (al menos al primer orden de corrección por el sustrato) $\sqrt{RI} \propto a$, la corrección sería proporcional a potencias de $\frac{a}{h}$. Es decir, en todas las geometrías estudiadas la corrección es proporcional al ratio entre el área de contacto y el grosor de la muestra.

4.3 Aplicación al modelo de SLS.

Sustituyendo la función de relajación en la ecuación general 4-5 obtenemos

$$F = \sum_{j=0}^N \alpha_j \int_0^t \left[E_1 + E_2 e^{-\frac{E_2}{\eta_E}(t-\tau)} \right] \frac{d[I^{\beta_j}]}{d\tau} d\tau \quad 4-11$$

En este caso tendremos que asumir una indentación lineal para poder realizar la integración, ya que no existe una solución genérica para cualquier tipo de indentación. Es decir, si $I = vt$ tenemos que

$$F = \sum_{j=0}^N \beta_j \alpha_j v^{\beta_j} \int_0^t \left[E_1 + E_2 e^{-\frac{E_2}{\eta_E}(t-\tau)} \right] \tau^{\beta_j-1} d\tau \quad 4-12$$

Esta integral tiene solución explícita:

$$F = \sum_{j=0}^N \beta_j \alpha_j v^{\beta_j} \left[\frac{t^{\beta_j} E_1}{\beta_j} + e_2 e^{\frac{t E_2}{\eta_E}} \left(\Gamma[\beta_j, \frac{t E_2}{\eta_E}] - \Gamma[\beta_j] \right) \left(\frac{E_2}{\eta_E} \right)^{-\beta_j} \right] = \sum_{j=0}^N F_j \quad 4-13$$

La función gamma incompleta $\Gamma[x, y]$ se encuentra convenientemente tabulada y estudiada en la bibliografía.

Vamos a detallar las formas explícitas de la ecuación 4-13 cuando nos encontramos ante el caso de una célula incompresible y fijada perfectamente al sustrato.

Cilindro

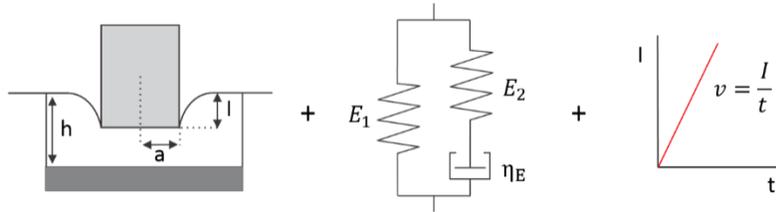


Fig. 4-4: Esquema de indentación a velocidad constante de un sólido finito que sigue el modelo del SLS, mediante una punta cilíndrica.

En este caso los coeficientes β_j son todos igual a 1 (ver fórmula 3-60), por lo que la ecuación 4-12 se transforma en

$$F = v \int_0^t \left[E_1 + E_2 e^{-\frac{E_2}{\eta_E}(t-\tau)} \right] d\tau \sum_{j=0}^N \alpha_j \quad 4-14$$

Donde los α_j son los tabulados en el capítulo 3 para el problema del sustrato elástico. Resolviendo la integral obtenemos que

$$F = v \frac{8a}{3} \left[E_1 t + \eta_E \left(1 - e^{-\frac{E_2}{\eta_E} t} \right) \right] \left[1 + \frac{1.133a}{h} + \frac{1.283a^2}{h^2} + \frac{0.598a^3}{h^3} - \frac{0.291a^4}{h^4} \right] \quad 4-15$$

Podemos ver cómo, de nuevo, la corrección es proporcional a potencias del factor $\frac{a}{h}$.

Para el cono y la esfera las soluciones tendrán una estructura semejante. Dada la complejidad de las ecuaciones obtenidas, expresaremos los términos F_j de la soluciones en forma de tabla.

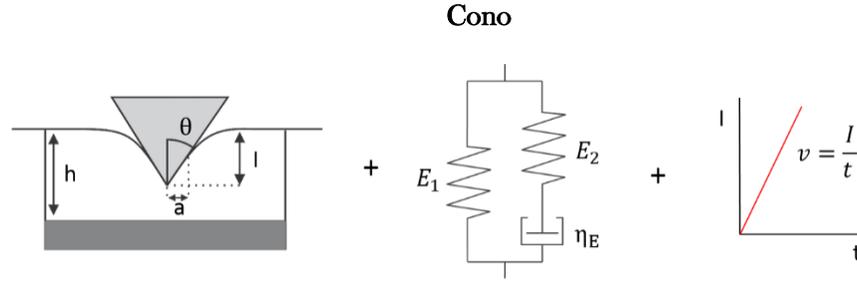


Fig. 4-5: Esquema de indentación a velocidad constante de un sólido finito que sigue el modelo del SLS, mediante una punta cónica.

j	$\alpha(j)$	$\beta(j)$	F_j
0	$\frac{8 \tan \theta}{3\pi}$	2	$\frac{8 \tan(\theta)}{3\pi} 2v^2 \left[\frac{t^2 E_1}{2} + \frac{e^{-\frac{tE_2}{\eta_E}} \eta_E^2 (1 - \Gamma[2, -\frac{tE_2}{\eta_E}])}{E_2} \right]$
1	$0.721 \frac{8 \tan^2 \theta}{3h\pi}$	3	$0.721 \frac{8 \tan^2 \theta}{3h\pi} 3v^3 \left[\frac{t^3 E_1}{3} + \frac{e^{-\frac{tE_2}{\eta_E}} \eta_E^3 (2 - \Gamma[3, -\frac{tE_2}{\eta_E}])}{E_2^2} \right]$
2	$0.650 \frac{8 \tan^3 \theta}{3h^2\pi}$	4	$0.650 \frac{8 \tan^3 \theta}{3h^2\pi} 4v^4 \left[\frac{t^4 E_1}{4} + \frac{e^{-\frac{tE_2}{\eta_E}} \eta_E^4 (6 - \Gamma[4, -\frac{tE_2}{\eta_E}])}{E_2^3} \right]$
3	$0.491 \frac{8 \tan^4 \theta}{3h^3\pi}$	5	$0.491 \frac{8 \tan^4 \theta}{3h^3\pi} 5v^5 \left[\frac{t^5 E_1}{5} + \frac{e^{-\frac{tE_2}{\eta_E}} \eta_E^5 (24 - \Gamma[5, -\frac{tE_2}{\eta_E}])}{E_2^4} \right]$
4	$0.225 \frac{8 \tan^5 \theta}{3h^4\pi}$	6	$0.225 \frac{8 \tan^5 \theta}{3h^4\pi} 6v^6 \left[\frac{t^6 E_1}{6} + \frac{e^{-\frac{tE_2}{\eta_E}} \eta_E^6 (120 - \Gamma[6, -\frac{tE_2}{\eta_E}])}{E_2^5} \right]$

4-16

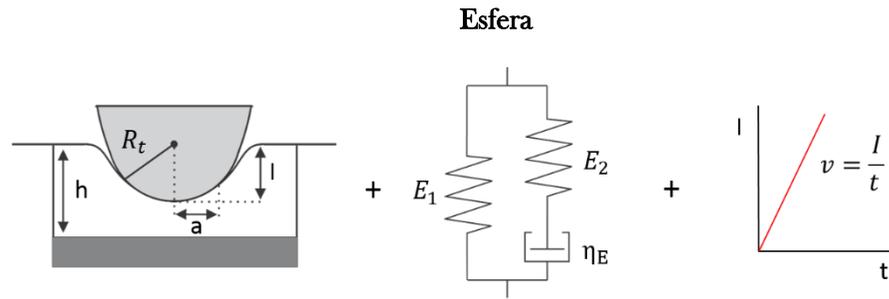


Fig. 4-6: Esquema de indentación a velocidad constante de un sólido finito que sigue el modelo del SLS, mediante una punta esférica.

j	$\alpha(j)$	$\beta(j)$	F_j
0	$\frac{16}{9} R^{\frac{1}{2}}$	$\frac{3}{2}$	$\frac{16}{9} R^{\frac{1}{2}} \left[\frac{2}{3} t^{3/2} E_1 + \frac{e^{-\frac{tE_2}{\eta_E}} \left(\frac{\sqrt{\pi}}{2} - \Gamma\left[\frac{3}{2}, -\frac{tE_2}{\eta_E}\right] \right) E_2}{\left(-\frac{E_2}{\eta_E}\right)^{3/2}} \right]$
1	$1.133 \frac{1}{h} \frac{16}{9} R$	2	$1.133 \frac{1}{h} \frac{16}{9} R \left[\frac{t^2 E_1}{2} + \frac{e^{-\frac{tE_2}{\eta_E}} \eta_E^2 (1 - \Gamma[2, -\frac{tE_2}{\eta_E}])}{E_2} \right]$
2	$1.497 \frac{1}{h^2} \frac{16}{9} R^{\frac{3}{2}}$	$\frac{5}{2}$	$1.497 \frac{1}{h^2} \frac{16}{9} R^{\frac{3}{2}} \left[\frac{2}{5} t^{5/2} E_1 + \frac{e^{-\frac{tE_2}{\eta_E}} \left(\frac{3\sqrt{\pi}}{4} - \Gamma\left[\frac{5}{2}, -\frac{tE_2}{\eta_E}\right] \right) E_2}{\left(-\frac{E_2}{\eta_E}\right)^{5/2}} \right]$
3	$1.469 \frac{1}{h^3} \frac{16}{9} R^2$	3	$1.469 \frac{1}{h^3} \frac{16}{9} R^2 \left[\frac{t^3 E_1}{3} - \frac{e^{-\frac{tE_2}{\eta_E}} \eta_E^3 (2 - \Gamma[3, -\frac{tE_2}{\eta_E}])}{E_2^2} \right]$
4	$0.755 \frac{1}{h^4} \frac{16}{9} R^{\frac{5}{2}}$	$\frac{7}{2}$	$0.755 \frac{1}{h^4} \frac{16}{9} R^{\frac{5}{2}} \left[\frac{2}{7} t^{7/2} E_1 + \frac{e^{-\frac{tE_2}{\eta_E}} \left(\frac{15\sqrt{\pi}}{8} - \Gamma\left[\frac{7}{2}, -\frac{tE_2}{\eta_E}\right] \right) E_2}{\left(-\frac{E_2}{\eta_E}\right)^{7/2}} \right]$

4-17

4.4 Aplicación al modelo de Power-law.

En este caso los términos integrales a resolver serán

$$F = \sum_{j=0}^N \alpha_j \int_0^t \left[E_0 \left(\frac{t-\tau}{t_0} \right)^{-\gamma} \right] \frac{d[I^{\beta_j}]}{d\tau} d\tau \quad 4-18$$

De la misma forma que con el modelo SLS, asumiremos que la indentación es lineal con el tiempo (velocidad constante), obteniendo el siguiente sumatorio de integrales

$$F = \sum_{j=0}^N \beta_j \alpha_j v^{\beta_j} \int_0^t \left[E_0 \left(\frac{t-\tau}{t_0} \right)^{-\gamma} \right] \tau^{\beta_j-1} d\tau \quad 4-19$$

Tenemos la suerte de que existe una solución general a las integrales de este tipo, por lo que la solución general para este modelo estará dada por

$$F = \sum_{j=0}^N \beta_j \alpha_j v^{\beta_j} \frac{E_0 t^{\beta_j-\gamma} \Gamma[\beta_j] \Gamma[1-\gamma]}{t_0^{-\gamma} \Gamma[1+\beta_j-\gamma]} \quad 4-20$$

Reordenando términos obtenemos una expresión más conveniente

$$F = \sum_{j=0}^N \beta_j \alpha_j E_0 I^{\beta_j} \left(\frac{t}{t_0} \right)^{-\gamma} \frac{\Gamma[\beta_j] \Gamma[1-\gamma]}{\Gamma[1+\beta_j-\gamma]} = \sum_{j=0}^N F_j \quad 4-21$$

La cual depende directamente de la indentación (aunque sigue multiplicado por una Power-law temporal). De nuevo, proporcionaremos las soluciones explícitas para las diferentes geometrías, como referencia.

Cilindro

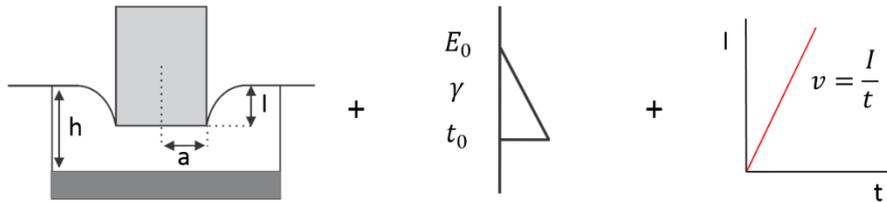


Fig. 4-7: Esquema de indentación a velocidad constante de un sólido finito que sigue el modelo Power-law, mediante una punta cilíndrica.

En este caso los coeficientes β_j son todos igual a 1 (ver fórmula 2-6), por lo que la ecuación 4-6 se transforma en

$$F = \sum_{j=0}^N \alpha_j v \frac{E_0}{t_0^{-\gamma}} \frac{t^{1-\gamma} \Gamma[1] \Gamma[1-\gamma]}{\Gamma[2-\gamma]} = \frac{2a}{(1-\nu^2)} \frac{E_0 v}{(-\gamma+1)} \frac{t^{-\gamma+1}}{t_0^{-\gamma}} \sum_{j=0}^N \alpha_j \quad 4-22$$

Donde los α_j son los tabulados en el capítulo 3 para el problema del sustrato elástico. Resolviendo la integral obtenemos que

$$F = \frac{8a}{3} \frac{E_0 v}{(-\gamma+1)} \frac{t^{-\gamma+1}}{t_0^{-\gamma}} \left[1 + \frac{1.133a}{h} + \frac{1.283a^2}{h^2} + \frac{0.598a^3}{h^3} - \frac{0.291a^4}{h^4} \right] \quad 4-23$$

Cono

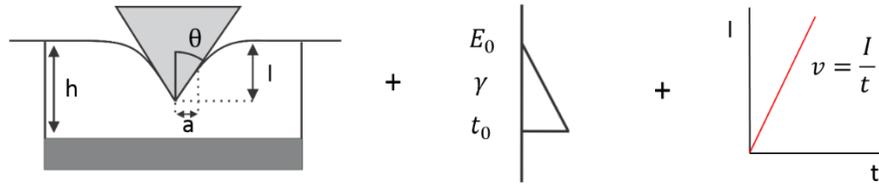


Fig. 4-8: Esquema de indentación a velocidad constante de un sólido finito que sigue el modelo Power-law, mediante una punta cónica.

En el caso del cono vamos a representar cada uno de los sumandos la fórmula 4-21 en forma de tabla, para facilitar la lectura. De esta forma la fuerza sería

j	$\alpha(j)$	$\beta(j)$	F_j
0	$\frac{8 \tan \theta}{3\pi}$	2	$\frac{8 \tan(\theta)}{3\pi} 2I^2 \left(\frac{t}{t_0}\right)^{-\gamma} \frac{\Gamma[2]\Gamma[1-\gamma]}{\Gamma[3-\gamma]}$
1	$0.721 \frac{8 \tan^2 \theta}{3h\pi}$	3	$0.721 \frac{8 \tan^2 \theta}{3h\pi} 3I^3 \left(\frac{t}{t_0}\right)^{-\gamma} \frac{\Gamma[3]\Gamma[1-\gamma]}{\Gamma[4-\gamma]}$
2	$0.650 \frac{8 \tan^3 \theta}{3h^2\pi}$	4	$0.650 \frac{8 \tan^3 \theta}{3h^2\pi} 4I^4 \left(\frac{t}{t_0}\right)^{-\gamma} \frac{\Gamma[4]\Gamma[1-\gamma]}{\Gamma[5-\gamma]}$
3	$0.491 \frac{8 \tan^4 \theta}{3h^3\pi}$	5	$0.491 \frac{8 \tan^4 \theta}{3h^3\pi} 5I^5 \left(\frac{t}{t_0}\right)^{-\gamma} \frac{\Gamma[5]\Gamma[1-\gamma]}{\Gamma[6-\gamma]}$
4	$0.225 \frac{8 \tan^5 \theta}{3h^4\pi}$	6	$0.225 \frac{8 \tan^5 \theta}{3h^4\pi} 6I^6 \left(\frac{t}{t_0}\right)^{-\gamma} \frac{\Gamma[6]\Gamma[1-\gamma]}{\Gamma[7-\gamma]}$
4.24			

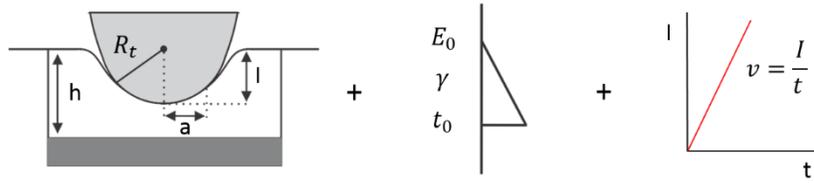


Fig. 4-9: Esquema de indentación a velocidad constante de un sólido finito que sigue el modelo Power-law, mediante una punta cónica.

En el caso del cono vamos a representar cada uno de los sumandos la fórmula 4-6 en forma de tabla, para facilitar la lectura. De esta forma la fuerza sería

j	$\alpha(j)$	$\beta(j)$	F
0	$\frac{16}{9} R^{\frac{1}{2}}$	$\frac{3}{2}$	$\frac{16}{9} R^{\frac{1}{2}} \frac{3}{2} E_0 I^{\frac{3}{2}} \left(\frac{t}{t_0}\right)^{-\gamma} \frac{\Gamma[\frac{3}{2}] \Gamma[1-\gamma]}{\Gamma[1+\frac{3}{2}-\gamma]}$
1	$1.133 \frac{1}{h} \frac{16}{9} R$	2	$1.133 \frac{1}{h} \frac{16}{9} R^2 E_0 I^2 \left(\frac{t}{t_0}\right)^{-\gamma} \frac{\Gamma[2] \Gamma[1-\gamma]}{\Gamma[1+2-\gamma]}$
2	$1.497 \frac{1}{h^2} \frac{16}{9} R^{\frac{3}{2}}$	$\frac{5}{2}$	$1.497 \frac{1}{h^2} \frac{16}{9} R^{\frac{3}{2}} \frac{5}{2} E_0 I^{\frac{5}{2}} \left(\frac{t}{t_0}\right)^{-\gamma} \frac{\Gamma[\frac{5}{2}] \Gamma[1-\gamma]}{\Gamma[1+\frac{5}{2}-\gamma]}$
3	$1.469 \frac{1}{h^3} \frac{16}{9} R^2$	3	$1.469 \frac{1}{h^3} \frac{16}{9} R^2 3 E_0 I^3 \left(\frac{t}{t_0}\right)^{-\gamma} \frac{\Gamma[3] \Gamma[1-\gamma]}{\Gamma[1+3-\gamma]}$
4	$0.755 \frac{1}{h^4} \frac{16}{9} R^{\frac{5}{2}}$	$\frac{7}{2}$	$0.755 \frac{1}{h^4} \frac{16}{9} R^{\frac{5}{2}} \frac{7}{2} E_0 I^{\frac{7}{2}} \left(\frac{t}{t_0}\right)^{-\gamma} \frac{\Gamma[\frac{7}{2}] \Gamma[1-\gamma]}{\Gamma[1+\frac{7}{2}-\gamma]}$
			4.25

Recordemos que, para este modelo, en el caso límite $\gamma = 0$ tendremos la solución para un sólido puramente elástico. Se puede comprobar que las expresiones obtenidas en este capítulo coinciden, para dicho límite, con las dadas en el capítulo 3 para el problema de la muestra finita elástica.

Una vez derivadas las expresiones teóricas, vamos a estudiarlas numéricamente. Analizaremos tanto la convergencia según aumentamos el número de términos de la corrección, como su comportamiento al variar el grosor de la muestra. Finalmente compararemos dichos resultados con las simulaciones de elementos finitos. Por simplicidad estudiaremos solo el modelo de Kelvin-Voigt para las tres geometrías (ecuaciones 4-8, 4-9 y 4-10).

Convergencia al variar el número de términos

De la misma forma que en el caso elástico, la fuerza está dada por un sumatorio de términos, cada uno de los cuales es una corrección aun orden superior (ecuación 4-7). Podemos definir la fuerza total a un orden de corrección k como la suma de los términos hasta el orden n :

$$F_n^T = \sum_{j=0}^n \alpha_j I(t)^{\beta_j - 1} [3\beta_j \eta_G \dot{I}(t) + EI(t)] = \sum_{j=0}^n F_j \quad 4-26$$

Para cierto grosor de la muestra e indentación máxima, esperaríamos que los términos F_n^T convergieran, es decir, que la diferencia $F_n^T - F_{n-1}^T$ fuera disminuyendo según aumentamos n . Vamos a comprobarlo

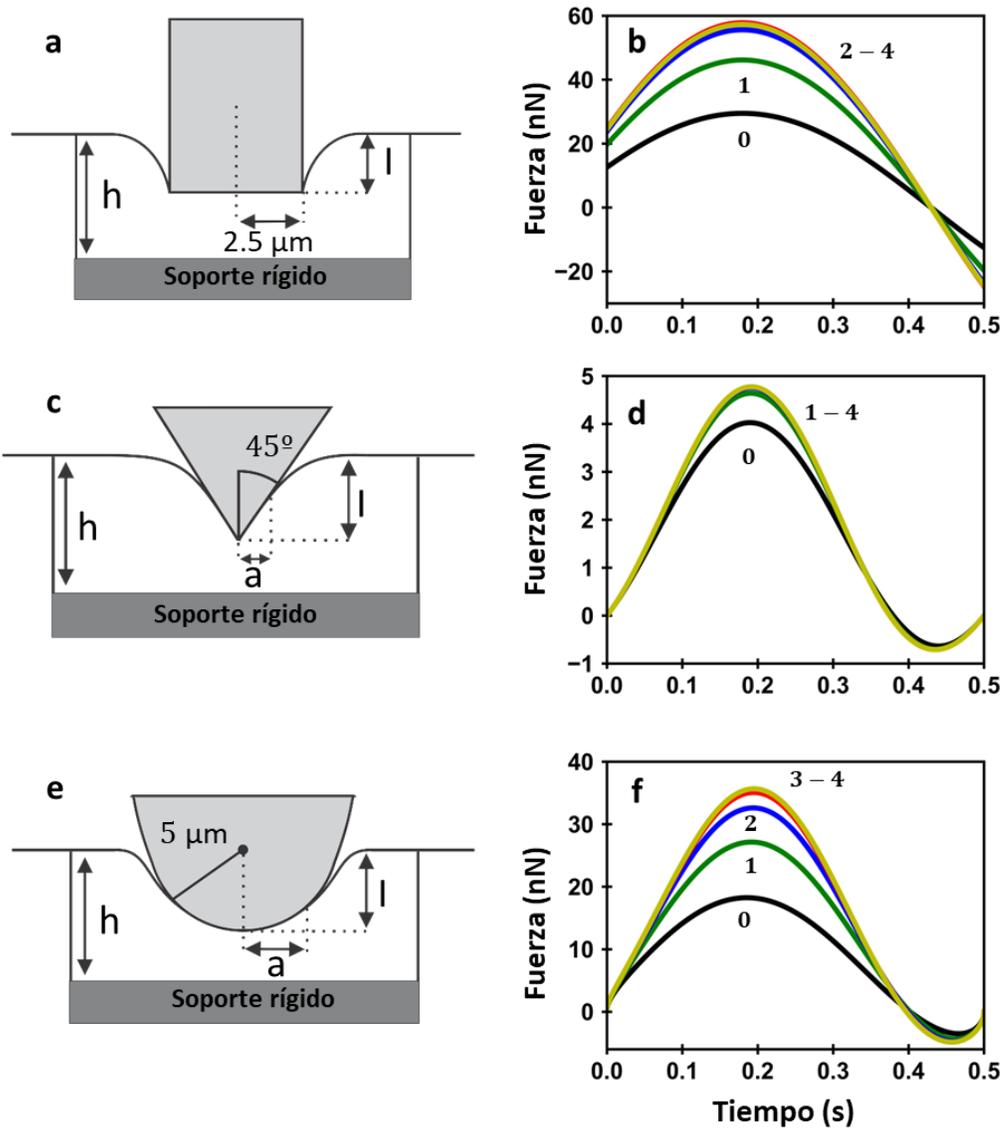


Fig. 4-10: Fuerzas para una muestra finita elástica en función del número de términos de corrección n (F_n^T). Esquema (a) y fuerzas en función del tiempo (b) para un cilindro, $R = 2.5 \mu\text{m}$. Esquema (c) y fuerzas en función de la penetración (d) para un cono, $\theta = 45^\circ$. Esquema (e) y fuerzas en función de la penetración (l) para un esfera, $R = 5 \mu\text{m}$. Muestra, $E = 4 \text{ kPa}$, $\eta_G = 100 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ $h = 5 \mu\text{m}$.

En la figura 4-10 podemos ver cómo evolucionan las fuerzas parciales F_n^T , para el caso de una indentación sinusoidal. Los 3 esquemas de indentación estudiados (paneles a, c y e) corresponden con las tres geometrías de punta más comunes. Como se puede ver, las fuerzas en función del tiempo F_n^T (paneles b, d y f) convergen cuando n alcanza el valor de 3 para las tres geometrías usadas. Es decir, el valor de la diferencia $F_4^T - F_3^T$ es muy pequeño, por lo que hemos llegado a una solución estable para los casos estudiados.

Hemos visto que en todas las geometrías, la fuerza depende del inverso del grosor de la muestra h , por lo que vamos a estudiar la evolución de diferentes curvas de fuerza cuando variamos el grosor.

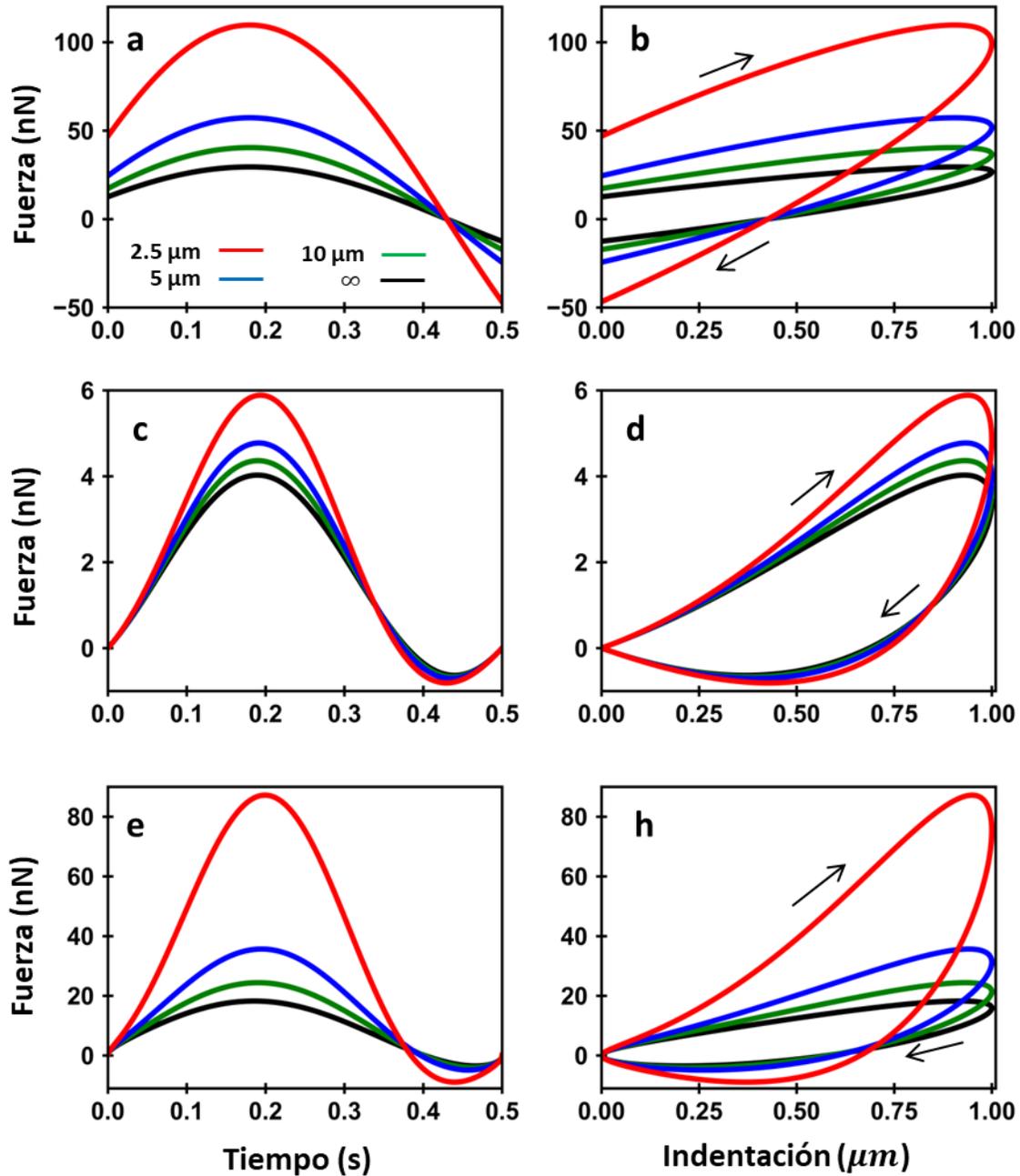


Fig. 4-11: Fuerzas para una muestra finita elástica en función del grosor. Fuerzas en función del tiempo (a) y en función de la indentación (b) para un cilindro, $R = 2.5 \mu\text{m}$. Fuerzas en función del tiempo (c) y en función de la indentación (d) para un cono, $\theta = 45^\circ$. Fuerzas en función de la tiempo (e) y en función de la indentación (h) para una esfera, $R = 5 \mu\text{m}$. Muestra, $E = 4 \text{ kPa}$, $\eta_G = 100 \text{ Pa} \cdot \text{s}$, $h = \text{variable}$.

En la figura 4-11 representamos la fuerza para diferentes geometrías, cuando la indentación es sinusoidal. Las geometrías a usar serán de nuevo el cilindro el cono y la esfera. La fuerza en función del tiempo (paneles a, c y e) es asimétrica, debido a la viscosidad. Este mismo efecto de la viscosidad se puede ver en las curvas en función de la indentación (paneles d, d y f), donde el efecto de la viscosidad se puede ver en la histéresis entre las curvas de ida y las de vuelta. Es interesante notar que esta histéresis se hace mayor cuanto más fina es la muestra, es decir, la energía absorbida en un ciclo depende del grosor de la muestra.

La fuerza máxima aumenta con la disminución del grosor, como habíamos visto en el caso elástico (capítulo 3). Debido a la combinación entre viscosidad y elasticidad, el pico de fuerza máxima no coincide con la máxima indentación, como veremos en más detalle en las simulaciones FEM.

Comparación FEM-teoría

Para comprobar si las fórmulas que hemos derivado en las secciones anteriores son correctas, vamos a realizar unas simulaciones con FEM. La idea es obtener curvas fuerza-indentación y comprarlas con las que predicen nuestras ecuaciones (4-8, 4-9 y 4-10).

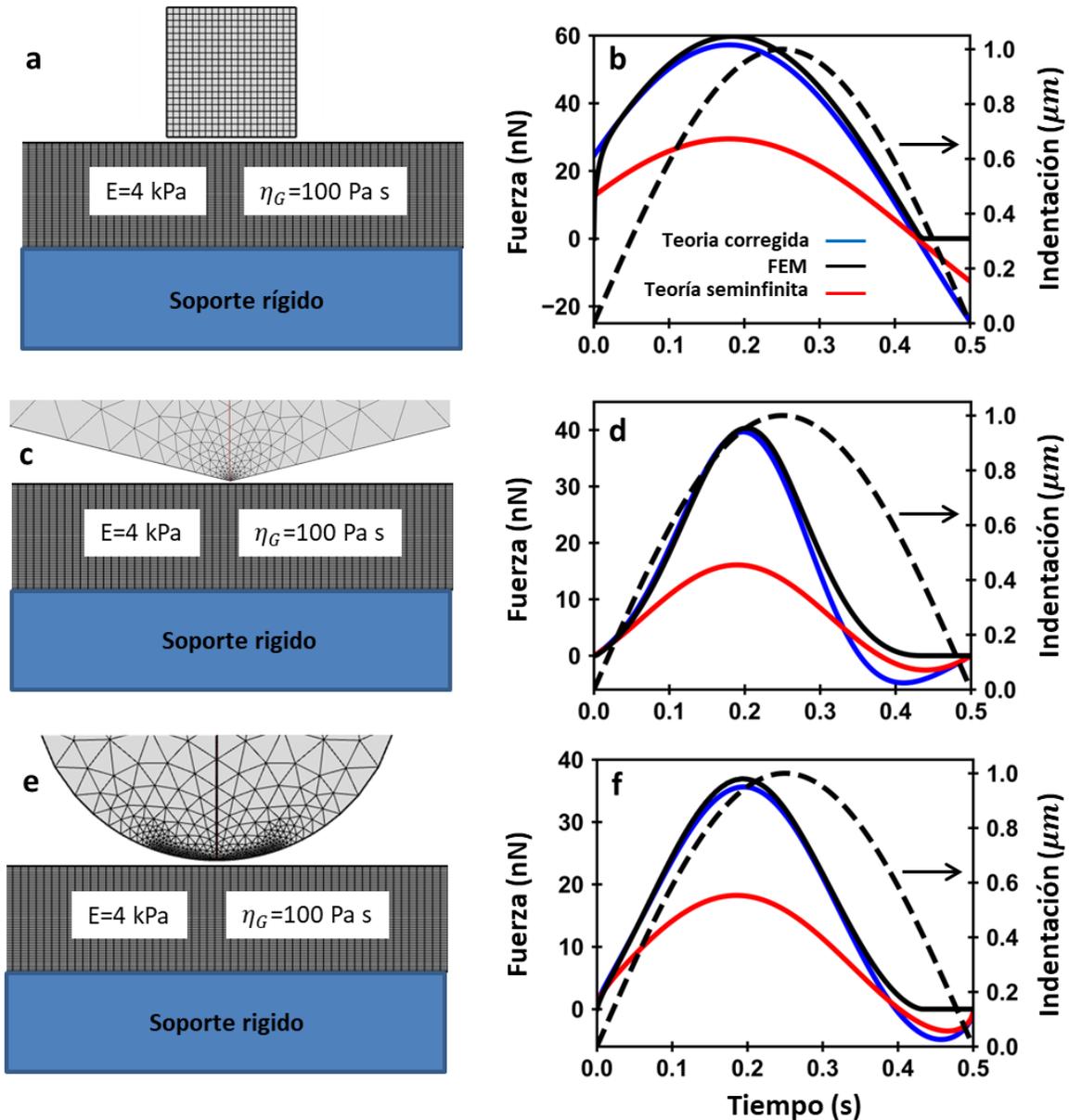


Fig. 4-12: Esquema de simulación y fuerzas calculados para una muestra finita viscoelástica. Esquema de la simulación FEM (a) y fuerzas en función de la penetración (b) para un cilindro, $R = 2.5 \mu\text{m}$. Esquema de la simulación FEM (c) y fuerzas en función de la penetración (d) para un cono, $\theta = 75^\circ$. Esquema de la simulación FEM (e) y fuerzas en función de la penetración (f) para una esfera, $R = 5 \mu\text{m}$. Muestra, $E = 4 \text{ kPa}$, $\eta_G = 100 \text{ Pa s}$, $h = 5 \mu\text{m}$.

En la figura 4-12 podemos tener dicha comparación. Los esquemas de simulación (paneles a, c y e) serán muy similares a los utilizados en el capítulo anterior, solo que esta vez añadiremos viscosidad a la muestra. Las curvas de fuerza teóricas predicen bastante bien las curvas obtenidas en la simulación, aunque podemos ver un ligero error en dos zonas. La primera es en la zona de fuerza pico, donde simulación y teoría divergen ligeramente. Esto es debido a que, cuanto mayor es la indentación, mayores son los errores que hemos cometido en todas las aproximaciones que hemos

utilizado en la teoría. Es decir, podemos esperar que si aumentamos aún más al indentación, esta divergencia se haga aún mayor. Aun así, para las profundidades y grosores de muestra simulados, la correlación es bastante buena. Por otro lado, en la vuelta volvemos a ver una clara separación entre la teoría y la simulación. Esto como ya vimos en el capítulo 2, es debido a que en la vuelta tendremos un desacople entre la punta y la muestra, que no está contemplado en la teoría. En el siguiente capítulo intentaremos dar una solución a dicho problema.

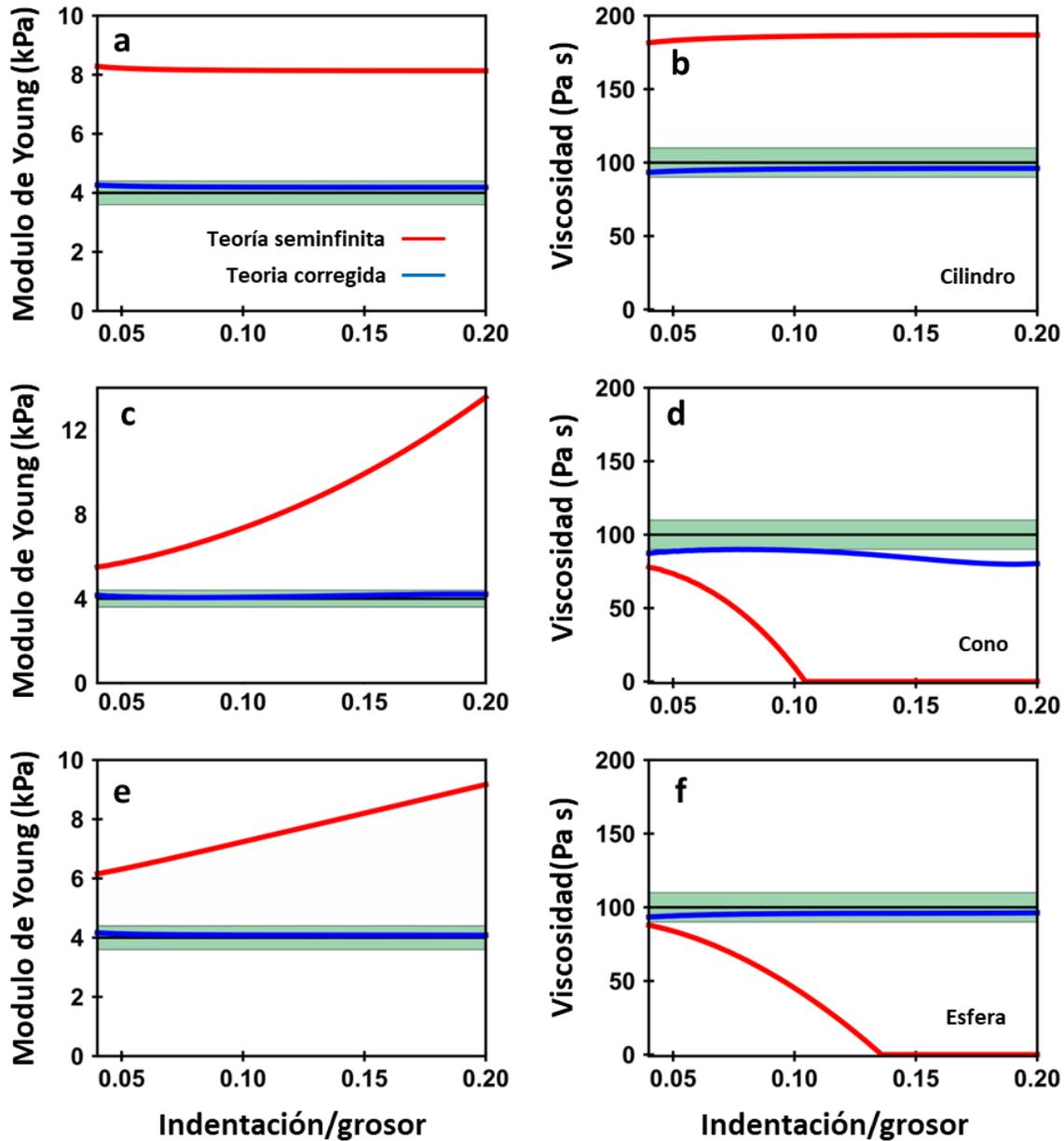


Fig. 4-13: Parámetros viscoelásticos calculados para una muestra finita elástica. Módulos de Young (a) y viscosidades (b) calculadas para un cilindro, $R = 2.5 \mu\text{m}$. Módulos de Young (c) y viscosidades (d) calculadas para un cono, $\theta = 75^\circ$. Módulos de Young (e) y viscosidades (f) calculadas para una esfera, $R = 5 \mu\text{m}$. Muestra, $E = 4 \text{ kPa}$, $\eta_G = 100 \text{ Pa s}$, $h = 5 \mu\text{m}$.

Dado que nuestro objetivo al realizar medidas con AFM es obtener los valores de los parámetros, vamos a realizar un ajuste numérico de las curvas obtenidas con FEM. En la figura 4-13 podemos ver los valores obtenidos tanto para el modelo de Young como para la viscosidad. Dado que no hemos resuelto el problema de la vuelta, estos valores los hemos obtenido ajustando solo las curvas de ida. Se puede ver, para todas las geometrías, que al intentar ajustar los datos experimentales con las ecuaciones de Sneddon (es decir, sin tener en cuenta el efecto del sustrato, curvas rojas en la gráfica) los valores para los parámetros se alejan de los usados en la simulación (región verde). Sin embargo, al realizar el ajuste con nuestras ecuaciones obtenemos los valores esperados con mayor precisión (curvas azules). Esto se cumple, con algunas diferencias, en todas las geometrías estudiadas, tanto para el módulo de Young como para la viscosidad.

4.6 Conclusiones

En este capítulo hemos obtenido una solución completa al problema de la indentación de un medio viscoelástico de grosor finito. Combinando la hipótesis de Lee y Radok (estudiada y explorada en el capítulo 2) con las soluciones elásticas par un medio finito obtenidas en el capítulo 3, hemos obtenido soluciones analíticas para diferentes geometrías de la punta y modelos viscoelásticos. Las soluciones coinciden muy bien con los resultados numéricos de las simulaciones FEM, lo que nos da confianza en la teoría. Podemos decir que con ayuda de la teoría desarrollada, somos capaces de extraer las propiedades viscoelásticas de la célula en cualquier posición de la misma, independientemente del grosor de la misma y del modelo viscoelástico a utilizar.

Sin embargo, todas las soluciones viscoelásticas obtenidas (tanto en este capítulo, como en el capítulo 2) adolecen de un problema de base: Solo son válidas en la ida de la curva de indentaciones. Esto es debido a una limitación en la hipótesis de Lee y Radok (desde el punto de vista teórico), que se puede interpretar como la incapacidad de una muestra viscoelástica de responder rápidamente a la retirada de la punta, desacoplándose de la misma. En el siguiente capítulo vamos a intentar lidiar con esta dificultad.

5. El Problema del área de contacto

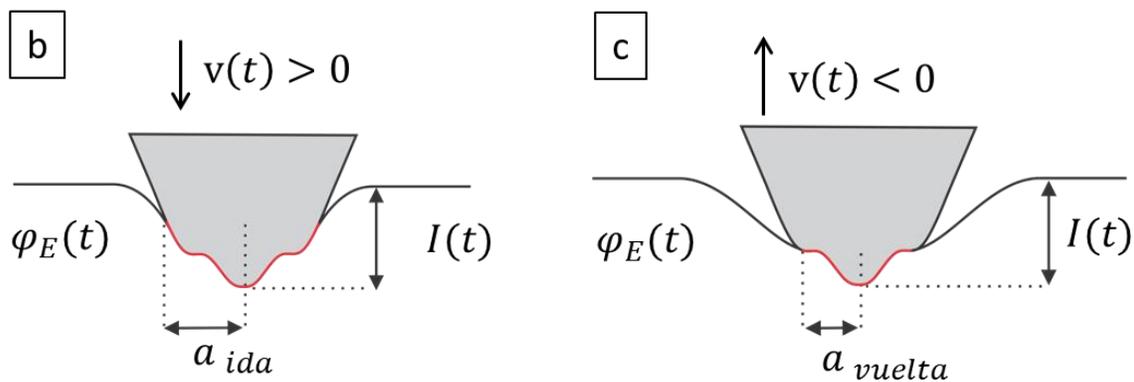
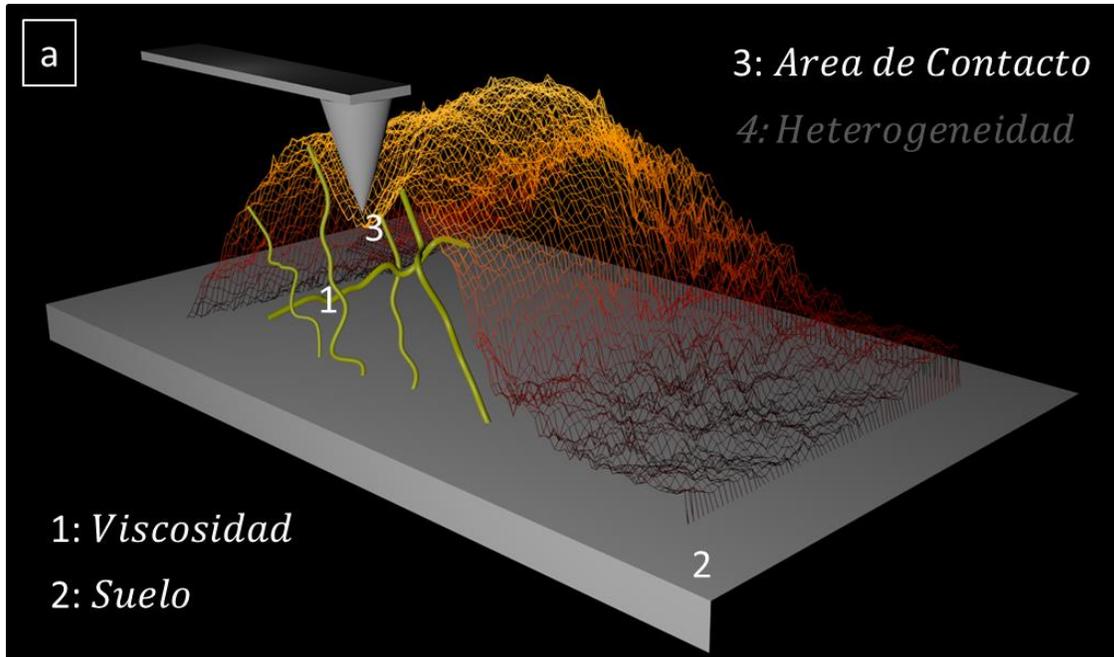


Fig. 5-0: (a) En este capítulo analizaremos como las fuerzas dependerán del área de contacto a la ida y a la vuelta, que a su vez dependerá de la respuesta del material y del efecto del sustrato.. Esquema del sistema punta-muestra, donde vemos que el área de contacto varía (a la misma indentación) para la ida (b) y para la vuelta (c).

5.0 Introducción

Todas las soluciones viscoelásticas que hemos obtenido hasta ahora (tanto en el caso infinito, capítulo 2, como teniendo en cuenta el efecto del sustrato, capítulo 4) son solo válidas en la ida, antes de alcanzar el máximo de indentación. Esto es debido a que, aunque la solución dada por Lee y Radok es formalmente válida a la vuelta, predice tensiones negativas en algunos puntos del área de

contacto[125]. Dado que estamos asumiendo que no existen fuerzas atractivas en nuestro experimento real, esta solución no es válida para describir los datos experimentales. Antes de proceder al tratamiento analítico del problema, vamos a explorarlo un poco mejor mediante simulaciones de elementos finitos.

5.1 Desacople punta-muestra

Si simulamos mediante FEM tanto la ida como la vuelta de la indentación producida por una punta esférica sobre una muestra viscoelástica (sin fuerzas de adhesión), podemos ver como en la vuelta el indentador se desacopla de la muestra.

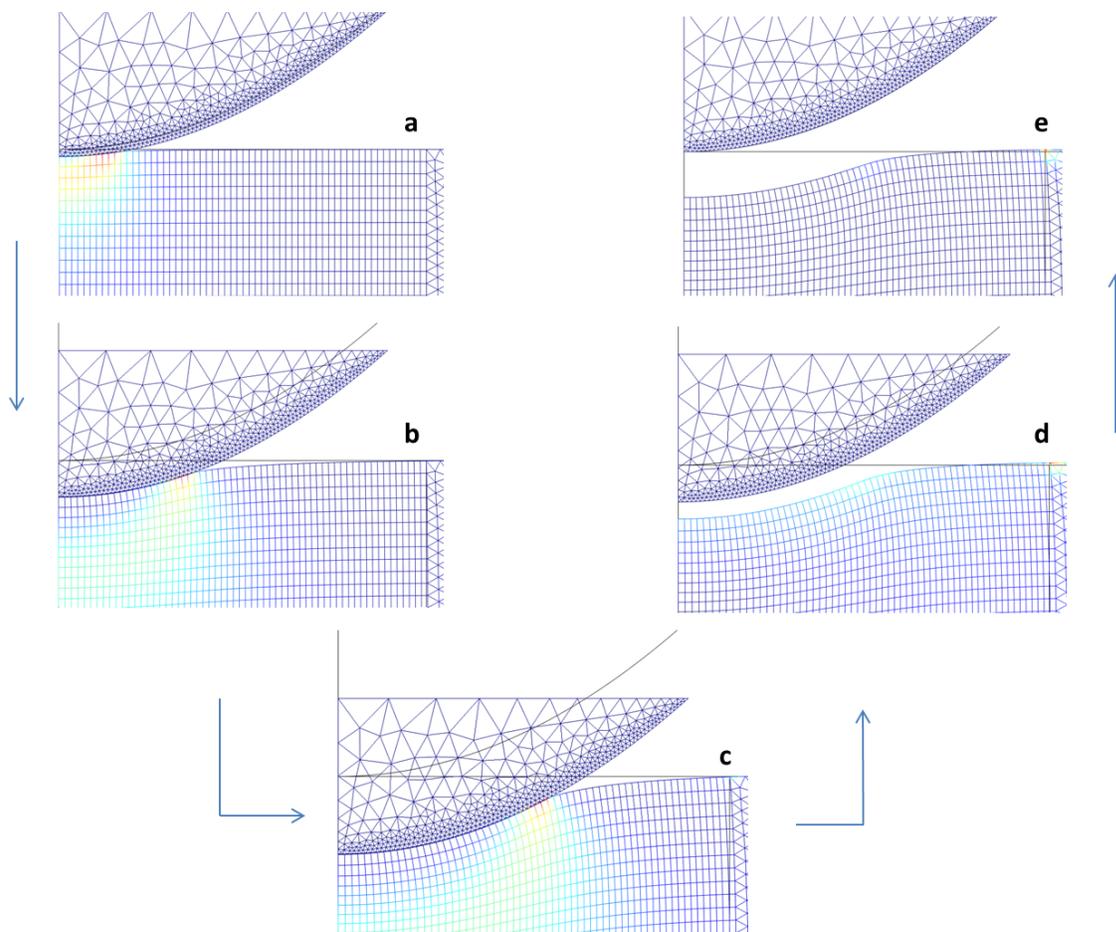


Fig. 5-1: Simulación del contacto durante un ciclo completo. (a) y (b) tienen las mismas indentaciones que (e) y (d), pero velocidad opuesta. (c) Corresponde a la máxima indentación, donde la velocidad es cero. , $R = 5 \mu\text{m}$. Muestra, $E = 4 \text{ kPa}$, $\eta_G = 500 \text{ Pa} \cdot \text{s}$

En la figura 5-1 podemos ver los resultados de una esfera indentando una muestra viscoelástica (la cual tiene una viscosidad gigantesca, de $500 \text{ Pa} \cdot \text{s}$, para amplificar el efecto que queremos mostrar).

En la fase de ida de la indentación (cuando la velocidad es positiva, es decir, cuando la indentación aumenta con el tiempo), la esfera y la muestra se mantienen en contacto (paneles a y b). Durante este periodo, todas las fórmulas que hemos desarrollado en los capítulos 2 y 4 son válidas, hasta que alcancemos la máxima indentación (panel c), donde la velocidad es exactamente igual a cero. Sin embargo, en la fase de vuelta (donde la velocidad es negativa), vemos que la punta se despegue de la muestra (paneles d y e). Esta desacople es debido a que la muestra no es capaz de “seguir” a la punta, ya que esta se retira muy rápido. Esto es algo que no tuvimos en cuenta en nuestro análisis de la viscoelasticidad en los capítulos anteriores. Vamos a ver cómo se ha solucionado este problema en la bibliografía.

5.2 Solución de Ting

Ting [124] estudió la solución al problema de la fuerza para la vuelta, encontrando una solución interesante. Recordemos que para la ida (cuando $t < t_{max}$, siendo t_{max} el tiempo al cual alcanzamos la máxima indentación), la fuerza en función de la indentación para una muestra infinita estaba dado por

$$F(t) = \alpha \int_0^t \varphi_E(t-t') \frac{d}{dt'} (I(t')^\beta) dt' \quad t < t_{max} \quad 5-1$$

Donde los coeficientes dependían de los detalles del problema en particular (ecuaciones 3-60, 3-65, 3-70). Cuando nos encontramos en la vuelta ($t > t_{max}$), la solución dada por Ting es similar

$$F(t) = \alpha \int_0^{t_1(t)} \varphi_E(t-t') \frac{d}{dt'} (I(t')^\beta) dt' \quad t > t_{max} \quad 5-2$$

Las formulas 5-1 y 5-2 son exactamente las mismas excepto por el límite superior de integración, que en el caso de la vuelta es una función $t_1(t)$. Esta función indica el tiempo t_1 para el cual el área de contacto era exactamente igual al área en el momento actual t . Es decir, durante la vuelta, la fuerza medida en cierto instante t está relacionada con la fuerza medida a la ida en cierto instante t_1 , bajo la condición de que en t y en t_1 el área de contacto sea la misma. Es más, el radio del área de contacto estará dada por

$$\begin{aligned} a(t) &= \gamma I(t)^\theta & t < t_{max} \\ a(t) &= \gamma I(t_1(t))^\theta & t > t_{max} \end{aligned} \quad 5-3$$

Donde γ y θ son los coeficientes que describen el radio del área de contacto en función de la geometría, dados en el capítulo 2 (ecuación 2-23).

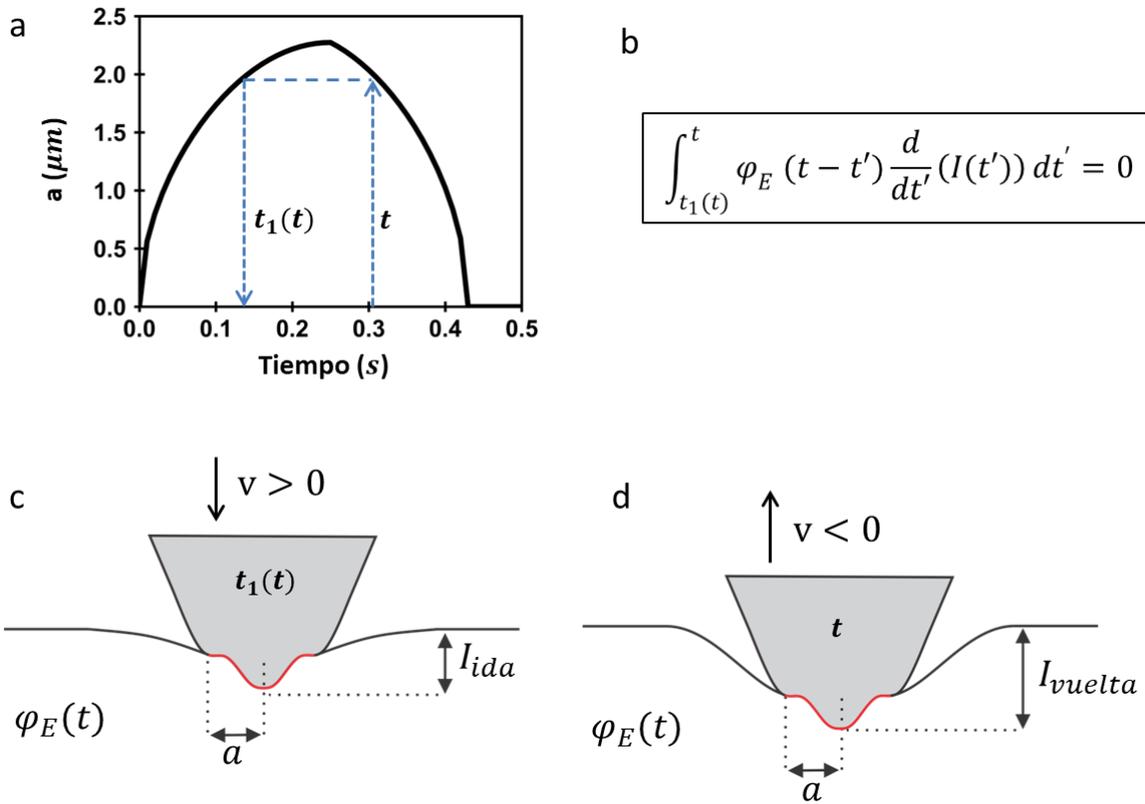


Fig. 5-2: Cálculo de la fuerza a la vuelta. (a) La función $t_1(t)$ indica el tiempo al cual el área de contacto fue igual a la actual en tiempo t . (b) Esta función se obtiene al resolver la condición dada por Ting. (c) y (d) Estados de la indentación en los tiempos $t_1(t)$ (ida) y t (vuelta), que tienen la misma área de contacto pero distinto valor de la indentación.

La condición que nos permite obtener $t_1(t)$ es [124]

$$\int_{t_1(t)}^t \varphi_E(t-t') \frac{d}{dt'}(I(t')) dt' = 0 \quad 5-4$$

Dado que podemos tener discontinuidades de velocidad al llegar a la indentación máxima (por ejemplo en el caso de una indentación triangular, donde la velocidad cambia de signo en la ida y en la vuelta), es útil dividir la integral 5-4 en dos tramos

$$\int_{t_1(t)}^{t_{max}} \varphi_E(t-t') \frac{d}{dt'}(I(t')) dt' + \int_{t_{max}}^t \varphi_E(t-t') \frac{d}{dt'}(I(t')) dt' = 0 \quad 5-5$$

De forma que la primera integral se efectúa en la ida y la segunda en la vuelta.

Si tenemos una función de relajación $\varphi_E(t)$ para nuestro material, así como una indentación en función del tiempo $I(t)$, podemos resolver 5-5 para obtener la función $t_1(t)$. Una vez obtenida esta función, que sustituida en 5-2 nos dará la fuerza en la vuelta.

Generalidad de la solución de Ting

Es interesante notar que la función $t_1(t)$ dada por la condición anterior es válida bajo unas condiciones muy generales. La ecuación 5-3 es independiente de la forma del indentador (no aparecen los coeficientes α ni β). Es decir, para calcular $t_1(t)$ solo necesitamos saber la función de relajación del material $\varphi_E(t)$ y la forma de la indentación con el tiempo $I(t)$. En su primer artículo [124], Ting demostró dicha condición para una muestra seminfinita y homogénea, lo cual solo nos valdría para el problema del capítulo 2. Sin embargo, en un trabajo posterior [132], demostró que la misma solución es aplicable para cualquier sistema homogéneo en la dirección horizontal definido por una función de Green del tipo 3-7. Esto hace que un sistema homogéneo, pero de dimensiones finitas, como el tratado en el capítulo 4 también esté incluido. Es decir, que la solución final para un sistema de dimensiones finitas estará dado por

$$F(t) = \sum_{j=0}^N \alpha_j \int_0^t \varphi_E(t-t') \frac{d}{dt'} (I(t')^{\beta_j}) dt' \quad t < t_{max}$$

$$F(t) = \sum_{j=0}^N \alpha_j \int_0^{t_1(t)} \varphi_E(t-t') \frac{d}{dt'} (I(t')^{\beta_j}) dt' \quad t > t_{max}$$

5-6

Donde los coeficientes α_j y β_j fueron obtenidos para las diferentes geometrías en el capítulo 3 (ecuaciones 3-60, 3-65 y 3-70). De la misma forma el radio del área de contacto para el problema general estará dada por

$$a(t) = a_{ida}(t) \quad t < t_{max}$$

$$a(t) = a_{ida}(t_1(t)) \quad t > t_{max}$$

5-7

Donde $a_{ida}(t)$ es el radio del área de contacto para la ida, que fue calculado de forma completa en el capítulo 3 (ecuaciones 3-63 y 3-68).

Por lo tanto, podremos resolver el problema completo de la indentación de una célula de dimensiones finitas. La única duda surgirá al tratar la heterogeneidad de la célula, pero este caso lo dejaremos para el último capítulo.

Vamos a proceder al cálculo explícito de las soluciones para los diferentes modelos viscoelásticos.

5.3 Calculo de las soluciones para el caso de Kelvin-Voigt

Vamos a usar la solución de Ting para calcular la fuerza total (tanto en la ida como en la vuelta) en el caso del modelo de Kelvin-Voigt.

Condición general para $t_1(t)$

Sustituyendo la función de relajación de Kelvin-Voigt en la condición 5-4 tenemos la siguiente ecuación

$$\int_{t_1(t)}^t [E + \eta_E \delta(t - t')] \frac{d}{dt'} (I(t')) dt' \quad 5-8$$

La cual podemos resolver fácilmente, obteniendo

$$E[I(t) - I[t_1(t)]] + \eta_E \frac{d}{dt} (I(t)) = 0 \quad 5-9$$

Reordenando términos tenemos una condición para las indentaciones

$$I[t_1(t)] = I(t) + \tau \frac{d}{dt} (I(t)) \quad 5-10$$

Donde $\tau = \frac{\eta_E}{E}$ es el tiempo de relajación del sistema. Cuando la viscosidad esta constante es también cero, por lo que tenemos una simetría perfecta entre la ida y la vuelta ($t_1(t) = t$). Si conocemos la forma exacta de la indentación con el tiempo podremos obtener la expresión $t_1(t)$.

Condición general para la fuerza

Una vez obtenida la función $t_1(t)$, podemos sustituirla (junto con la función de relajación del modelo de Kelvin-Voigt) en la ecuación 5-6

$$F(t) = \sum_{j=0}^N \alpha_j \int_0^t [E + \eta_E \delta(t - t')] \frac{d}{dt'} (I(t')^{\beta_j}) dt' \quad t < t_{max} \quad 5-11$$

$$F(t) = \sum_{j=0}^N \alpha_j \int_0^{t_1(t)} [E + \eta_E \delta(t - t')] \frac{d}{dt'} (I(t')^{\beta_j}) dt' \quad t > t_{max}$$

Si efectuamos las integrales obtenemos la forma final para la fuerza en el caso del modelo de Kelvin-Voigt

$$F(t) = \sum_{j=0}^N \alpha_j I(t)^{\beta_j - 1} [3\beta_j \eta_G \dot{I}(t) + EI(t)] \quad t < t_{max} \quad 5-12$$

$$F(t) = \sum_{j=0}^N \alpha_j EI(t_1(t))^{\beta_j} \quad t > t_{max}$$

Donde $I(t_1(t))$ está dado por la ecuación 5-10. La forma explícita dependerá de cómo sea la indentación en función del tiempo, así que calcularemos dos casos: Una indentación a velocidad constante (triangular) y otra sinusoidal.

Solución indentación triangular

Recordemos que en el caso de indentación triangular, la indentación en función del tiempo viene dada por

$$\begin{aligned} I &= vt & t < t_{max} \\ I &= vt_{max} - v(t - t_{max}) & t > t_{max} \end{aligned} \quad 5-13$$

Donde t_{max} es el tiempo necesario para alcanzar la máxima indentación. De esta forma la velocidad en 5-3 es sencillamente

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}(I(t)) &= v & t < t_{max} \\ \frac{d}{dt}(I(t)) &= -v & t > t_{max} \end{aligned} \quad 5-14$$

Sustituyendo 5-13 y 5-14 en 5-10, obtendremos

$$vt_1(t) = vt_{max} - v(t - t_{max}) - \tau v \quad 5-15$$

Y simplificando

$$t_1(t) = 2t_{max} - t - \tau \quad 5-16$$

Es interesante notar que τ , además del tiempo de relajación, coincide con el “adelanto” con el cual el indentador pierde contacto con la muestra, en comparación con el sistema puramente elástico.

Una vez que sabemos la función $t_1(t)$ podemos calcular la fuerza tanto en la ida como en la vuelta para este modelo, sustituyendo esta expresión en la ecuación 5-12.

$$\begin{aligned} F(t) &= \sum_{j=0}^N \alpha_j I(t)^{\beta_j - 1} [3\beta_j \eta_G \dot{I}(t) + EI(t)] & t < t_{max} \\ F(t) &= \sum_{j=0}^N \alpha_j EI(2t_{max} - t - \tau)^{\beta_j} & t > t_{max} \end{aligned} \quad 5-17$$

Como caso particular de la muestra infinita, obtenemos el siguiente resultado

$$\begin{aligned} F(t) &= \alpha I(t)^{\beta-1} [3\beta\eta_G v + EI(t)] & t < t_{max} \\ F(t) &= \alpha E (v(2t_{max} - t - \tau))^{\beta} & t > t_{max} \end{aligned} \quad 5-18$$

Donde solo nos quedaría particularizar los coeficientes α y β para la geometría adecuada.

Solución indentación sinusoidal

En el caso de que la indentación fuera sinusoidal tendríamos las siguientes expresiones para la indentación en función del tiempo

$$I = I_{max} \sin(\omega t) \quad 5-19$$

Donde t_{max} es, de nuevo, el tiempo necesario para alcanzar la máxima indentación. De esta forma la velocidad en 5-19 está dada por

$$\frac{d}{dt}(I(t)) = I_{max}\omega \cos(\omega t) \quad 5-20$$

Sustituyendo estas expresiones en 5-10 obtendremos

$$I_{max} \sin(\omega t_1(t)) = I_{max} \sin(\omega t) + \tau I_{max}\omega \cos(\omega t) \quad 5-21$$

Por lo que la función $t_1(t)$ es fácil de obtener

$$t_1(t) = \frac{\text{asin}[\sin(\omega t) + \tau\omega \cos(\omega t)]}{\omega} \quad 5-22$$

Sustituyendo esta expresión en las ecuaciones de la fuerza 5-12 tendremos de nuevo la fórmula para la fuerza total tanto en la ida como en la vuelta

$$\begin{aligned} F(t) &= \sum_{j=0}^N \alpha_j I(t)^{\beta_j-1} [3\beta_j \eta_G \dot{I}(t) + EI(t)] & t < t_{max} \\ F(t) &= \sum_{j=0}^N \alpha_j EI (I_{max} \sin(\omega t) + \tau I_{max}\omega \cos(\omega t))^{\beta_j} & t > t_{max} \end{aligned} \quad 5-23$$

Y, simplificando al caso de una muestra infinita tendremos

$$\begin{aligned}
F(t) &= \alpha I(t)^{\beta-1} [3\beta\eta_G \dot{I}(t) + EI(t)] & t < t_{max} \\
F(t) &= \alpha E [I_{max} \sin(\omega t) + \tau I_{max} \omega \cos(\omega t)]^\beta & t > t_{max}
\end{aligned} \tag{5-24}$$

Bajo las mismas condiciones, para el radio de contacto obtendríamos

$$\begin{aligned}
a(t) &= \lambda I(t)^\theta & t < t_{max} \\
a(t) &= \lambda I (I_{max} \sin(\omega t) + \tau I_{max} \omega \cos(\omega t))^\theta & t > t_{max}
\end{aligned} \tag{5-25}$$

Donde los coeficientes λ y θ dependerán de la geometría.

5.4 Otros modelos

De la misma forma podríamos calcular la ecuación de la fuerza para los demás modelos de viscoelasticidad. Sin embargo, nos limitaremos a calcular las funciones $t_1(t)$, dadas las cuales la fuerza se podrá obtener integrando las expresiones generales 5-5. Por simplicidad usaremos una indentación lineal con el tiempo (ecuaciones 5-13 y 5-14).

Modelo SLS e indentación lineal

En este caso usaremos la expresión 5-5, que se convertirá en

$$\int_{t_1(t)}^{t_{max}} \left[E_1 + E_2 e^{-\frac{E_2}{\eta_E}(t-t')} \right] v dt' - \int_{t_{max}}^t \left[E_1 + E_2 e^{-\frac{E_2}{\eta_E}(t-t')} \right] v dt' = 0 \tag{5-26}$$

Resolviendo las integrales obtenemos

$$E_1(t_{max} - t_1(t)) - E_1(t - t_{max}) + \eta_E \left(-1 + 2e^{-\frac{E_2}{\eta_E}(t-t_{max})} - e^{-\frac{E_2}{\eta_E}(t-t_1(t))} \right) = 0 \tag{5-27}$$

Dado que $t_1(t)$ aparece fuera y dentro de una Power-law, es imposible despejar esta función para obtener una fórmula cerrada. La única opción es resolver este problema mediante métodos numéricos.

Modelo Power-law e indentación lineal

Para este modelo la expresión 5-5 se convertirá en

$$\int_{t_1(t)}^{t_{max}} E_0 \left(\frac{t-t'}{t_0} \right)^{-\gamma} v dt' - \int_{t_{max}}^t E_0 \left(\frac{t-t'}{t_0} \right)^{-\gamma} v dt' = 0 \tag{5-28}$$

Dado que tanto E_0 como t_0 aparecen en ambos términos, podemos cancelarlos, por lo que la función $t_1(t)$ solo dependerá del coeficiente γ . Resolviendo las integrales obtenemos

$$\frac{(t - t_{max})^{-\gamma+1}}{-\gamma + 1} - \frac{(t - t_1(t))^{-\gamma+1}}{-\gamma + 1} - \frac{(t - t)^{-\gamma+1}}{-\gamma + 1} + \frac{(t - t_{max})^{-\gamma+1}}{-\gamma + 1} = 0 \quad 5-29$$

Manipulando esta expresión podemos despejar $t_1(t)$

$$t_1(t) = t - \sqrt[\gamma-1]{2}(t - t_{max}) \quad 5-30$$

Como es habitual, el modelo Power-law cuando $\gamma = 0$ es equivalente a un sólido elástico, por lo que la ecuación anterior tiene que ser igual a la obtenida en el modelo de Kelvin-Voigt (ecuación 5-16) cuando no existe viscosidad (es decir, cuando el tiempo de relajación es nulo, $\tau = 0$). Podemos ver fácilmente que esto se cumple para este límite, ya que 5-30 se transforma en

$$t_1(t) = t - 2(t - t_{max}) \quad 5-31$$

Que es equivalente a 5-16 con $\tau = 0$.

Otro caso particular interesante del modelo Power-law es de un líquido perfecto ($\gamma = 1$), que equivaldría al caso de $\tau = \infty$ en el modelo de Kelvin-Voigt. En este caso 5-30 sería.

$$t_1(t) = -\infty \quad 5-32$$

Esta expresión, chocante inicialmente, tiene todo el sentido. Si introducimos esta condición en el límite de la integral de la ecuación de la fuerza en la vuelta (5-2)

$$F(t) = \sum_{j=0}^N \alpha_j \int_0^{-\infty} E_0 \left(\frac{t - t'}{t_0} \right)^{-\gamma} \frac{d}{dt'} (I(t')^{\beta_j}) dt' = 0 \quad t > t_{max} \quad 5-33$$

Vemos que la integral se tendría que calcular para tiempos negativos (t variaría de 0 a $-\infty$), en los cuales no existe el contacto (ya que hemos definido $t = 0$ con el inicio del contacto), y por lo tanto la fuerza total es cero. Es decir la fuerza en la vuelta para un material perfectamente viscoso es exactamente cero. Obviamente, una vez comprimido, un material perfectamente viscoso no seguirá al indentador en la vuelta, por lo que es natural que la fuerza medida sea cero, ya que no hay contacto entre el indentador y la muestra. De nuevo, vemos como el modelo de Kelvin-Voigt nos daría el mismo resultado en el caso de una viscosidad altísima (ecuación 5-16 con $\tau = \infty$).

5.4 Comprobación numérica

De nuevo, como en los capítulos anteriores, usaremos las simulaciones FEM para comprobar la validez de las formulas desarrolladas. Vamos a simular el modelo de Kelvin-Voigt para el caso sinusoidal en dos muestras diferentes: Una de grosor infinito (el mismo ejemplo que el estudiado en

el capítulo 2) y otra finita (el mismo caso que el estudiado en el capítulo 4).

Medio infinito

Dado que la argumentación de Ting está basada en la igualdad de las áreas de contacto entre dos tiempos t y t_1 , vamos a comprobar si coincide el radio de contacto en nuestras predicciones teóricas frente a las simulaciones FEM.

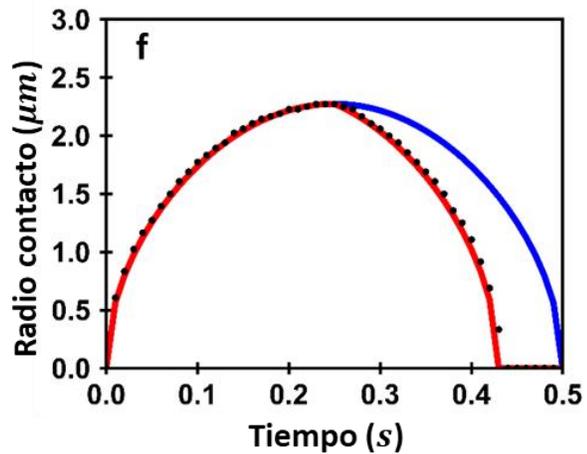
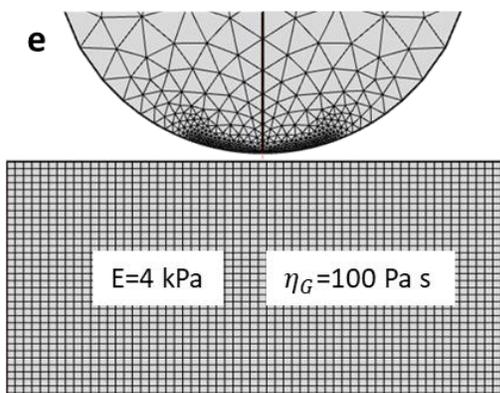
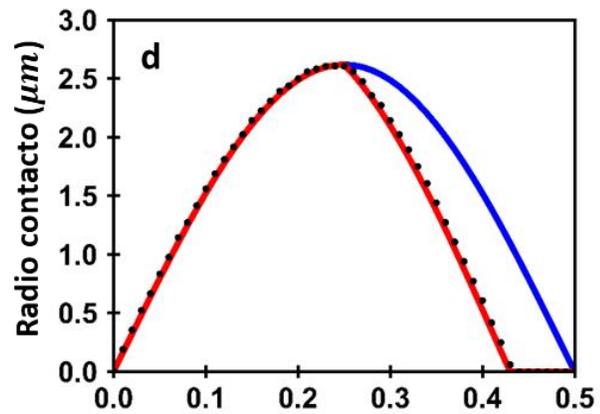
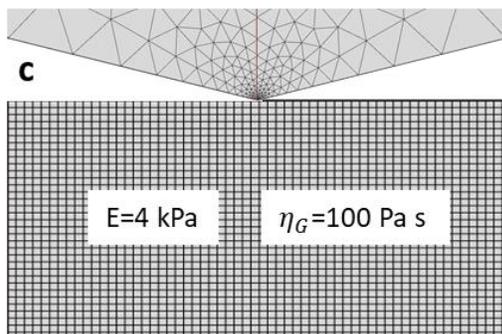
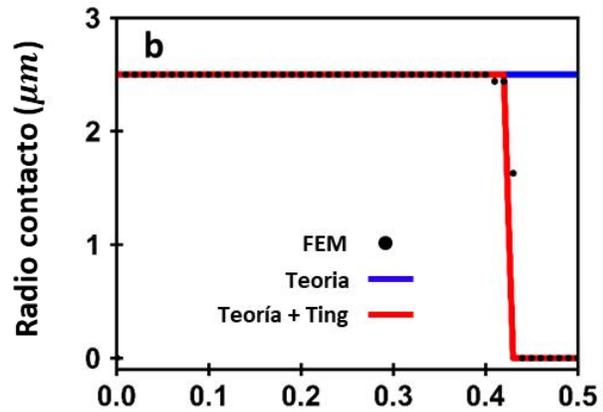
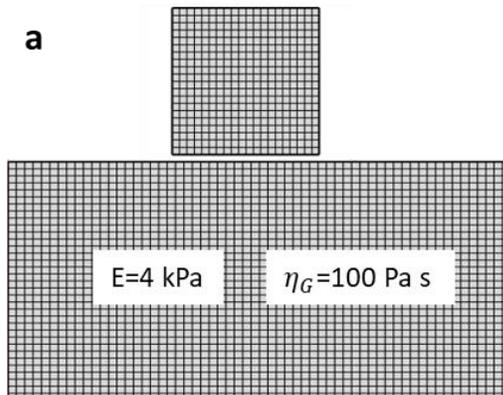


Fig. 5-3: Esquemas de la simulación FEM y comparación simulación-teoría (con y sin la solución de Ting) de los radios de contacto en función del tiempo para una muestra seminfinite. (a, b) Cilindro, $R = 2.5 \mu\text{m}$. (c, d) Cono, $\theta = 75^\circ$. (e, f) Esfera, $R = 5 \mu\text{m}$. Indentación sinusoidal, $A = 1 \mu\text{m}$, $T = 1\text{s}$. Muestra seminfinite $h = \infty \mu\text{m}$, $E = 4 \text{kPa}$, $\eta_G = 100 \text{Pa} \cdot \text{s}$.

En la figura 5-3 se muestra el radio del área de contacto en función del tiempo para las tres geometrías de punta habituales. El esquema de las simulaciones va a ser el mismo que en el capítulo 2 (paneles a, c y e). Se puede ver que el área de contacto obtenida por FEM coincide perfectamente con nuestras ecuaciones para el área de contacto en el caso de una indentación sinusoidal (ecuación 5-25). También podemos ver como en la vuelta el radio del contacto es siempre menor que el esperado aplicando directamente las ecuaciones del capítulo 2 (que no tenían en cuenta el desacople entre la punta y la muestra).

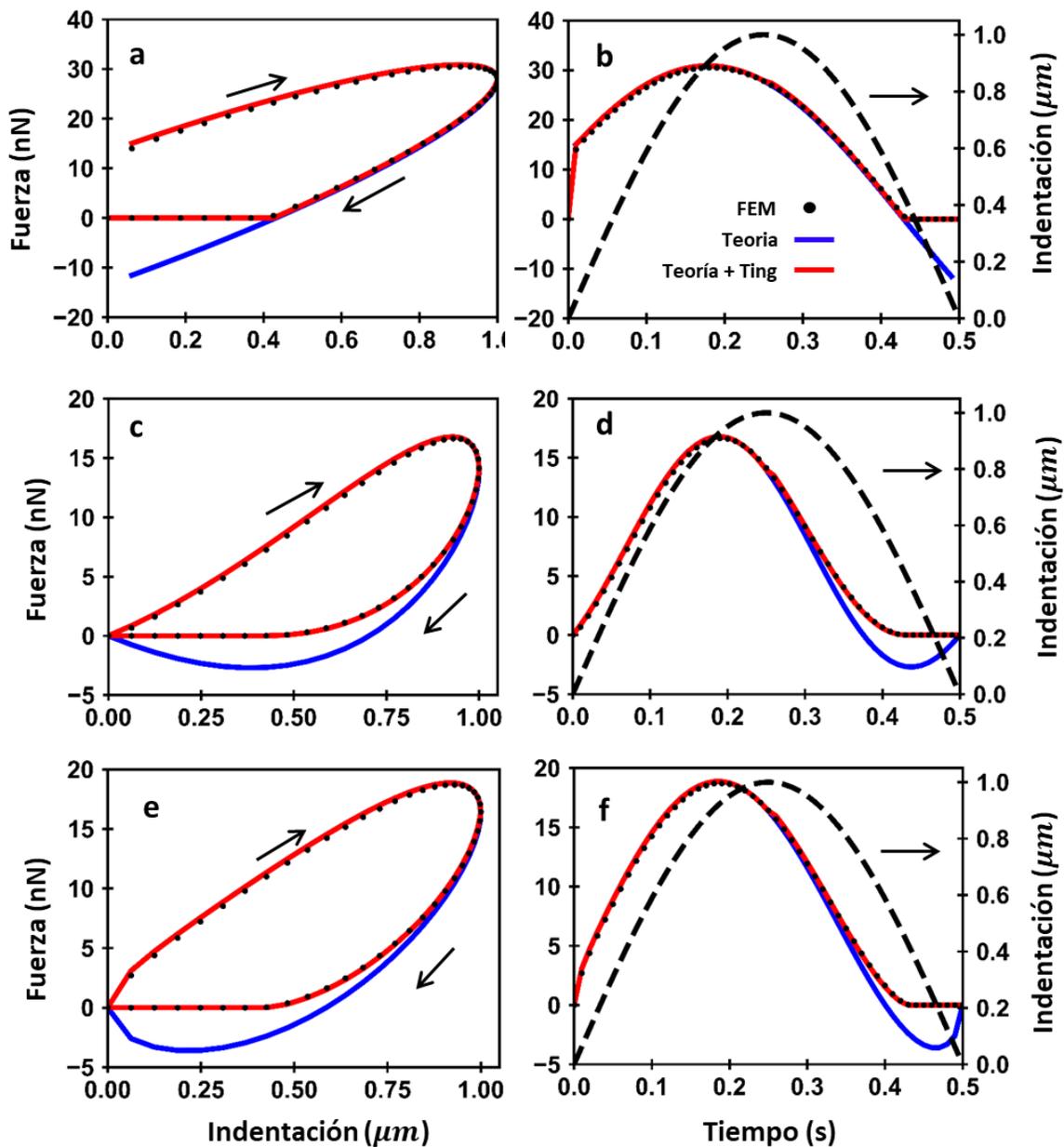


Fig. 5-4: Comparación simulación-teoría (con y sin la solución de Ting) de las fuerzas para una muestra seminfinita. (a) En función de la penetración y (b) en función del tiempo para un cilindro, $R = 2.5 \mu\text{m}$. (c) En función de la penetración y (d) en función del tiempo para un Cono, $\theta = 75^\circ$. (e) En función de la penetración y (f) en función del tiempo para un Esfera, $R = 5 \mu\text{m}$. Indentación sinusoidal, $A = 1 \mu\text{m}$, $T = 1\text{s}$. Muestra seminfinita $h = \infty \mu\text{m}$, $E = 4 \text{kPa}$, $\eta_G = 100 \text{Pa} \cdot \text{s}$.

Una vez que hemos visto que el área de contacto coincide perfectamente entre simulación y teoría, vamos a comprobar si tenemos el mismo éxito con las fuerzas. En la figura 5-4 podemos ver las fuerzas en función de la indentación (paneles a, c y e) así como del tiempo (paneles b, d y f). El ajuste entre teoría (ecuación 5-23) y experimento es casi perfecto, lo que indica que hemos

conseguido resolver completamente el problema de la indentación para una muestra viscoelastica infinita.

Medio finito

En el caso del modelo finito usaremos las fórmulas 5-23 con los coeficientes obtenidos en el capítulo 4. Es decir, nuestro objetivo es completar la solución mostrada en dicho capítulo en la vuelta, donde la condición de Lee y Radok también fallaba, como en el caso infinito.

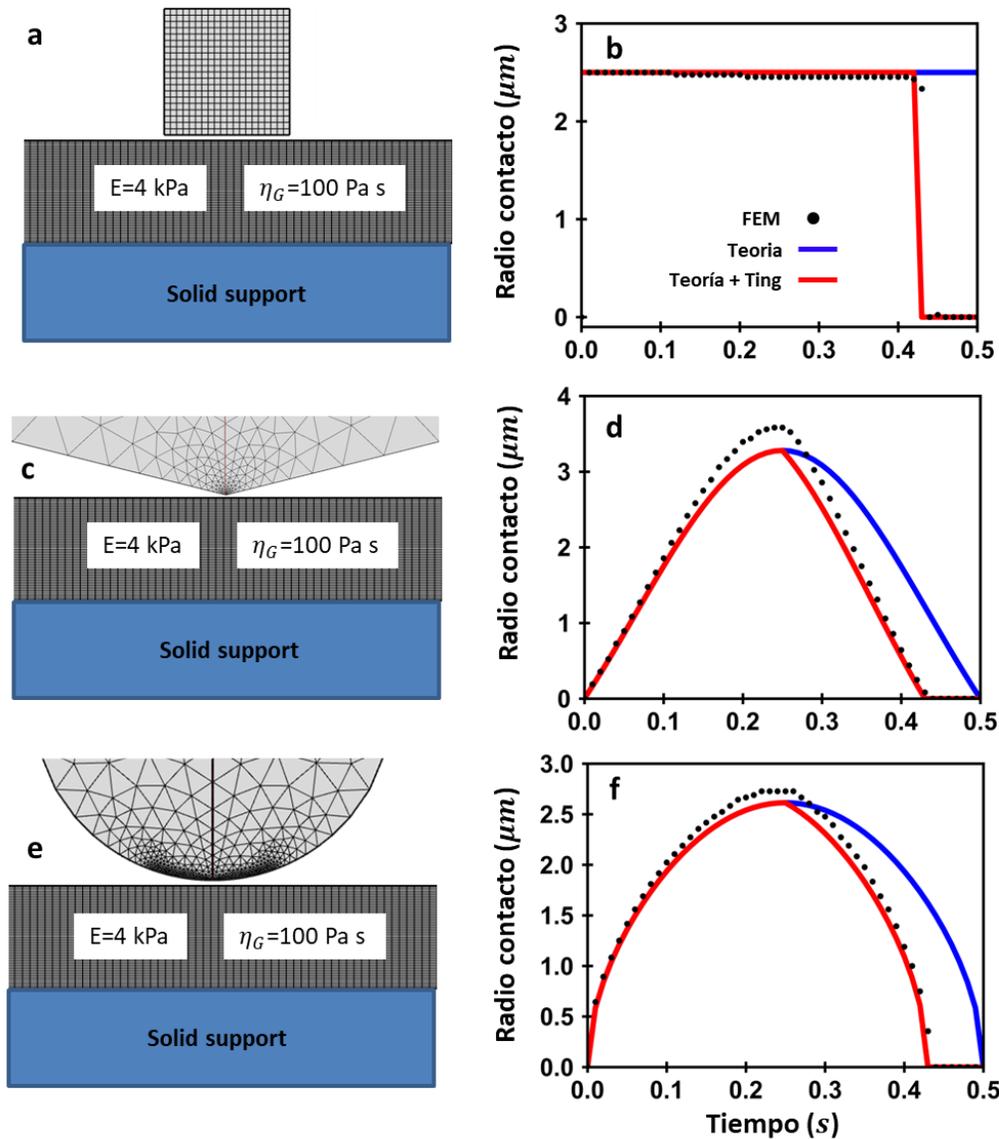


Fig. 5-5: Esquemas de la simulación FEM y comparación simulación-teoría (con y sin la solución de Ting) de los radios de contacto en función del tiempo para una muestra de grosor finito. (a,b) Cilindro, $R = 2.5 \mu\text{m}$. (c,d) Cono, $\theta = 75^\circ$. (e,f) Esfera, $R = 5 \mu\text{m}$. Indentación sinusoidal, $A = 1 \mu\text{m}$, $T = 1 \text{ s}$. Muestra, $h = 5 \mu\text{m}$, $E = 4 \text{ kPa}$, $\eta_G = 100 \text{ Pa} \cdot \text{s}$.

En la figura 5-5 comprobamos el área de contacto, mostrando la evolución del radio con el tiempo. El esquema de la simulación es el mismo que el usado en el capítulo 4 (paneles a, c y e). Podemos ver que el radio (simulado) de contacto en función del tiempo, si bien no coincide perfectamente con la teoría en su máximo, se ajusta razonablemente bien tanto en la ida como en la vuelta de la curva. En el capítulo 4 ya habíamos visto que el error entre simulación y teoría en la máxima indentación era debido a que la teoría va fallando cada vez más según aumenta el ratio indentación/grosor de la muestra, por lo que, en lo que respecta al radio de contacto, podemos decir que la teoría predice bastante bien las simulaciones FEM.

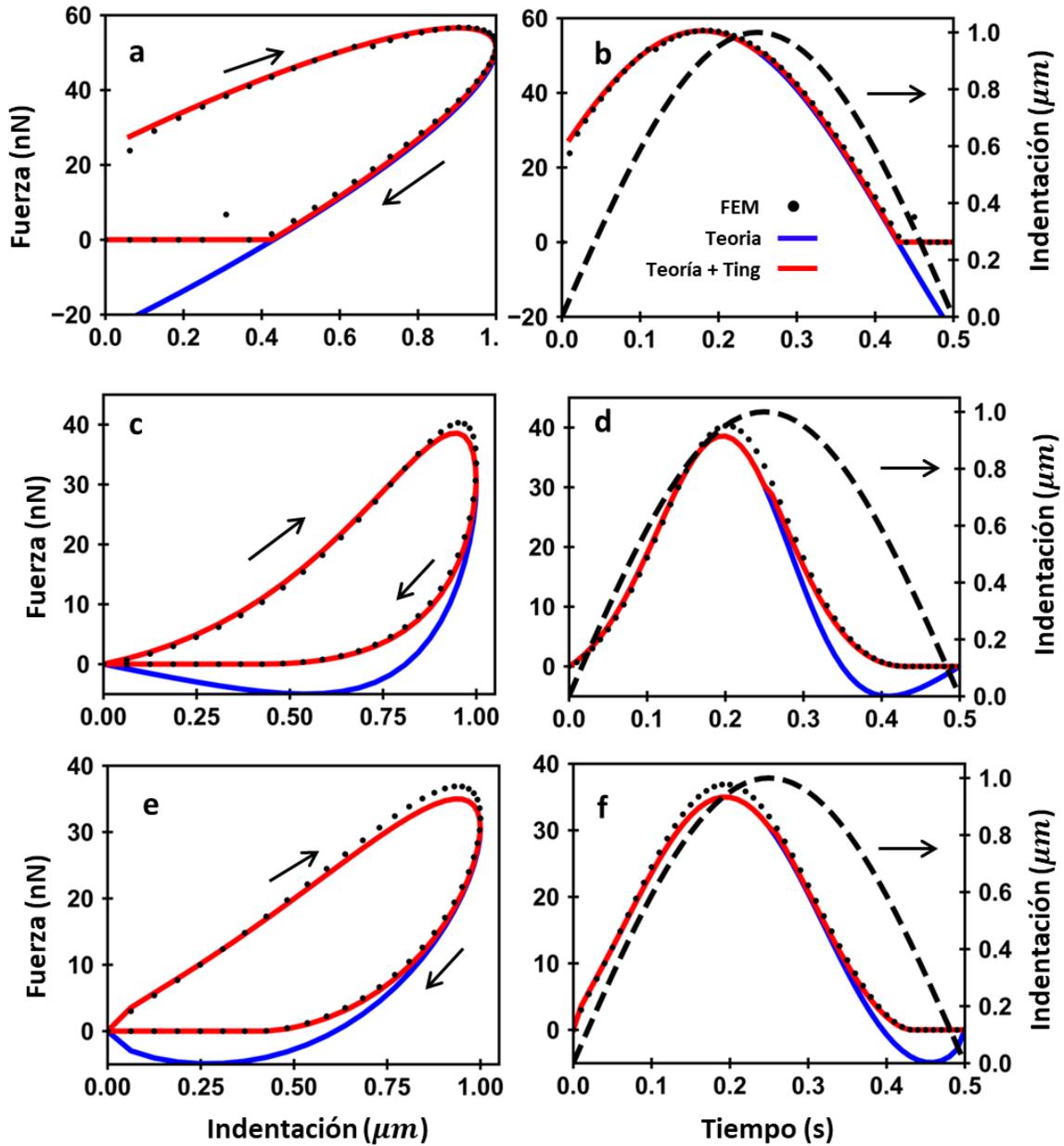


Fig. 5-6: Comparación simulación-teoría (con y sin la solución de Ting) de las fuerzas para una muestra de grosor finito. (a) En función de la penetración y (b) en función del tiempo para un cilindro, $R = 5 \mu\text{m}$. (c) En función de la penetración y (d) en función del tiempo para un Cono, $\theta = 75^\circ$. (e) En función de la penetración y (f) en función del tiempo para un Esfera, $R = 5 \mu\text{m}$. Indentación sinusoidal, $A = 1 \mu\text{m}$, $T = 1\text{s}$. Muestra, $h = 5 \mu\text{m}$, $E = 4 \text{kPa}$, $\eta_G = 100 \text{Pa} \cdot \text{s}$.

Veamos, como prueba final, que pasa con las fuerzas. En la figura 5-6 podemos observar la comparación entre las fuerzas en función de la penetración (paneles a, c, y e) y las fuerzas en función del tiempo (paneles b, d y f) coinciden realmente bien con las simulaciones, tanto para la ida como para la vuelta. Es decir, las ecuaciones 5-23 predicen lo que pasa en la simulación. Por lo tanto, podemos decir que hemos solucionado completamente el problema de indentación de un medio viscoelástico de grosor finito.

5.5 Conclusiones

En este capítulo se han completado las soluciones viscoelásticas dadas en los capítulos 2 y 4, las cuales solo eran válidas en la ida de la curva de indentación. Usando simulaciones FEM, se ha visto que el problema surge debido al desacoplamiento entre la punta y la muestra en la vuelta, lo cual hace que el área de contacto sea menor en la vuelta que en la ida para la misma indentación. Hemos aplicado la teoría propuesta en la bibliografía, la cual ofrecía una solución en la vuelta suponiendo que se conocieran las soluciones explícitas en la ida. Combinando dicha teoría con las soluciones encontradas en los capítulos 2 (para muestras infinitas) y 4 (para muestras finitas), hemos obtenido soluciones para cualquier geometría y modelo viscoelástico. Finalmente como ejemplo particular, se ha estudiado numéricamente el caso particular del modelo de Kelvin-Voigt, obteniéndose una concordancia muy buena entre la teoría y la simulación.

Podemos decir entonces que se ha solucionado completamente el problema de la indentación de una muestra viscoelástica de grosor finito. O dicho de otra forma, tenemos una teoría completa de cómo medir la célula con un AFM teniendo en cuenta tanto su comportamiento viscoelástico como su grosor finito. Sin embargo, en todo lo anterior hemos estado tratando al célula como un objeto homogéneo, que tendría las mismas propiedades en cualquier punto que midamos de la misma. En el siguiente capítulo vamos a intentar obtener un mapa tridimensional de las propiedades mecánicas de la misma, teniendo en cuenta su heterogeneidad.

6. Tomografía 3D de la célula

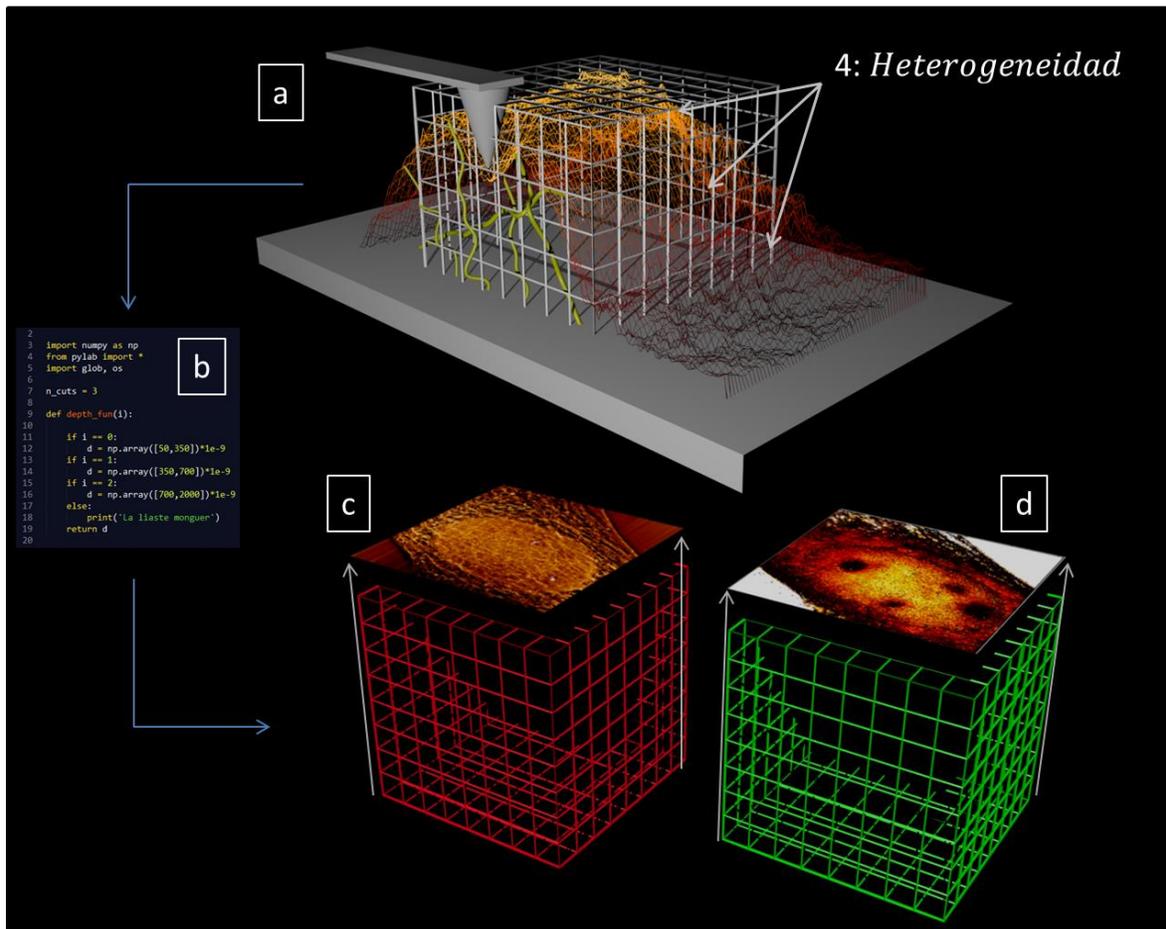


Fig. 6-0: Análisis de la heterogeneidad de la célula. (a) El volumen de la célula se descompone en una matriz 3D de “voxels”, midiendo el microscopio la respuesta en cada uno de ellos. (b) El procesamiento de esta información nos permite obtener matrices 3D de rigideces (c) y de viscosidades (d), de las cuales podemos obtener planos, cortes...

Hasta ahora nos hemos centrado en obtener valores medios de la célula, observándola como un todo continuo. Es decir, hemos comprimido toda la información mecánica y estructural de la misma en unos pocos valores numéricos (módulo de Young, viscosidad...). Sin embargo, como vimos en la introducción, es obvio que la célula es un objeto altamente heterogéneo, compuesto por diferentes piezas (fibras de actina, microtúbulos, orgánulos...), cada una de ellas con diferentes propiedades mecánicas. De esta forma, lo que medimos con los parámetros macroscópicos no es más que la media estructural del conjunto de estas piezas. Es decir, cuando decimos que en cierta posición la célula tiene un módulo de Young de 4 kPa, en realidad indicamos que la rigidez estructural de la combinación de todos los elementos de los que está hecha la célula tiene este valor (aunque quizás ninguno de los elementos por separado tiene este valor en concreto). Debemos afrontar entonces la siguiente pregunta: Sabiendo los valores locales (en diferentes posiciones y profundidades) de estos parámetros, ¿podemos hallar las propiedades y la localización espacial de las diferentes piezas? Si logramos resolver esta cuestión podremos obtener la tomografía 3D de la célula.

6.1 Método y procesamiento de los datos

Vamos a utilizar el modelo de Kelvin-Voigt, el cual nos permite obtener el módulo de Young y la viscosidad para cada punto de la célula, de forma parecida al estudio que mostramos en el capítulo 2. Sin embargo, en aquella ocasión solo queríamos obtener valores promedio de los parámetros, por lo que la colocación espacial de los datos no era importante. Para obtener la tomografía de la célula, deberemos variar ligeramente la forma de tratar la información.

Método experimental

Utilizaremos dos metodologías diferentes para analizar la célula, la cual será un fibroblasto de ratón (la misma usada en el capítulo dos: MEF, *Mouse Embryonic Fibroblast*). Aunque no aparezcan en esta tesis, los resultados también se han comprobado en otra línea celular (HeLa). Para obtener mejores resultados, y como prueba de concepto, las imágenes se han obtenido en células fijadas.

La primera consiste en obtener curvas de fuerza-indentación para cada uno de las posiciones del plano x , y de la célula (píxeles). El movimiento vertical de la micropalanca será de velocidad constante, es decir, la indentación seguirá un perfil triangular con el tiempo, como en los experimentos del capítulo 2. La diferencia con aquel capítulo es que ahora no solo queremos valores medios de los parámetros, sino que queremos localizar su distribución espacial. Esto hace que tengamos que “reorganizar” las curvas en forma de matriz tridimensional, proceso que explicaremos con detalle más adelante, en la siguiente subsección.

Por otro lado, obtendremos un mapa topográfico usando datos obtenidos mediante el método de *Force-Volume* del AFM. Este mapa, si bien no nos dará información 3D, nos permitirá, después de cierto filtrado, obtener unas imágenes muy claras de citoesqueleto, las cuales cuantificaremos en la siguiente sección.

Finalmente hemos complementado nuestro estudio con imágenes ópticas tanto de fluorescencia como de microscopia de fase. Dichos estudios no son novedosos, pero nos servirán de referencia para comprobar si las metodologías propuestas en este capítulo son correctas.

Procesamiento de los datos

Como hemos visto en el capítulo 2, el microscopio nos proporciona una curva de fuerzas para cada pixel, donde la fuerza está función de la posición del cabezal de la micropalanca. Sin embargo, a diferencia de en aquel capítulo, no queremos analizar cada una de estas curvas por separado, si no organizarlas de forma que se puedan interpretar de forma coherente como un mapa volumétrico de las propiedades de la célula. Lo primero que tendremos que hacer es transformar los datos de la posición del cabezal en datos sobre la posición de la punta (teniendo en cuenta la deflexión de la micropalanca). Después, separaremos las curvas de ida de las de vuelta, obteniendo dos conjuntos de curvas (una para la ida y otra para la vuelta). El paso final es crear una matriz tridimensional en los ejes x , y , z , donde cada punto representa una posición en el espacio 3D (llamado voxel[133]). Distribuiremos la información de las curvas de fuerza-indentación en esta matriz, de forma que, dadas unas coordenadas espaciales de posición (unas coordenadas x , y , z), podemos saber que fuerza midió el microscopio (tanto en el movimiento de ida como en el de vuelta), así como si la célula ocupa esta posición del espacio o estamos fuera de ella, cuanta es la penetración... Una vez organizada la información en esta matriz, podemos aplicar diferentes filtros (con las teorías desarrolladas en los capítulos anteriores) para obtener matrices espaciales de los parámetros mecánicos (por ejemplo podríamos, usando las fórmulas 2-60, obtener una matriz 3D de rigidez y otra 3D de viscosidad).

Una vez obtenidas estas matrices, podemos realizar los análisis que queramos sobre ellas. Imaginemos que queremos saber el módulo de Young en cierta posición x e y , y a cierta profundidad por debajo de la superficie. Para obtener el valor requerido, solo tendríamos que buscar el “voxel” adecuado en la matriz 3D de indentaciones (que nos indicaría las coordenadas x , y y z), y, una vez localizado, buscar el valor del mismo voxel en la matriz de rigidez. El mismo proceso podría hacerse para obtener un corte 2D en cualquier dirección.

6.2 Información de los diferentes canales

Vamos a explicar los diferentes canales de información que tenemos para ver la estructura interna de la célula. Cada uno de ellos ofrecerá distinta información cuantitativa, y será sensible a diferentes estructuras.

Canal óptico

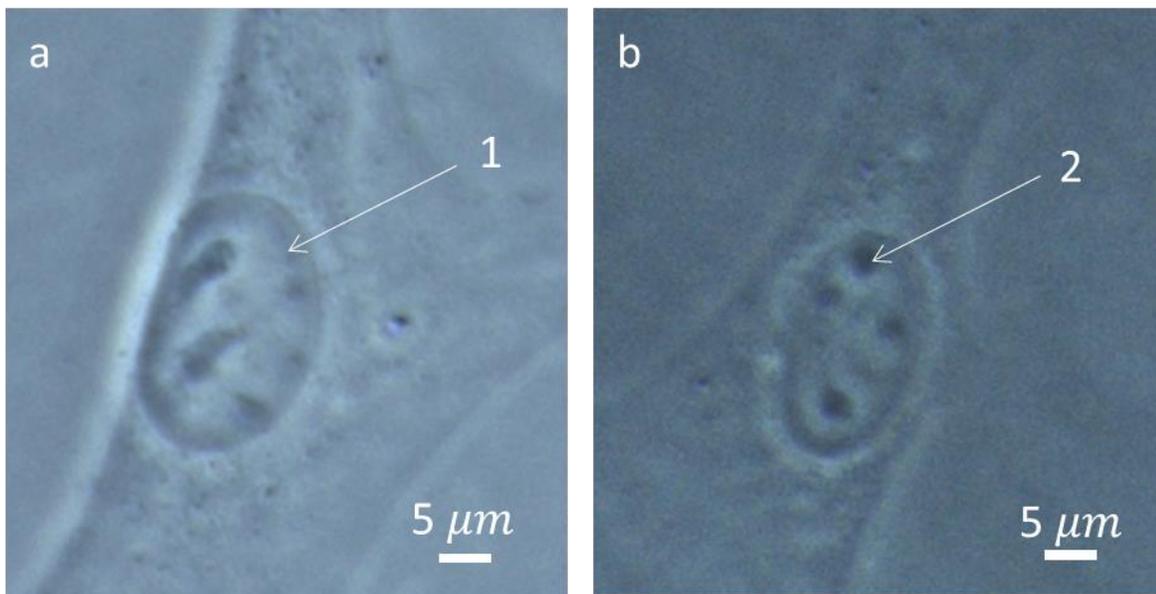


Fig. 6-1: Imágenes ópticas de dos fibroblastos de ratón. En ambos casos se pueden distinguir fácilmente tanto el núcleo (1) como los nucléolos (2).

Este canal (figura 6-1 paneles a y b, para dos células distintas) es el obtenido directamente utilizando imágenes de luz visible, usando un microscopio de contraste de fase[134]. Aunque en principio la célula es totalmente transparente, la microscopía de fase nos permite observar diferentes estructuras internas. Podemos ver fácilmente diferenciados el núcleo y, dentro del mismo, los nucléolos. Sin embargo, otras estructuras como las fibras de actina, o los microtúbulos no son visibles en dicho canal. A pesar de su facilidad de uso y de la posibilidad para la visualización de ciertas estructuras, la imagen óptica tiene varias limitaciones.

Por un lado la imagen obtenida es puramente bidimensional, por lo que es imposible conseguir información sobre la distribución vertical de los elementos observados. Aunque esta limitación ha sido resuelta parcialmente con la invención del microscopio confocal, dicha solución requiere otro sistema experimental diferente. Por otro lado la imagen óptica no proporciona valores de las propiedades mecánicas de la célula. Si bien las diferencias de contraste son debidas a cambio de la velocidad de propagación de la luz en diferentes partes de la célula, relacionar dicha propiedad con la

viscoelasticidad no es un problema resuelto actualmente.

De todas formas, las imágenes ópticas nos servirán para comprobar que lo que obtengamos por otros canales no sean artefactos de la medida, si no estructuras reales de la célula.

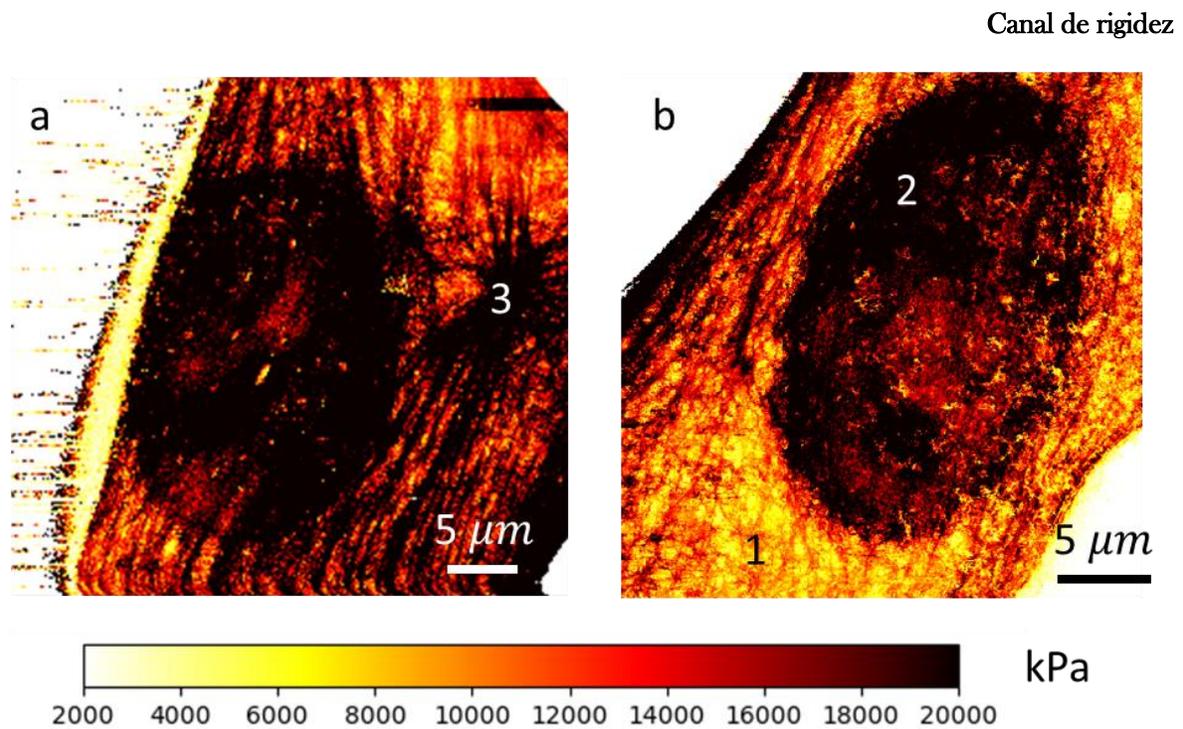


Fig. 6-2: Imágenes del canal de rigidez (módulo de Young) de dos fibroblastos de ratón. En ambos casos se pueden distinguir fácilmente el núcleo (2) de la zona exterior. También es visible parte del citoesqueleto (3).

El canal de rigidez es una matriz con la componente elástica del módulo de Young en el modelo de Kelvin-Voigt. Podemos obtener un mapa 2D de este canal promediando los valores en el eje z en la matriz 3D de rigidez, es decir, obteniendo un valor promedio para cada pixel (de coordenadas x, y). En este canal (ver figura 6-2) podemos distinguir diferentes estructuras de la célula. La primera distinción que podemos ver es entre la zona exterior de la célula (1) el núcleo (2). La zona delimitada por el núcleo coincide perfectamente con la vista en las imágenes ópticas. La parte exterior es más blanda, excepto en las zonas donde hay fibras (3). Estas fibras crean diferentes estructuras que analizaremos con más precisión en la siguiente sección. Los nucléolos son difícilmente visibles dentro del núcleo, al contrario de lo que sucede con el canal de viscosidad.

Canal de viscosidad

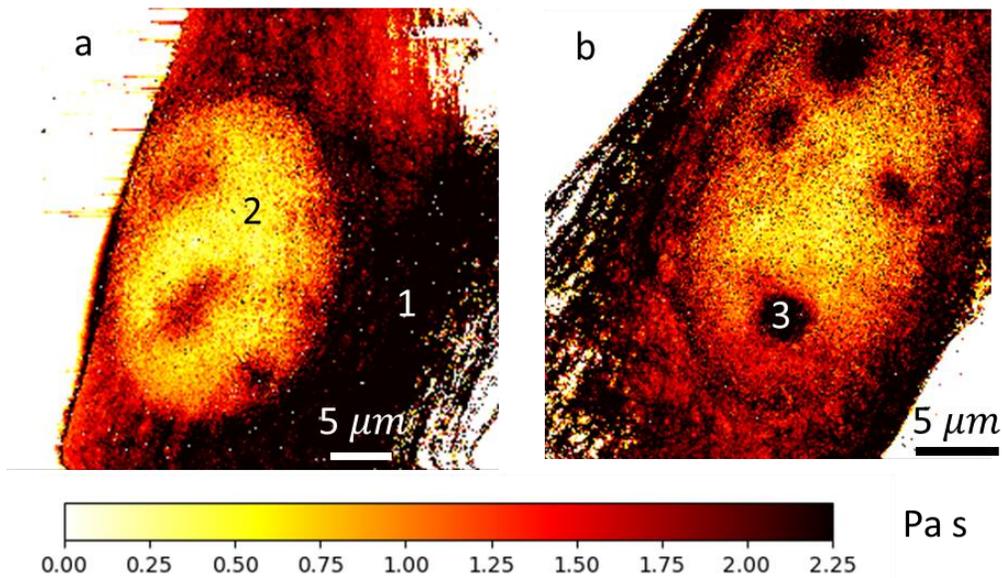


Fig 6-3: Imágenes del canal de viscosidad (η) de dos fibroblastos de ratón. En este caso, además del núcleo (2) y de la zona exterior (1), se puede visualizar los nucleólos (3).

Para el canal de viscosidad usaremos la componente viscosa del modelo de Kelvin-Voigt. De nuevo, para obtener imágenes 2D promediaremos los valores en la dirección z de la matriz 3D de viscosidades. En este mapa podemos distinguir (véase la figura 6-3), igual que en canal del módulo de Young, la zona del núcleo (2) de la zona exterior (1), siendo el núcleo menos viscoso. Además, en este canal podemos ver estructuras que no son visibles en otros canales mecánicos, como el de rigidez o el mecanotopográfico. Por ejemplo los nucleólos (3) son fácilmente visibles en el interior del núcleo. Esto demuestra la utilidad de este canal para visualizar el interior de la célula.

Canal mecanotopográfico

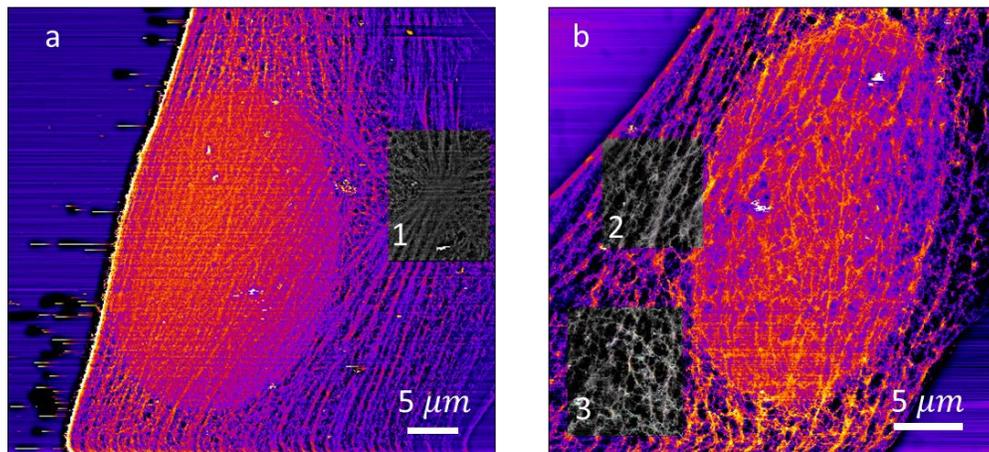


Fig. 6-4: Imágenes del canal mecanotopográfico. Podemos observar diferentes estructuras del citoesqueleto: formaciones de estrella (1), fibras longitudinales (2) y mallado (3).

El canal mecanotopográfico se obtendrá de forma diferente a los anteriores. La idea consiste en realizar un mapa de topografía de la célula mediante el método de *Force-Volume*. Una vez obtenido aplicaremos un filtro que eliminará las altas frecuencias espaciales[135]. La idea detrás de este filtro consiste en que la topografía medida por el método de contacto no es realmente la forma de la célula, sino una mezcla entre la forma y la rigidez de la muestra a medir. Dado que la forma cambia de forma muy suave, podemos suponer que los cambios debidos a esa forma corresponden a bajas frecuencias espaciales, por lo que al filtrarlos obtendremos la imagen de rigideces. Esa imagen filtrada es la que llamaremos mecanotopográfica (ver figura 6-4).

6.2 Consistencia de los mapas obtenidos

Antes que realizar un estudio más detallado de los mapas vamos a analizar si los diferentes mapas coinciden entre sí. Esto es importante porque probará que las estructuras que vemos son reales o son artefactos obtenidos durante la toma de datos o el procesamiento posterior de los mismos.

Núcleos y nucléolos

Dos estructuras claramente visibles en las imágenes ópticas eran los núcleos y los nucléolos (fig. 6-1). Como se puede ver, las imágenes del canal de viscosidad (fig. 6-3) coinciden perfectamente tanto en número, tamaño y posición con las ópticas. La ventaja de las primeras es que nos van a permitir cuantificar las propiedades mecánicas, cosa que las ópticas no nos ofrecen. Es importante notar de nuevo que los nucléolos no son visibles ni en los mapas de rigidez (fig. 6.2), ni en los mecanotopográficos.

Fibras y citoesquelto

Para comprobar si las fibras que vemos en los mapas son reales vamos a apoyarnos en imágenes de fluorescencia (ver figura 6-5). Utilizaremos dos tipos de fluoróforos, uno para visualizar los microtúbulos (panel a) y otro para las fibras de actina (panel b). Ambas imágenes de fluorescencia se pueden combinar para tener una imagen de conjunto del citoesqueleto (panel c).

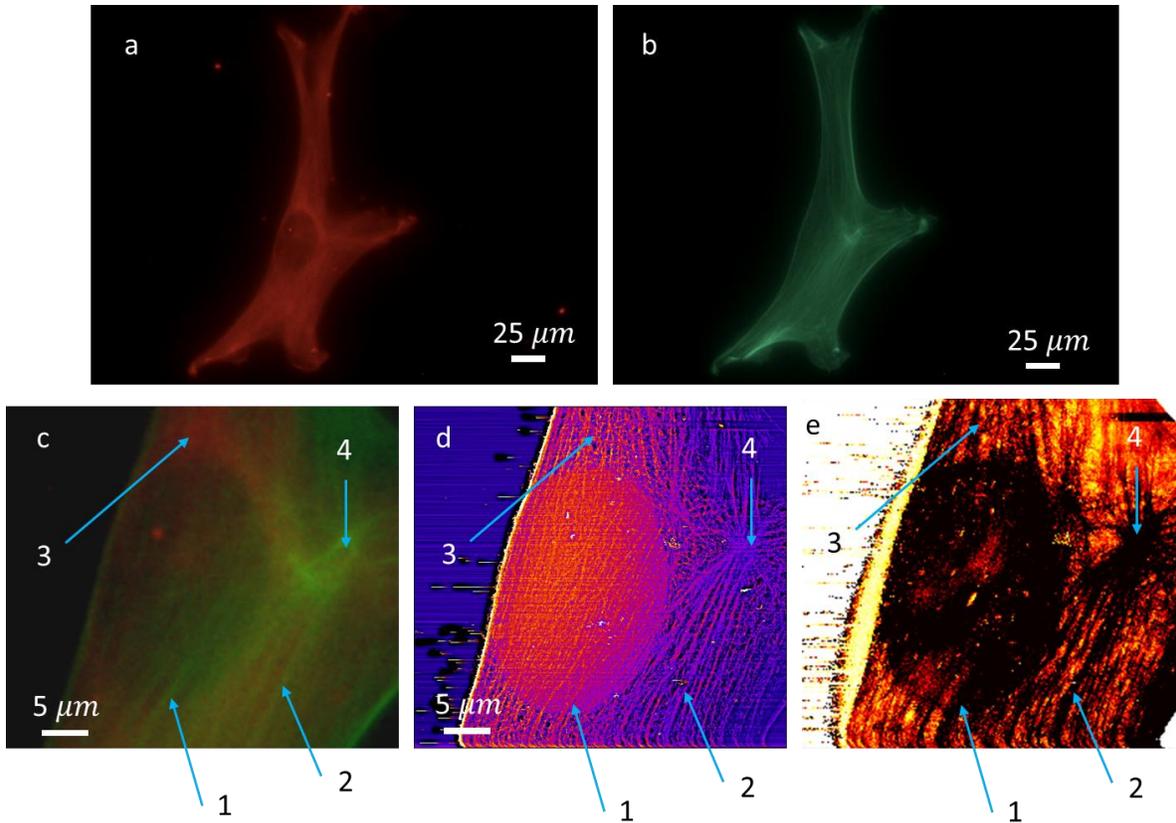


Fig. 6-5: Comparación fluorescencia-mecanotopografía-rigidez. (a) Fluorescencia de los microtúbulos. (b) Fluorescencia de las fibras de actina. (c) Combinación de ambas fluorescencias. (d) Imagen mecanotopográfica. (e) Imagen de rigidez (módulo de Young).

Vamos a comparar más detalladamente esa imagen de fluorescencia, con la mecanotopográfica (panel d) y con la de rigidez (panel e). A nivel general podemos ver la similitud de grandes estructuras del citoesqueleto como las agrupaciones de fibras longitudinales (marcadas con el número 3) o las formaciones en forma de estrella (marcadas con el número 4). Si nos fijamos en la posición y forma de fibras individuales (1 y 2), también vemos como los tres canales de información coinciden entre sí. Esto nos da seguridad de que los mapas mecanotopográficos y los del módulo de Young son fiables, por lo que podemos trabajar con ellos.

6.3 Análisis 2-D de los mapas mecanotopográficos

Vamos a intentar estudiar la distribución espacial de las fibras del citoesqueleto en diferentes partes de la célula. Para ello nos centraremos en los mapas mecanotopográficos mostrados anteriormente. Si bien estos mapas no nos dan valores numéricos de las propiedades mecánicas, su alta resolución espacial los hace adecuados para un estudio de distribución y propiedades geométricas del citoesqueleto.

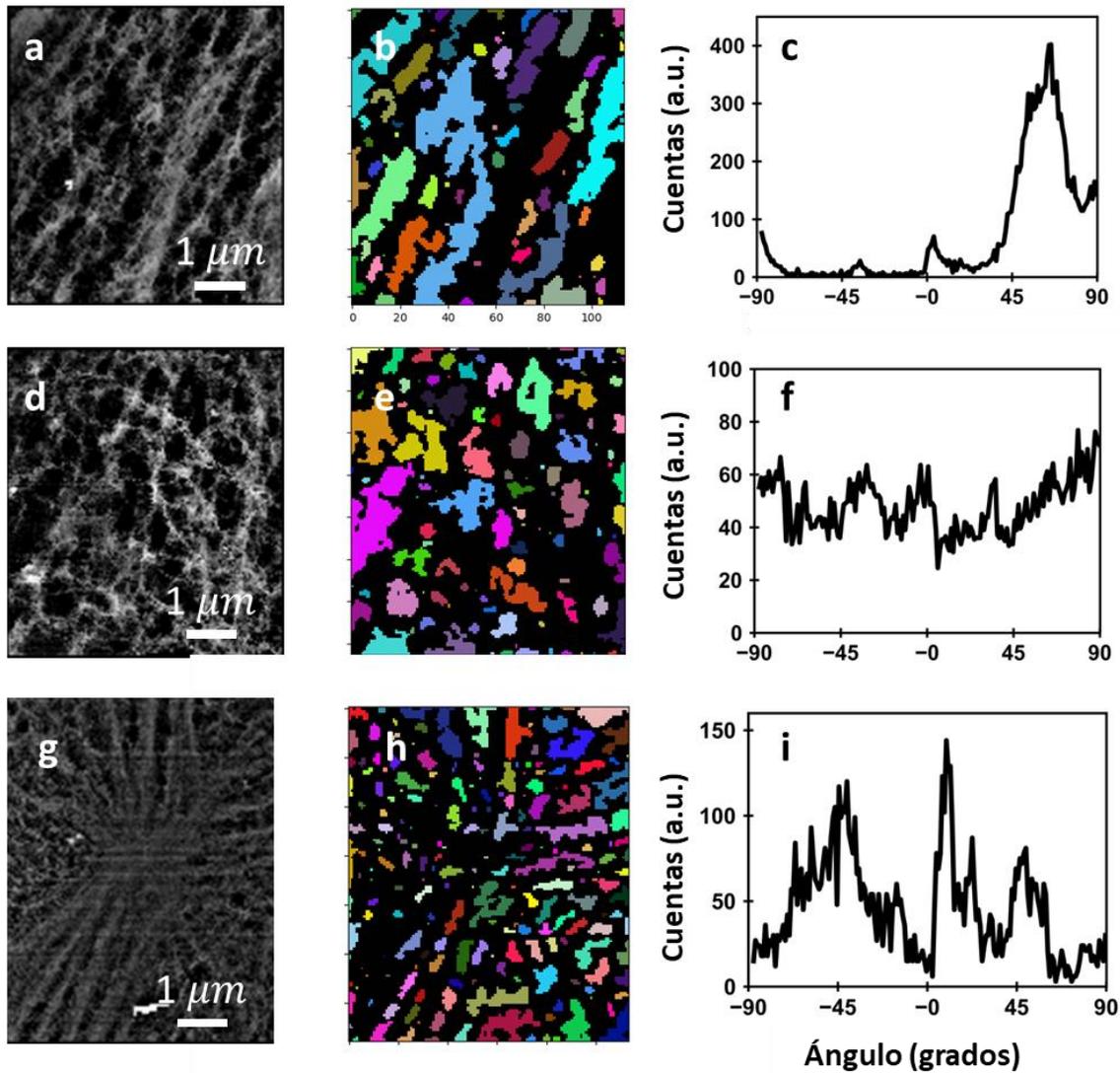


Fig. 6-6: Análisis del citoesqueleto. Mecanotopografía (a), detección de huecos entre fibras (b) e histograma angular (c) en la zona de “fibras”. Mecanotopografía (d), detección de huecos entre fibras (e) e histograma angular (f) en la zona de “mallado”. Mecanotopografía (g), detección de huecos entre fibras (h) e histograma angular (i) en la zona de “estrella”.

Estructuras a estudiar

Nos centraremos en las tres regiones diferentes de la célula encontradas en los mapas mecanotopográficos (figuras 6-5 y 6.6), cada una de ellas con una distribución del citoesqueleto propia. En una parte del citoesqueleto podemos ver claramente las fibras longitudinales, por lo que la llamaremos sencillamente zona de “fibras” (figura 6-6, panel a). En otras zonas, sin embargo, las fibras se entrelazan las unas con las otras creando un “mallado” (figura 6-6, panel d). En una tercera localización, parece que las fibras parten de un centro común, formando una estructura de “estrella”

(figura 6-6, panel g). Si bien estas estructuras han sido descritas en la bibliografía [106], vamos a realizar un pequeño análisis de sus propiedades en nuestras medidas.

Orientación

Para estudiar la asimetría espacial analizaremos como parámetro la orientación de las fibras. Es decir, calcularemos un histograma en función del ángulo, donde podremos observar si la estructura del citoesqueleto tiene cierta dirección preferencial, o por el contrario, su distribución es totalmente aleatoria.

En el caso de la zona de fibras (figura 6-6, panel c), se ve claramente una orientación mayoritaria con un ángulo de 60 grados. Esto indica que esta sección del citoesqueleto aguantará tensiones preferencialmente en dicha dirección. Dado que se sabe que la célula reconfigura sus fibras en función de las cargas exteriores, sería interesante poder combinar este estudio angular con un experimento en el cual pudiéramos someter a la célula a diferentes esfuerzos direccionales.

Sin embargo, en la zona de mallado (figura 6-6, panel f), se puede ver como el histograma es prácticamente plano. Como podemos ver en las imágenes, en esta parte del citoesqueleto no existe ninguna dirección preferencial, ya que las fibras están orientadas totalmente al azar.

Finalmente, en la zona de estrella (figura 6-6, panel i), no existe una sola dirección preferencial, pero el histograma tampoco es completamente plano. Esto se debe a que tenemos una estructura de fibras saliendo en diferentes direcciones, donde cada una de estas direcciones se corresponde con un pico en el histograma.

Densidad de fibras

En el capítulo 2 vimos que la viscosidad se puede interpretar (siguiendo el modelo poroelástico) como la dificultad del citosol para moverse a través de los canales abiertos entre las fibras del citoesqueleto. Vimos además que someter a la célula a la acción de un medicamento que dañaba el citoesqueleto provocaba una disminución de la viscosidad. Dado que esta disminución era achacada al aumento y ensanchamiento de los canales entre fibras, sería interesante cuantificar el tamaño y número de los mismos. Para ello, hemos diseñado un programa que localiza y cuantifica los huecos entre fibras (marcando los huecos con colores, para su mejor visualización). Como se puede ver (figura 6-6, paneles b, e y h), para las diferentes estructuras tendremos diferente densidad de fibras, siendo la estrella (panel h) la que tienen una mayor cantidad, mientras que la zona de fibras es la que cuenta con una mayor cantidad de espacio vacío.

Como prueba indirecta del modelo poroelástico, podemos comparar la densidad de fibras con la viscosidad medida. Por ejemplo, dado que en la zona de estrella la densidad de fibras es muy alta, sabemos que en esta zona los huecos para el movimiento del citosol son pequeños (panel h). Esto debería corresponder con una alta dificultad para el movimiento del líquido, y, por lo tanto, una alta viscosidad. Como podemos ver en la figura 6-3, la viscosidad en esa región es muy alta, por lo que el estudio confirma lo esperado por el modelo viscoelástico.

6.4 Análisis 3-D de los mapas de rigidez

Finalmente, vamos a intentar obtener información sobre la posición vertical de las diferentes partes de la célula. Nos centraremos en los mapas de rigidez, ya que la gran cantidad de fibras visibles nos permitirá obtener mejores resultados.

Cortes de la matriz de rigidez

Lo primero que intentaremos es extraer cortes de la matriz de rigidez a diferentes profundidades (ver figura 6-7, panel a). Con esto, esperaríamos que en los diferentes cortes aparecieran diferentes estructuras, ya que en una célula real estas varían según su profundidad.

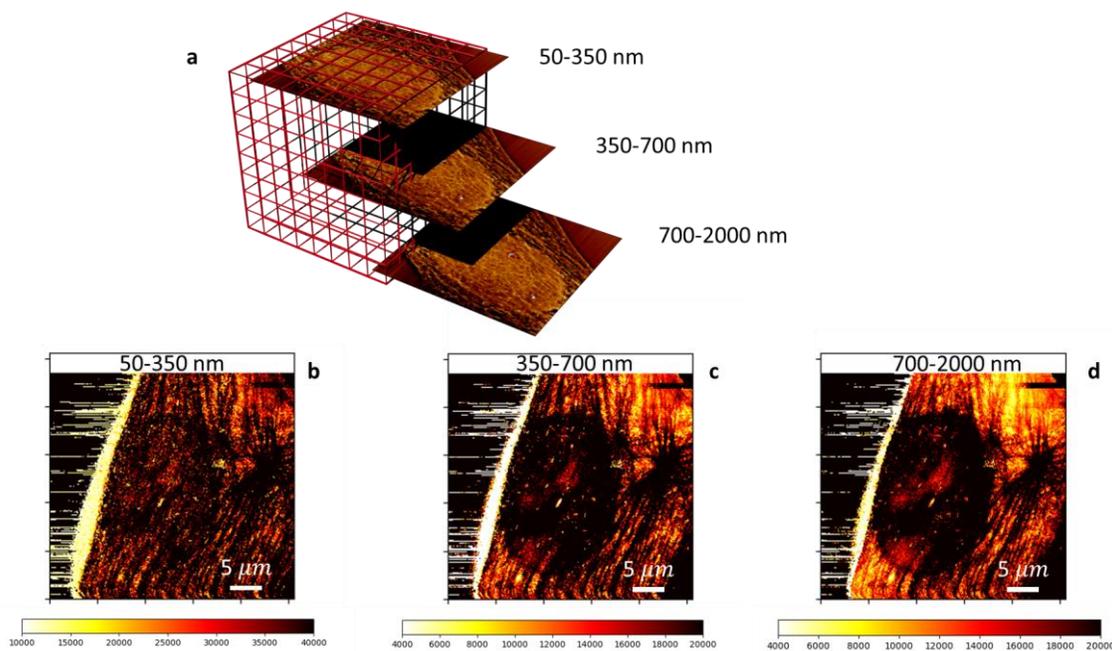


Fig. 6-7: Tomografía de rigidez. (a) Cortes de la matriz de rigidez 3D a diferentes profundidades. (a) Profundidad entre 50 y 350 nm. (b) Profundidad entre 350 y 700 nm. (c) Profundidad entre 700 y 2000 nm.

En los paneles b, c y d podemos ver los cortes obtenidos a tres profundidades distintas. Contrariamente a lo esperado, no se ven diferencias claras entre ellas, salvo por diferencias en la magnitud de los valores de rigidez. Vamos a analizar, con ayuda de simulaciones FEM, que está pasando y las posibles soluciones al problema.

Análisis teórico

La cuestión que tenemos que resolver es ¿Por qué las fibras que están a cierta profundidad no aparecen y desaparecen cuando hacemos cortes de la matriz de rigidez a distintas profundidades? Para resolver esa pregunta vamos a simular un ejemplo muy sencillo (ver figura 6-8). Imaginemos que tenemos una sola fibra enterrada en un material elástico (panel a). La fibra, para facilitar su

localización, tiene una rigidez 100 veces mayor que la matriz que la rodea (3 kPa para la matriz, frente a 300 kPa para la fibra), y se encuentra a cierta profundidad d . Si indentamos la muestra con un cono, hasta una profundidad de, digamos, $1 \mu\text{m}$... ¿podremos ver la fibra? Intuitivamente pensaremos que dependerá de si la fibra está por debajo de esa profundidad o por encima. Es decir, si está a menos de esa micra, la “tocaremos” con la punta y la podremos ver, mientras que, si está más profunda, será invisible para nuestro microscopio. Veamos si esta intuición es confirmada por los resultados de las simulaciones.

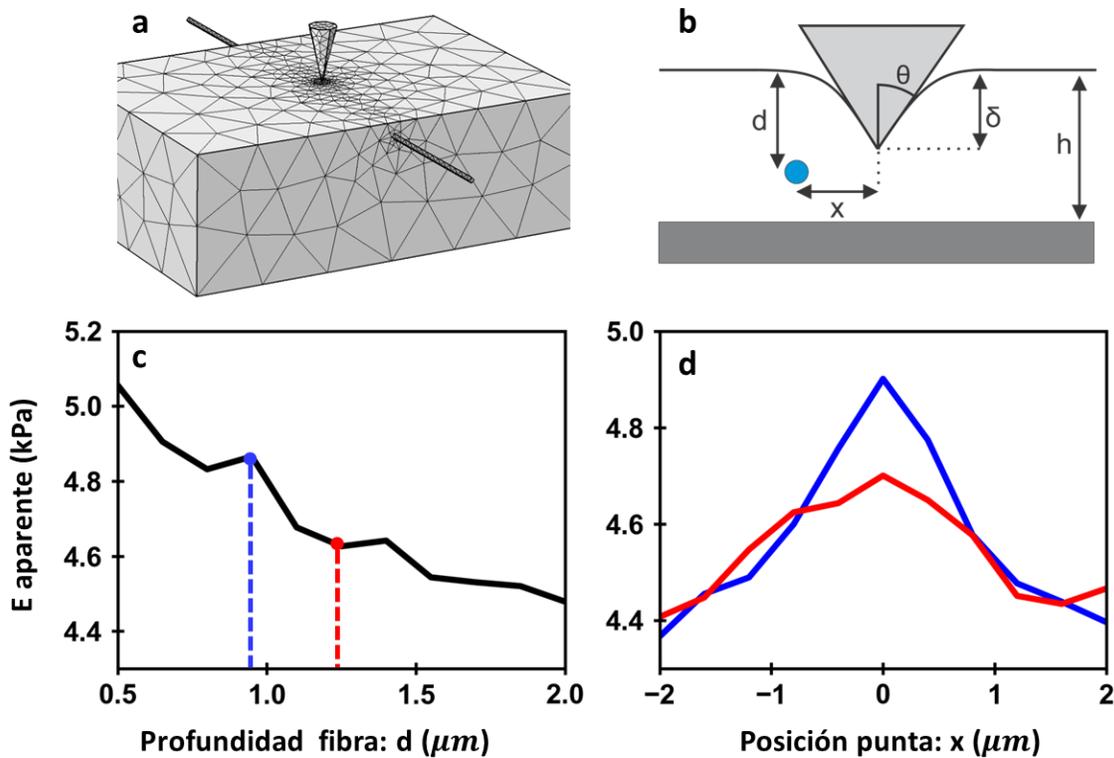


Fig. 6-8: Rigidez aparente de una fibra. (a) Esquema de la simulación FEM. (b) La fibra se encuentra a una profundidad d y a una distancia x de la punta, que penetra una profundidad máxima δ . (c) Módulo de Young aparente en función de la profundidad de la fibra. (d) Módulo de Young aparente en función de la distancia lateral punta-muestra, para dos profundidades de fibra.

En primer lugar indentamos (hasta una micra de profundidad) justo encima de la fibra (es decir $x = 0$ en el panel b) y vemos cual es el módulo de Young aparente en función de la profundidad a la cual se encuentre la fibra. Definimos módulo de Young aparente como el valor que obtendríamos si ajustáramos la respuesta de la combinación *fibra+matriz* a un material elástico homogéneo. Como podemos ver en el panel c, este módulo de Young aparente va aumentando según la fibra se encuentra más cerca de la superficie, pero de forma monótonica, sin que se pueda distinguir una profundidad crítica donde la respuesta de la fibra aumente de manera drástica. Es decir, la fibra no “aparece” a ninguna profundidad, si no que va siendo más y más visible según se acerque a la superficie.

Sabiendo esto, vamos a colocar dos fibras a diferentes profundidades, una a $1.25 \mu\text{m}$ de la superficie

y otra a 900 nm de profundidad. Haciendo un escaneo horizontal sobre la muestra, obtendremos dos perfiles de módulos de Young aparentes, uno para cada una de las fibras. En el panel d, podemos ver los resultados de dichos escaneos. Como se puede ver, la fibra es visible en ambos, ya que tenemos un máximo de rigidez aparente justo cuando la punta está encima de la misma. Sin embargo, la fibra en un caso está enterrada por debajo de la indentación máxima (que es de $1 \mu\text{m}$), y en el otro se encuentra por encima. Esto explica por qué es tan difícil de ver diferencias entre cortes a diferentes profundidades, ya que la fibra siempre aparecerá en un escaneo, independientemente de su distancia a la superficie. Sin embargo, lo que sí cambia entre una fibra profunda y una más superficial es la magnitud máxima de su módulo de Young aparente (los picos de las dos curvas tienen diferente magnitud). Vamos a utilizar este hecho para intentar obtener una tomografía de la célula

Tomografía de rigidez constante

Hemos visto que una fibra, aunque sea profunda, se puede ver en cualquier corte de la matriz 3D de rigidez, solo que su dureza aparente es baja. Entonces, suponiendo que todas las fibras tuvieran la misma rigidez intrínseca, su dureza aparente sería un marcador de la profundidad a la cual están “enterradas”. Veamos la figura 6-9. Si obtenemos la imagen de rigideces de la estructura de dos fibras situadas a diferentes profundidades, ambas fibras aparecerán superpuestas. Sin embargo, si aplicamos un filtro por durezas, las fibras más profundas se verán en el filtro de menor dureza, mientras que las fibras más superficiales aparecerán en el filtro de mayor dureza (panel b)

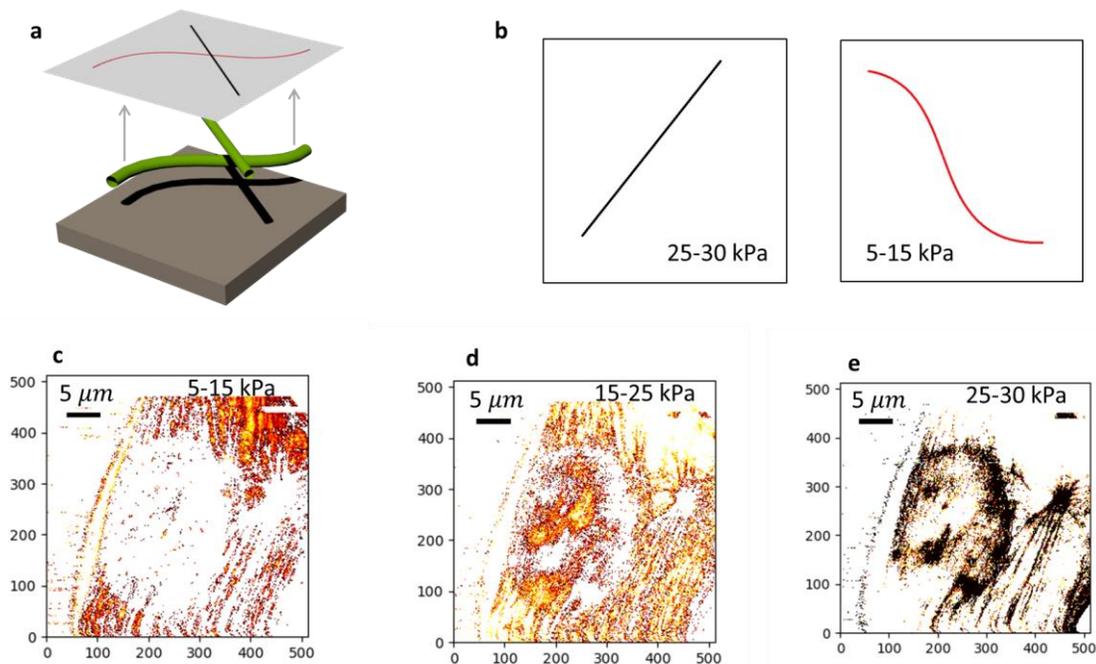


Fig. 6-9: Tomografía mediante filtro de dureza. (a) Dos fibras a diferentes profundidades se ven superpuestas en un mapa de módulo de Young. (b) Podemos diferenciarlas por sus diferentes valores del rigidez aparente. (c) Modulo de Young filtrado entre 5 y 15 kPa. (d) Modulo de Young filtrado entre 15 y 25 kPa. (e) Modulo de Young filtrado entre 25 y 30 kPa.

Vamos a intentar probar esta idea en nuestros datos experimentales. En los paneles c, d y e podemos ver los resultados de dicho análisis. Hemos aplicado tres niveles de filtrado al mapa 2D de módulos de Young, obteniendo tres imágenes, una para cada uno de los filtros. Podemos ver como existen diferencias significativas entre ellas. Por ejemplo, la estructura de estrella aparece solo cuando aplicamos el filtro de máxima rigidez (entre 25 y 30 kPa), por lo que podemos deducir que esta estructura se encuentra cercana a la superficie.

Si bien esta técnica nos permite obtener resultados cualitativos, calcular y cuantificar exactamente las profundidades de cada elemento de las imágenes es un problema aún sin resolver.

6.4 Conclusiones

En este capítulo hemos intentado caracterizar la organización interna de la célula, es decir, no solo ofrecer un valor medio de sus parámetros viscoelásticos, como hicimos en capítulos anteriores. Para lograrlo hemos usado y comparado entre si diferentes metodologías.

Primeramente, para cuantificar la organización estructural del citoesqueleto, hemos usado la topografía dada por el AFM en modo contacto, donde un filtrado de las bajas frecuencias nos permite obtener imágenes de gran resolución. Usando estas imágenes hemos cuantificado la densidad y orientación de las fibras, la cual es claramente diferente en las distintas regiones de la célula. Hemos visto que la densidad de fibras se relaciona con la viscosidad, de la forma que esperaríamos según el modelo poroelástico.

Por otro lado hemos creado mapas volumétricos (matrices tridimensionales) del módulo de Young y de la viscosidad, organizando la información dada por las curvas de fuerza en forma de matrices tridimensionales. De dichas matrices podemos obtener valores promedios, secciones de planos... Realizando un promedio de la valores en el eje vertical obtuvimos imágenes 2D del módulo de Young y de la viscosidad. La primera nos permitió localizar y cuantificar las propiedades del citoesqueleto, mientras que la segunda nos permitió localizar los nucléolos. Ambas son sensibles al núcleo de la célula.

Para obtener la posición vertical de las fibras nos hemos centrado en la matriz 3D de rigidez, demostrando que los cortes a diferentes profundidades no dan los resultados esperados. Hemos visto que esto es debido a que la resolución vertical es limitada, ya que la punta es sensible a estructuras que se encuentran a mayor profundidad que la indentación de medida. Sin embargo, el filtrar la imagen de módulo de Young en función de las rigideces aparentes permite realizar una “pseudotomografía”, asignando a los objetos más blandos una mayor profundidad.

A.0 Introducción

Para confirmar de forma independiente los resultados analíticos obtenidos en el texto las simulaciones cumplen un papel fundamental. En este trabajo hemos utilizado simulaciones de elementos finitos [136], usando un software comercial llamado COMSOL [137]. El tratamiento y procesado de los datos obtenidos fue realizado con scripts de Python.

A.1 Descripción de las simulaciones

COMSOL calcula soluciones a ecuaciones diferenciales del tipo 2-4 o 2-15, una vez que se proporcionen las condiciones de contorno y la geometría adecuadas. En nuestro caso (ver figura A-1) la geometría de la muestra es un cilindro de unos 50 μm de radio. Este radio es suficiente para que compararlo con nuestras ecuaciones (que suponen que el radio es infinito), pero no tan grande como para que el tiempo de simulación no sea manejable. La altura del cilindro dependerá de si queremos simular una muestra infinita (en cuyo caso utilizaremos también 50 μm) o un caso finito (en cuyo caso pondremos el valor que queramos simular). Las condiciones de contorno serán de cero tensiones en los bordes del cilindro (naranja en el panel a) y en la parte superior del mismo (verde en panel a), y de cero desplazamiento en la parte inferior del mismo. El programa calculará automáticamente el área de contacto entre la muestra y el indentador, dentro de cierta zona preasignada (turquesa en el panel b) por el usuario.

Una vez definidas las condiciones de contorno y la geometría, todo el modelo se descompondrá en un número finito de puntos (elementos). Cuantos más elementos, mayor precisión, pero también mayor tiempo de cálculo, por lo que el mallado será más denso cerca del indentador, y menos preciso en zonas alejadas del mismo (ver panel c).

El mallado transforma el problema elástico en un sistema de ecuaciones lineales, relativamente sencillo de resolver. Por lo tanto, una vez indicado el mallado y las condiciones de contorno, el programa resuelve este sistema matricial, solución que tendrá que calcular para cada una de las indentaciones que queramos. Cada indentación suele necesitar alrededor de medio minuto para converger, por lo que para unos 100 puntos de una curva de fuerza-indentación necesitaremos una hora, más o menos. Una vez obtenida esta solución, podemos representar diferentes variables, como por ejemplo la energía elástica (ver panel d).

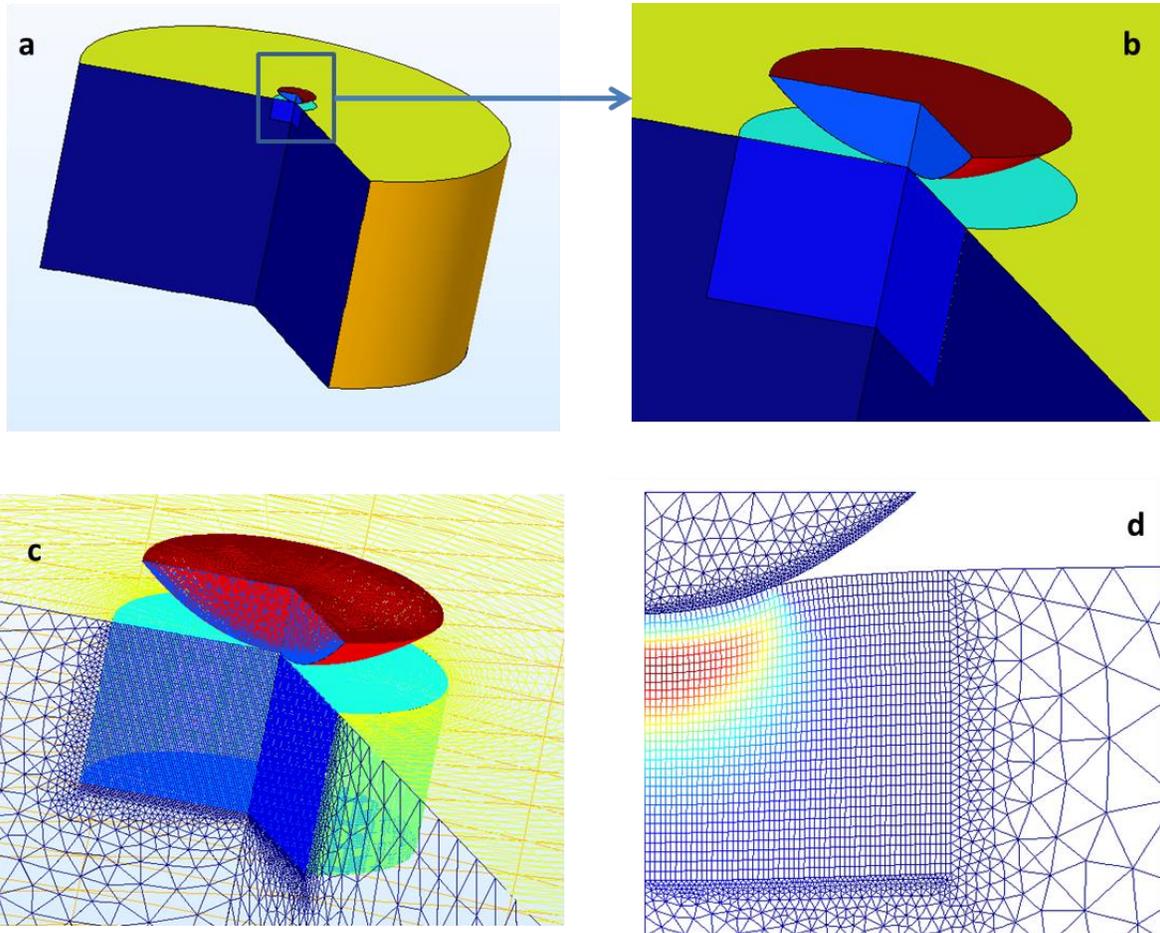


Fig. A-1: Descripción del software usado para las simulaciones FEM (a) Corte de la muestra con un indentador (en este caso una semiesfera) justo encima. (b) Detalle de la zona de indentación con las diferentes regiones (c) Tanto la muestra como el indentador se discretizan en dominios, lo que trasforma el problema elástico en un sistema de ecuaciones lineales. (d) Sección de la geometría donde vemos la distribución de energía elástica durante la indentación.

A.2 Ejemplos particulares simulados en esta tesis

En la figura A-2 podemos ver las secciones de las 6 geometrías usadas en esta tesis (salvo un caso especial en el capítulo 6). En total son 3 tipos de punta, combinadas con dos tamaños de muestra, uno finito (de un grosor de 2.5 μm) y otro “infinito” de 50 μm de grosor. Los valores de elasticidad siempre han sido de 4 kPa (como los obtenidos en el experimento del capítulo 2). La viscosidad varía desde 100 Pa s para el caso viscoelástico, hasta 1 Pa s para el caso puramente elástico. El no utilizar el valor exacto de 0 Pa s para este último caso (como sería correcto) se debe a que añadir un poco de viscosidad estabiliza la convergencia de las simulaciones, sin afectar significativamente al valor numérico de las soluciones.

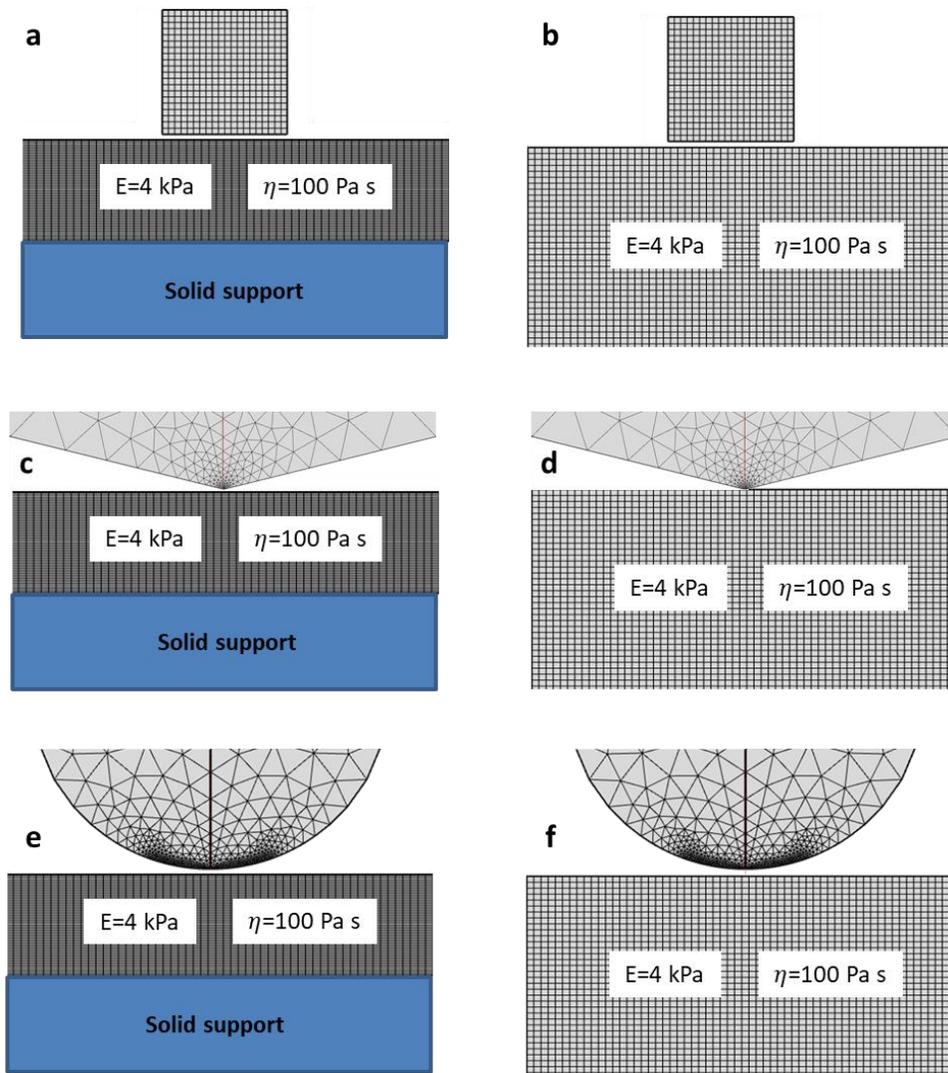


Fig. A-2: Secciones de los ejemplos simulados en esta tesis mediante FEM. (a) Cilindro indentando una muestra finita. (b) Cilindro indentando una muestra infinita. (c) Cono indentando una muestra finita. (d) Cono indentando una muestra infinita. (e) Esfera indentando una muestra finita. (f) Esfera indentando una muestra infinita.

En las diferentes simulaciones realizadas en el texto principal pondremos una figura similar a la anterior, con los valores concretos utilizados en cada caso. Los mallados, parámetros de convergencia... son similares en todas las simulaciones.

B. Transformadas integrales

B.0 Introducción

La ventaja de utilizar transformadas integrales es que los operadores lineales (derivadas, integrales y

productos de convolución) en el dominio del tiempo se transforman en simples multiplicaciones y divisiones en el dominio transformado. Esto simplifica enormemente la resolución de los problemas, aunque reconvertir las soluciones obtenidas al dominio temporal puede resultar bastante costoso en algunas ocasiones. La idea básica consiste en transformar la función inicial en el dominio temporal $f(t)$ mediante un operador integral T , el cual nos devuelve otra función equivalente $\hat{f}(p)$, definida en otro dominio.

$$T[f(t)] = \int_a^b f(t)K(p, t)dt = \hat{f}(p) \quad \text{B-1}$$

El núcleo de la integral $K(p, t)$ es una función bidimensional que define el tipo de transformada. Los límites de integración a y b también serán diferentes en función la transformada a escoger. En esta tesis vamos a utilizar solo dos transformadas integrales en particular, la transformada de Laplace y la transformada de Fourier.

B.1 Transformada de Laplace

La transformada de Laplace es ampliamente utilizada en tratamiento de señales e ingeniería eléctrica. Esto debido a que el núcleo de la integral está dado por Power-lawes decrecientes

$$K(p, t) = e^{-pt} \quad \text{B-2}$$

El cual se adapta muy bien a como un sistema amortigua una excitación. En nuestro caso queremos ver como la deformación “absorbe” una excitación en fuerzas, por lo que utilizar este núcleo tiene bastante sentido. Vamos entonces a estudiar sus propiedades.

B.1.1 Definición

Supongamos que tenemos una función definida para tiempo positivo $f(t)$. La transformada de Laplace de dicha función estará definida por:

$$L[f(t)] = \hat{f}(p) = \int_0^{+\infty} f(t)e^{-pt} dt \quad \text{B-3}$$

B.1.2 Derivada temporal

Una propiedad muy útil de la transformada de Laplace es que la transformada de la derivada de una función es la transformada de esa función multiplicada por la coordenada laplaciana p . Para demostrar esto podemos aplicar la integración por partes a la transformada de la derivada:

$$\begin{aligned} L[\dot{f}(t)] &= \int_0^{+\infty} \dot{f}(t)e^{-pt} dt = f(t)e^{-pt} \Big|_0^{+\infty} + s \int_0^{+\infty} f(t)e^{-pt} dt \\ &= p\hat{f}(p) \end{aligned} \quad \text{B-4}$$

Hemos supuesto que $f(0) = f(\infty) = 0$, es decir, que la función es cero a principio del experimento y a tiempos muy lejanos.

B.1.3 Teorema de convolución

El teorema de convolución nos simplificará el cálculo de ciertas transformadas integrales que aparecen en la teoría de viscoelasticidad. Supongamos que tenemos una integral del tipo

$$h(t) = \int_0^t f(t - \tau)g(\tau)d\tau \quad \text{B-5}$$

Estas integrales son llamadas de convolución (véase, por ejemplo, la ecuación 2-5). El teorema de convolución nos dice que la transformada de Laplace de la función $h(t)$ está dada por

$$L[h(t)] = \int_0^{+\infty} \left[\int_0^t f(t - \tau)g(\tau)d\tau \right] e^{-pt} dt = L[f(t)]L[g(t)] \quad \text{B-6}$$

Es decir, que la transformada de la integral de convolución de dos funciones en el tiempo no es más que la multiplicación de las transformadas de ambas funciones.

$$\hat{h}(p) = \hat{f}(p)\hat{g}(p) \quad \text{B-7}$$

Se puede ver que esta expresión es bastante más fácil de manipular que su equivalente en el dominio temporal, la ecuación B-5.

B.2 Transformada de Fourier

Esta transformada fue propuesta y utilizada por Fourier para estudiar la distribución de temperaturas en una placa metálica. Sin embargo, su mayor utilidad reside en el análisis de cualquier sistema oscilatorio, ya que su núcleo está dado por

$$K(\omega, t) = e^{-i\omega t} = \cos(\omega t) + i \cdot \text{sen}(\omega t) \quad \text{B-8}$$

Lo que hace que se adapte extremadamente bien a cualquier tipo de señal que oscile en el tiempo. Dado que una gran parte de los estudios de AFM se llevan a cabo mediante la oscilación periódica de la punta, esta transformada es vital en este campo. Vamos, al igual que hicimos con la transformada de Laplace, a estudiar sus propiedades más importantes.

B.2.1 Definición

Supongamos que tenemos una función definida para cualquier tiempo $f(t)$. La transformada de Fourier de dicha función estará definida por:

$$F[f(t)] = \hat{f}(w) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)e^{-i\omega t} dt \quad \text{B-9}$$

B.2.2 Derivada temporal

Si queremos obtener la transformada de Fourier de la derivada temporal de una función, podemos aplicar el mismo truco que para la transformada de Laplace:

$$F[\dot{f}(t)] = \int_{-\infty}^{+\infty} \dot{f}(t)e^{-i\omega t} dt = f(t)e^{-i\omega t} \Big|_{-\infty}^{+\infty} + i\omega \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)e^{-i\omega t} dt = i\omega \hat{f}(\omega) \quad \text{B-10}$$

En este caso hemos supuesto que $f(-\infty) = f(\infty) = 0$, es decir, que la función es cero a para tiempos muy lejanos.

B.2.3 Teorema de convolución

Se puede demostrar un resultado similar para las integrales de convolución que el mostrado para las transformadas de Laplace. Si partimos de una integral de convolución entre dos funciones en el dominio del tiempo

$$h(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t - \tau)g(\tau)d\tau \quad \text{B-11}$$

La transformada de Fourier de $h(t)$ será la multiplicación de las transformadas de Fourier de las funciones $f(t)$ y $g(t)$

$$\hat{h}(\omega) = \hat{f}(\omega)\hat{g}(\omega) \quad \text{B-12}$$

De nuevo podemos ver la sencillez de B-12 en comparación con su equivalente en el dominio del tiempo, la ecuación B-11.

C. Fundamentos de teoría de la elasticidad

C.1 Ecuación fundamental

Vamos a explicar muy por encima como obtener la ecuación de la elasticidad en la que basamos todo lo demás. Para ello seguiremos la deducción dada por Landau. Supongamos que tenemos un sólido tridimensional. Cada uno de los puntos del sólido tendrá una posición relativa a cierto sistema de referencia, definida por tres coordenadas: x_1, x_2, x_3 . Para simplificar, definiremos esta posición como x_i , donde el índice i recorrerá las tres dimensiones. Si deformamos el cuerpo, las posiciones de cada uno de los puntos del sólido cambiarán, estando las nuevas definidas por otro conjunto de coordenadas $x_j'(x_i)$. Podemos definir entonces un campo de deformaciones para el sólido, en cada una de las direcciones:

$$u_j(x_i) = x_j'(x_i) - x_i \quad \text{C-1}$$

Donde $u_j(x_i)$ nos dice cuanto se ha movido cada punto situado inicialmente en x_i , en la dirección j . Teniendo el vector $\bar{u}(x_i)$ sabremos perfectamente como se ha deformado nuestro sólido.

Ahora queremos analizar cómo cambia la distancia entre dos puntos muy cercanos en función del campo de deformaciones $\bar{u}(x_i)$. Inicialmente la distancia entre esos dos puntos estará dada por

$$(dl)^2 = (dx_i)^2 \quad \text{C-2}$$

Donde hemos aplicado el criterio sumatorio de Einstein para tensores. Después de la deformación tendremos

$$(dl')^2 = (dx_i')^2 = \left(dx_i + \frac{\partial u_i}{\partial x_k} dx_k \right)^2 \quad \text{C-3}$$

La diferencia entre distancias antes y después de la deformación se puede encontrar restando C-3 y C-2. Llevando a cabo las simplificaciones adecuadas tenemos:

$$(dl')^2 = (dl)^2 + 2u_{ik} dx_i dx_k \quad \text{C-4}$$

Donde u_{ij} es el llamado tensor de deformaciones, que explícitamente tiene la siguiente forma

$$u_{ik} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_k} + \frac{\partial u_k}{\partial x_i} + \frac{\partial u_i}{\partial x_j} \frac{\partial u_j}{\partial x_k} \right) \quad \text{C-5}$$

Este tensor de deformaciones tiene un término cuadrático $\frac{\partial u_i}{\partial x_j} \frac{\partial u_j}{\partial x_k}$, lo que provoca una no linealidad que no depende del material estudiado. Es decir, aunque intrínsecamente el material se comporte de forma lineal, vamos a tener esta no linealidad geométrica. Sin embargo, si las deformaciones son muy pequeñas, podemos eliminar dicho término, obteniendo un tensor de deformaciones linealizado

$$u_{ik} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_k} + \frac{\partial u_k}{\partial x_i} \right) \quad \text{C-6}$$

Que es el que usaremos en esta tesis.

Como la energía de deformación U tiene que ser función de los cambios de los cuadrados de las distancias entre puntos del sólido (C-2), tiene entonces que ser función también de los elementos del tensor de deformaciones linealizado (C-5).

$$U = U(u_{ik}) \quad \text{C-7}$$

Para calcular la forma explícita de la función de la energía C-4, usaremos dos razonamientos extra. El primero es que, dado que la energía siempre es positiva, tiene que ser función de combinaciones cuadráticas de los términos del tensor de deformaciones. La segunda es que, si suponemos que el sólido es isótropo, estas combinaciones tienen que ser invariantes del tensor (La energía no puede depender del sistema de coordenadas). Se sabe que un tensor de segundo orden solo tiene dos invariantes cuadráticos, por lo que una fórmula de la energía podría tener la forma:

$$U = U_0 + \frac{1}{2} \lambda u_{ii}^2 + \mu u_{ik}^2 \quad \text{C-8}$$

Las dos constantes λ y μ son los llamados coeficientes de Lamé. Podríamos extender la fórmula C-7 con términos de orden 4, 6... con lo que obtendríamos ecuaciones para la energía no lineales. Esta fuente de linealidad si depende del material, por lo que es intrínsecamente diferente de la geométrica

anteriormente considerada.

En la deducción de C-7 acabamos de demostrar que las propiedades elásticas de un sólido isótropo están descritas por solo dos variables independientes. Para calcular las tensiones, solo tenemos que recordar que la fuerza es la derivada de la energía. Si derivamos la fórmula C-7, y reordenamos los términos de la forma adecuada tendremos que

$$\sigma_{ik} = K u_{ll} \delta_{ik} + 2G \left(u_{ik} - \frac{1}{3} u_{ll} \delta_{ik} \right) \quad \text{C-9}$$

Donde, al reordenar los términos han aparecido dos nuevas constantes, K (módulo de compresibilidad) y G (módulo de cortadura). Esta fórmula es el punto de partida del capítulo 2 (ecuación 2-3).

C.2 Tabla de relaciones entre los parámetros

En el capítulo 2 vimos que las ecuaciones diferenciales de la elasticidad para un sólido elástico isótropo dependían de solo dos parámetros. Sin embargo, estos dos parámetros podían escogerse con total libertad, dependiendo del experimento que quisiéramos hacer. Si por ejemplo intentamos variar el volumen del material mediríamos el módulo de compresibilidad K, si lo intentamos estirar mediríamos el módulo de Young E, etc La relación entre los parámetros más habituales se da en la siguiente tabla:

	$K =$	$E =$	$G =$	$\nu =$
(K, E)	—	—	$\frac{3KE}{9K - E}$	$\frac{3K - E}{6K}$
(K, G)	—	$\frac{9KG}{3K + G}$	—	$\frac{3K - 2G}{2(3K + G)}$
(K, ν)	—	$3K(1 - 2\nu)$	$\frac{3K(1 - 2\nu)}{2(1 + \nu)}$	—
(E, G)	$\frac{EG}{3(3G - E)}$	—	—	$\frac{E}{2G} - 1$
(E, ν)	$\frac{E}{3(1 - 2\nu)}$	—	$\frac{E}{2(1 + \nu)}$	—
(G, ν)	$\frac{2G(1 + \nu)}{3(1 - 2\nu)}$	$2G(1 + \nu)$	—	—

C-10

En la situación especial que el material fuera incompresible, el módulo de compresibilidad será por definición infinito (necesitaríamos infinita fuerza para variar el volumen del material):

$$K = \infty \quad \text{C-11}$$

Lo que reduce la tabla anterior a las tres siguientes relaciones

$$\begin{aligned} \nu &= 0.5 \\ E &= 3G \\ \lambda &= \infty \end{aligned} \qquad \text{C-12}$$

D. Modelos de viscoelasticidad

D.0 Introducción

Si en el caso elástico cada experimento nos proporcionaba un escalar, en el caso de un material viscoelástico el mismo experimento tiene asociada una función de relajación. Esta función representa la respuesta en fuerza cuando aplicamos una deformación unitaria al sistema (es decir, comprimimos el sistema exactamente una unidad de deformación, y vemos cómo responde la fuerza con el tiempo). De nuevo, dependiendo del experimento que hagamos, obtendremos una función de relajación de compresibilidad, de módulo de Young... Una vez escogido el experimento, intentaremos ajustar la función de relajación a un modelo unidimensional de función de relajación viscoelástica.

D.1 Elementos básicos para los modelos de relajación

Aunque existen infinitos modelos para funciones de relajación viscoelásticas lineales [115], aquí detallaremos las más habituales. Para facilitar el cálculo de modelos más complejos, trabajaremos en el dominio de Laplace. En dicho dominio la función de relajación es la combinación (en serie o en paralelo) de las funciones de relajación de los elementos a combinar. En nuestro caso las funciones de relajación de los dos elementos base (muelles y amortiguadores) serán:

		$\varphi(t)$	$\hat{\varphi}(p)$
Muelle		$\varphi(t) = E$	$\hat{\varphi}(p) = \frac{E}{p}$
Disipador		$\varphi(t) = \eta_E \delta(t)$	$\hat{\varphi}(p) = \eta_E$

D-1

Es importante notar que estos modelos se definen para tiempos positivos, siendo la función de relajación de todos ellos igual a cero en tiempos negativos.

$$\varphi(t) = 0 \qquad t < 0 \qquad \text{D-2}$$

Es decir, antes de aplicar la deformación unitaria en tiempo cero, el sistema está en reposo total.

D.2 Diferentes modelos

D.2.1 Kelvin-Voigt

El modelo de Kelvin-Voigt consiste en un muelle en paralelo con un amortiguador

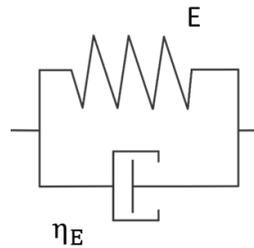


Fig. D-2 Modelo de Kelvin-Voigt

La función de relajación estará dada por la suma en paralelo de estos dos elementos, que en el dominio de Laplace será:

$$\hat{\varphi}_{KV}(p) = \frac{E}{p} + \eta_E \quad \text{D-3}$$

Transformado dicha expresión al dominio del tiempo tendremos la expresión final para la función de relajación de dicho sistema:

$$\varphi_{KV}(t) = E + \eta_E \delta(t) \quad \text{D-4}$$

De esta fórmula podemos deducir el llamado tiempo de relajación, dado por el ratio entre la viscosidad y el módulo de Young:

$$\tau = \frac{\eta_E}{E} \quad \text{D-5}$$

Si las medidas se realizaran a mediante una oscilación sinusoidal de frecuencia angular ω , la energía absorbida por el sistema en un ciclo será proporcional al llamado “*Loss modulus*”, que se define como:

$$E_{loss} = \omega \eta_E \quad \text{D-6}$$

Dicha variable se utiliza habitualmente en los experimentos de AFM dinámico para cuantificar la disipación.

Es importante notar que en la bibliografía se suele hablar del coeficiente de viscosidad en cortante (η_G). Utilizando las fórmulas que relacionan los distintos coeficientes de elasticidad, podemos (en el caso de que el coeficiente de Poisson sea constante) expresar D-2 como:

$$\varphi_{KV}(t) = E + 2(1 + \nu)\eta_G \delta(t) \quad \text{D-7}$$

En el caso de un material incompresible ($\nu = 0.5$), la ecuación sería

$$\varphi_{KV}(t) = E + 3\eta_G\delta(t) \quad \text{D-8}$$

D.2.2 SLS

El modelo de SLS (*Standard Linear Solid*, sólido estándar lineal) tiene dos configuraciones diferentes, aunque equivalentes, de tres elementos:

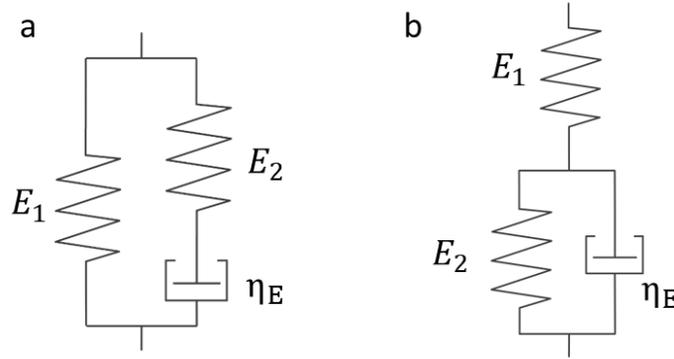


Fig. D-3: Modelos de SLS. (a) Tipo Maxwell. (b) Tipo Voigt.

La función de relajación de la primera configuración (llamada de Maxwell, panel a en la figura D-3) estará dada, en el dominio de Laplace, por la combinación de sus elementos en serie y en paralelo.

$$\hat{\varphi}_{SLS}(p) = \frac{E_1}{p} + \frac{\frac{\eta_E E_2}{p}}{\eta_E + \frac{E_2}{p}} = \frac{E_1}{p} + \frac{\eta_E E_2}{p\eta_E + E_2} \quad \text{D-9}$$

De forma que la antitransformada de Laplace de esta expresión nos dará la función de relajación temporal:

$$\varphi_{SLS}(t) = E_1 + E_2 e^{-\frac{E_2}{\eta_E}t} \quad \text{D-9}$$

Y para la segunda (llamada de Voigt), si procedemos de la misma forma tendremos:

$$\varphi_{SLS}(t) = \frac{E_1 E_2}{E_1 + E_2} + \frac{E_1 E_1}{E_1 + E_2} e^{-\frac{(E_1 + E_2)}{\eta_E}t} \quad \text{D-10}$$

Si bien ambos sistemas son equivalentes (dando los valores adecuados a los parámetros, claro está), utilizaremos la primera expresión por ser más sencilla. De nuevo, en el caso incompresible podríamos expresar las ecuaciones en función de la viscosidad en cortante

$$\varphi_{SLs}(t) = E_1 + E_2 e^{-\frac{E_2}{3\eta G}t} \quad D-11$$

D.2.3 Modelo Power-law

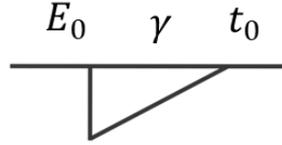


Fig. D-4: Modelo Power-law.

Podemos reescribir el modelo de Kelvin-Voigt en el dominio de Laplace (ecuación D-1) de la siguiente forma:

$$\hat{\varphi}_{KV}(p) = \frac{E}{p^1} + \frac{\eta_E}{p^0} \quad D-12$$

De esta forma el elemento con la variable p elevada a 1 es la parte elástica y el que contiene p elevada a 0 está relacionado con la componente viscosa. Podemos, entonces, proponer un elemento a medio camino entre el muelle y el amortiguador, definiendo su función de relajación en el dominio de Laplace como

$$\hat{\varphi}_{EX}(p) = \frac{\alpha}{p^{-\gamma+1}} \quad D-13$$

Donde el exponente γ puede variar entre los valores de 0 (Sistema elástico puro) a 1 (sistema totalmente viscoso). El coeficiente alfa nos indicará la “dureza” del elemento, aunque dado que no podemos interpretar el sistema como puramente elástico o viscoso, esta “dureza” no se puede interpretar como “rigidez” o “viscosidad” de forma clara. Si realizamos la antitransformada de Laplace podemos obtener la función de relajación en el dominio temporal

$$\varphi_{EX}(t) = \alpha t^{-\gamma} \quad D-14$$

Un problema de esta fórmula es que las dimensiones del parámetro α dependen del valor del otro parámetro del modelo γ (dimensionalmente $E_0 \propto \frac{\text{Newtons}}{\text{metro}} (\text{segundos})^\gamma$). Para evitar este problema dimensional, en la bibliografía [138] se suelen definir la constante α como una combinación de un tiempo de referencia t_0 y un módulo de Young equivalente E_0

$$\alpha = E_0 t_0^\gamma \quad D-15$$

De esta forma la función de relajación del modelo Power-law queda expresado como

$$\varphi_{EX}(t) = E_0 \left(\frac{t}{t_0}\right)^{-\gamma} \quad D-16$$

Podemos ver como en esta fórmula las dimensiones del factor E_0 son independientes del valor de γ . Es más, todas las constantes que aparecen tienen unas dimensiones físicas bien definidas: $E_0 \propto \frac{\text{Newtons}}{\text{metro}}$, $t_0 \propto \text{segundos}$ y $\gamma \propto \text{adimensional}$. Esta ecuación es la que utilizaremos en esta tesis.

D.3 Equivalencia general del modelo de Kelvin-Voigt

Supongamos que tenemos un sistema viscoelástico unidimensional definido por una función de relajación $\varphi(t)$. La fuerza F en función de la deformación x estará entonces dada por una expresión del tipo

$$F(t) = \int_0^t \varphi(t - \tau) \frac{d[x(\tau)]}{d\tau} d\tau \quad \text{D-17}$$

Si efectuamos la transformada de Fourier de esta expresión obtendremos, gracias al teorema de reciprocidad

$$\hat{F}(\omega) = \hat{\varphi}(\omega) \hat{x}(\omega) i\omega \quad \text{D-18}$$

Donde $\hat{\varphi}(\omega)$ es un número complejo que representa la respuesta del sistema viscoelástico a la frecuencia ω . Este número complejo está compuesto de una parte real φ_{real} y una imaginaria φ_{imag} .

Por otro lado, la transformada de Fourier (ecuación B-9) de la función de relajación temporal del modelo de Kelvin-Voigt (ecuación D-4) estará dada por

$$\hat{\varphi}_{KV}(\omega) = \int_0^{+\infty} [E + \eta_E \delta(t)] e^{-i\omega t} dt = \eta_E + i \frac{E}{\omega} \quad \text{D-19}$$

Donde la integral se realiza solo para tiempos positivos, ya que, como explicamos anteriormente, para tiempos negativos todas las funciones de relajación son cero, debido a la causalidad del sistema.

Podemos ver entonces que, para cada frecuencia ω_0 , podemos encontrar unos valores η_E y E que hagan que $\hat{\varphi}_{KV}(\omega_0)$ el modelo de sea igual a la función de relajación genérica de un sistema viscoelástico lineal dada en D-17:

$$\hat{\varphi}(\omega_0) = \varphi_{real}(\omega_0) + i\varphi_{imag}(\omega_0) = \eta_E + i \frac{E}{\omega_0} = \hat{\varphi}_{KV}(\omega_0) \quad \text{D-20}$$

Es decir, para cada sistema viscoelástico lineal definido por una función de relajación $\varphi(t)$, existe un modelo de Kelvin-Voigt que es totalmente equivalente a una frecuencia ω_0 , y cuyos parámetros tienen los siguientes valores

$$\begin{aligned} \eta_E &= \varphi_{real}(\omega_0) \\ E &= \omega_0 \varphi_{imag}(\omega_0) \end{aligned} \quad \text{D-21}$$

Por lo que hemos demostrado la equivalencia general del modelo de Kelvin-Voigt.

D.4 Tabla de relaciones entre las funcionales isotrópicas de la viscoelasticidad

En el capítulo 2 vimos la equivalencia formal entre las constantes de la elasticidad y los operadores viscoelásticos en el dominio de Laplace. De esta forma podemos dar un equivalente a la tabla C-10 de parámetros elásticos, pero para el caso viscoelástico y en el dominio de Laplace.

	$\hat{\Psi}_K =$	$\hat{\Psi}_E =$	$\hat{\Psi}_G =$	$\hat{\Psi}_\nu =$
$(\hat{\Psi}_K, \hat{\Psi}_E)$	–	–	$\frac{3\hat{\Psi}_K\hat{\Psi}_E}{9\hat{\Psi}_K - \hat{\Psi}_E}$	$\frac{3\hat{\Psi}_K - \hat{\Psi}_E}{6\hat{\Psi}_K}$
$(\hat{\Psi}_K, \hat{\Psi}_G)$	–	$\frac{9\hat{\Psi}_K\hat{\Psi}_G}{3\hat{\Psi}_K + \hat{\Psi}_G}$	–	$\frac{3\hat{\Psi}_K - 2\hat{\Psi}_G}{2(3\hat{\Psi}_K + \hat{\Psi}_G)}$
$(\hat{\Psi}_K, \hat{\Psi}_\nu)$	–	$3K(1 - 2\hat{\Psi}_\nu)$	$\frac{3K(1 - 2\hat{\Psi}_\nu)}{2(1 + \hat{\Psi}_\nu)}$	–
$(\hat{\Psi}_E, \hat{\Psi}_G)$	$\frac{\hat{\Psi}_E\hat{\Psi}_G}{3(3G - \hat{\Psi}_E)}$	–	–	$\frac{\hat{\Psi}_E}{2\hat{\Psi}_G} - 1$
$(\hat{\Psi}_E, \hat{\Psi}_\nu)$	$\frac{\hat{\Psi}_E}{3(1 - 2\nu)}$	–	$\frac{\hat{\Psi}_E}{2(1 + \hat{\Psi}_\nu)}$	–
$(\hat{\Psi}_G, \hat{\Psi}_\nu)$	$\frac{2\hat{\Psi}_G(1 + \hat{\Psi}_\nu)}{3(1 - 2\hat{\Psi}_\nu)}$	$2\hat{\Psi}_G(1 + \hat{\Psi}_\nu)$	–	–

D-22

En la situación especial que el material fuera incompresible, el módulo de compresibilidad será por definición infinito (necesitaríamos infinita fuerza para variar el volumen del material):

$$K = \infty \quad \text{D-23}$$

Lo que reduce la tabla anterior a las tres siguientes relaciones

$$\begin{aligned} \hat{\Psi}_\nu &= 0.5 \\ \hat{\Psi}_E &= 3\hat{\Psi}_G \\ \hat{\Psi}_\lambda &= \infty \end{aligned} \quad \text{D-24}$$

Publicaciones

Durante el desarrollo de esta tesis, la mayor parte de los resultados han sido publicados en diversos artículos.

1- Guzman, H.V., P.D. Garcia, and R. Garcia, *Dynamic force microscopy simulator (dForce): A tool for planning and understanding tapping and bimodal AFM experiments*. Beilstein Journal of Nanotechnology, 2015. **6**: p. 369-379. [139]

2- Garcia, P.D., C.R. Guerrero, and R. Garcia, *Time-resolved nanomechanics of a single cell under the depolymerization of the cytoskeleton*. Nanoscale, 2017. **9**(33): p. 12051-12059. [140]

3- Garcia, P.D. and R. Garcia, *Determination of the Elastic Moduli of a Single Cell Cultured on a Rigid Support by Force Microscopy*. Biophysical Journal, 2018. **114**(12): p. 2923-2932. [141]

4- Garcia, P.D. and R. Garcia, *Determination of the viscoelastic properties of a single cell cultured on a rigid support by force microscopy*. Nanoscale, 2018. **10**(42): p. 19799-19809. [142]

Referencias

1. Karp, G., *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. John Wiley & Sons, 2009.
2. Cañadas, P., S. Wendling-Mansuy, and D. Isabey, *Frequency Response of a Viscoelastic Tensegrity Model: Structural Rearrangement Contribution to Cell Dynamics*. Journal of Biomechanical Engineering, 2005. **128**(4): p. 487-495.
3. Ingber, D.E., *TENSEGRITY: THE ARCHITECTURAL BASIS OF CELLULAR MECHANOTRANSDUCTION*. Annual Review of Physiology, 1997. **59**(1): p. 575-599.
4. Stamenović, D. and M.F. Coughlin, *The Role of Prestress and Architecture of the Cytoskeleton and Deformability of Cytoskeletal Filaments in Mechanics of Adherent Cells: a Quantitative Analysis*. Journal of Theoretical Biology, 1999. **201**(1): p. 63-74.
5. Sultan, C., D. Stamenović, and D.E. Ingber, *A Computational Tensegrity Model Predicts Dynamic Rheological Behaviors in Living Cells*. Annals of Biomedical Engineering, 2004. **32**(4): p. 520-530.
6. Kollmannsberger, P. and B. Fabry, *Linear and Nonlinear Rheology of Living Cells*. Annual Review of Materials Research, 2011. **41**(1): p. 75-97.
7. Wu, P.-H., et al., *A comparison of methods to assess cell mechanical properties*. Nature Methods, 2018. **15**(7): p. 491-498.
8. Thoumine, O. and A. Ott, *Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation*. J. Cell Sci., 1997. **110**.
9. Fernández, P., et al., *Shear rheology of a cell monolayer*. New J. Phys., 2007. **9**.
10. Guck, J., *Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence*. Biophys. J., 2005. **88**.
11. Guck, J., *The optical stretcher: a novel laser tool to micromanipulate cells*. Biophys. J., 2001. **81**.
12. Guck, J., et al., *Optical deformability of soft biological dielectrics*. Phys. Rev. Lett., 2000. **84**.
13. Boyde, L., K.J. Chalut, and J. Guck, *Interaction of Gaussian beam with near-spherical particle: an analytic-numerical approach for assessing scattering and stresses*. J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis., 2009. **26**.
14. Chalut, K.J., et al., *Quantifying cellular differentiation by physical phenotype using digital holographic microscopy*. Integr. Biol. (Camb.), 2012. **4**.
15. Remmerbach, T.W., *Oral cancer diagnosis by mechanical phenotyping*. Cancer Res., 2009. **69**.
16. Schmidt, C.E., et al., *Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric, and regulated*. The Journal of Cell Biology, 1993. **123**(4): p. 977.
17. Balland, M., et al., *Power laws in microrheology experiments on living cells: Comparative analysis and modeling*. Physical Review E, 2006. **74**(2): p. 021911.
18. Wirtz, D., *Particle-tracking microrheology of living cells: principles and applications*. Annu. Rev. Biophys., 2009. **38**.
19. Wu, P.H., *High-throughput ballistic injection nanorheology to measure cell mechanics*. Nat. Protoc., 2012. **7**.
20. Lee, J.S., *Ballistic intracellular nanorheology reveals ROCK-hard cytoplasmic stiffening response to fluid flow*. J. Cell Sci., 2006. **119**.
21. Binnig, G., C.F. Quate, and C. Gerber, *Atomic force microscope*. Phys. Rev. Lett., 1986. **56**: p. 930-933.
22. Meyer, G. and N.M. Amer, *Novel optical approach to atomic force microscopy*. Appl. Phys.

- Lett., 1988. **53**: p. 1045-1047.
23. Dufrêne, Y.F., et al., *Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology*. Nature Nanotechnology, 2017. **12**: p. 295.
 24. Garcia, R. and R. Perez, *Dynamic atomic force microscopy methods*. Surf. Sci. Rep., 2002. **47**: p. 197-301.
 25. Giessibl, F.J., *Advances in atomic force microscopy*. Rev. Mod. Phys., 2003. **75**: p. 949-983.
 26. Garcia, R. and E.T. Herruzo, *The emergence of multifrequency force microscopy*. Nature Nanotechnology, 2012. **7**: p. 217.
 27. Dufrêne, Y.F., et al., *Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM*. Nature Methods, 2013. **10**: p. 847.
 28. Wang, D. and T.P. Russell, *Advances in Atomic Force Microscopy for Probing Polymer Structure and Properties*. Macromolecules, 2018. **51**(1): p. 3-24.
 29. Garcia, R., R. Magerle, and R. Perez, *Nanoscale compositional mapping with gentle forces*. Nature Mater., 2007. **6**: p. 405-411.
 30. Marius, C., L.Y. Seth, and V.T. Vladimir, *Recent advances in micromechanical characterization of polymer, biomaterial, and cell surfaces with atomic force microscopy*. Japanese Journal of Applied Physics, 2015. **54**(8S2): p. 08LA02.
 31. Herruzo, E.T., A.P. Perrino, and R. Garcia, *Fast nanomechanical spectroscopy of soft matter*. Nature Communications, 2014. **5**: p. 3126.
 32. Proksch, R., et al., *Practical loss tangent imaging with amplitude-modulated atomic force microscopy*. Journal of Applied Physics, 2016. **119**(13): p. 134901.
 33. Hung, K.N., I. Makiko, and N. Ken, *Elastic and viscoelastic characterization of inhomogeneous polymers by bimodal atomic force microscopy*. Japanese Journal of Applied Physics, 2016. **55**(8S1): p. 08NB06.
 34. Kocun, M., et al., *Fast, High Resolution, and Wide Modulus Range Nanomechanical Mapping with Bimodal Tapping Mode*. ACS Nano, 2017. **11**(10): p. 10097-10105.
 35. Dong, M., S. Husale, and O. Sahin, *Determination of protein structural flexibility by microsecond force spectroscopy*. Nature Nanotechnology, 2009. **4**: p. 514.
 36. Medalsy, I.D. and D.J. Müller, *Nanomechanical Properties of Proteins and Membranes Depend on Loading Rate and Electrostatic Interactions*. ACS Nano, 2013. **7**(3): p. 2642-2650.
 37. Perrino, A.P. and R. Garcia, *How soft is a single protein? The stress-strain curve of antibody pentamers with 5 pN and 50 pm resolutions*. Nanoscale, 2016. **8**(17): p. 9151-9158.
 38. Liu, L., et al., *Identification of a Novel Parallel beta-Strand Conformation within Molecular Monolayer of Amyloid Peptide*. Adv Sci (Weinh), 2016. **3**(6): p. 1500369.
 39. Amo, C.A., et al., *Mapping Elastic Properties of Heterogeneous Materials in Liquid with Angstrom-Scale Resolution*. ACS Nano, 2017. **11**(9): p. 8650-8659.
 40. Roos, W.H., R. Bruinsma, and G.J.L. Wuite, *Physical virology*. Nature Physics, 2010. **6**: p. 733.
 41. Ortega-Esteban, A., et al., *Monitoring dynamics of human adenovirus disassembly induced by mechanical fatigue*. Scientific Reports, 2013. **3**: p. 1434.
 42. Haase, K. and A.E. Pelling, *Investigating cell mechanics with atomic force microscopy*. Journal of The Royal Society Interface, 2015. **12**(104).
 43. Rotsch, C. and M. Radmacher, *Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study*. Biophysical Journal, 2000. **78**(1): p. 520-535.
 44. Alcaraz, J., et al., *Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy*. Biophys J, 2003. **84**(3): p. 2071-9.

45. Roduit, C., et al., *Stiffness tomography by atomic force microscopy*. Biophys J, 2009. **97**(2): p. 674-7.
46. Raman, A., et al., *Mapping nanomechanical properties of live cells using multi-harmonic atomic force microscopy*. Nature Nanotechnology, 2011. **6**: p. 809.
47. Vargas-Pinto, R., et al., *The Effect of the Endothelial Cell Cortex on Atomic Force Microscopy Measurements*. Biophysical Journal, 2013. **105**(2): p. 300-309.
48. Staunton, J.R., et al., *Correlating confocal microscopy and atomic force indentation reveals metastatic cancer cells stiffen during invasion into collagen I matrices*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 19686.
49. Rianna, C. and M. Radmacher, *Comparison of viscoelastic properties of cancer and normal thyroid cells on different stiffness substrates*. European Biophysics Journal, 2017. **46**(4): p. 309-324.
50. Christ, A.F., et al., *Mechanical difference between white and gray matter in the rat cerebellum measured by scanning force microscopy*. J Biomech, 2010. **43**(15): p. 2986-92.
51. Müller, D.J. and Y.F. Dufrêne, *Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface*. Trends in Cell Biology, 2011. **21**(8): p. 461-469.
52. Stewart, M.P., et al., *Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding*. Nature, 2011. **469**: p. 226.
53. Prass, M., et al., *Direct measurement of the lamellipodial protrusive force in a migrating cell*. The Journal of Cell Biology, 2006. **174**(6): p. 767.
54. Roduit, C., et al., *Stiffness Tomography by Atomic Force Microscopy*. Biophysical Journal, 2009. **97**(2): p. 674-677.
55. Gavara, N. and R.S. Chadwick, *Determination of the elastic moduli of thin samples and adherent cells using conical atomic force microscope tips*. Nature Nanotechnology, 2012. **7**: p. 733.
56. Rigato, A., et al., *Atomic Force Microscopy Mechanical Mapping of Micropatterned Cells Shows Adhesion Geometry-Dependent Mechanical Response on Local and Global Scales*. ACS Nano, 2015. **9**(6): p. 5846-5856.
57. Lekka, M., et al., *Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy*. European Biophysics Journal, 1999. **28**(4): p. 312-316.
58. Lekka, M., et al., *Cancer cell recognition – Mechanical phenotype*. Micron, 2012. **43**(12): p. 1259-1266.
59. Cross, S.E., et al., *Nanomechanical analysis of cells from cancer patients*. Nature Nanotech., 2007. **2**: p. 780-783.
60. Iyer, S., et al., *Atomic force microscopy detects differences in the surface brush of normal and cancerous cells*. Nat. Nanotechnol., 2009. **4**.
61. Plodinec, M., et al., *The nanomechanical signature of breast cancer*. Nature Nanotechnology, 2012. **7**: p. 757.
62. Ramos, J.R., et al., *The softening of human bladder cancer cells happens at an early stage of the malignancy process*. Beilstein Journal of Nanotechnology, 2014. **5**: p. 447-457.
63. Oberleithner, H., et al., *Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(41): p. 16281.
64. Reich, A., et al., *Surface morphology and mechanical properties of fibroblasts from scleroderma patients*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2009. **13**(8b): p. 1644-1652.
65. Fuhrmann, A., et al., *AFM stiffness nanotomography of normal, metaplastic and dysplastic human esophageal cells*. Phys Biol, 2011. **8**(1): p. 015007.
66. Xia, D., et al., *Hydrated Human Corneal Stroma Revealed by Quantitative Dynamic Atomic*

- Force Microscopy at Nanoscale*. ACS Nano, 2014. **8**(7): p. 6873-6882.
67. Zhang, S., et al., *Quantitative biomolecular imaging by dynamic nanomechanical mapping*. Chemical Society Reviews, 2014. **43**(21): p. 7412-7429.
68. Amo, C.A. and R. Garcia, *Fundamental High-Speed Limits in Single-Molecule, Single-Cell, and Nanoscale Force Spectroscopies*. ACS Nano, 2016. **10**(7): p. 7117-7124.
69. Blanchoin, L., et al., *Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility*. Physiological Reviews, 2014. **94**(1): p. 235-263.
70. Moeendarbary, E., et al., *The cytoplasm of living cells behaves as a poroelastic material*. Nature Materials, 2013. **12**: p. 253.
71. Rother, J., et al., *Atomic force microscopy-based microrheology reveals significant differences in the viscoelastic response between malignant and benign cell lines*. Open Biology, 2014. **4**(5): p. 140046.
72. Calzado-Martín, A., et al., *Effect of Actin Organization on the Stiffness of Living Breast Cancer Cells Revealed by Peak-Force Modulation Atomic Force Microscopy*. ACS Nano, 2016. **10**(3): p. 3365-3374.
73. Lim, C.T., E.H. Zhou, and S.T. Quek, *Mechanical models for living cells--a review*. J Biomech, 2006. **39**(2): p. 195-216.
74. Mahaffy, R.E., et al., *Scanning Probe-Based Frequency-Dependent Microrheology of Polymer Gels and Biological Cells*. Physical Review Letters, 2000. **85**(4): p. 880-883.
75. Vadillo-Rodriguez, V., T.J. Beveridge, and J.R. Dutcher, *Surface Viscoelasticity of Individual Gram-Negative Bacterial Cells Measured Using Atomic Force Microscopy*. Journal of Bacteriology, 2008. **190**(12): p. 4225-4232.
76. Hecht, F.M., et al., *Imaging viscoelastic properties of live cells by AFM: power-law rheology on the nanoscale*. Soft Matter, 2015. **11**(23): p. 4584-91.
77. Rigato, A., et al., *High-frequency microrheology reveals cytoskeleton dynamics in living cells*. Nature Physics, 2017. **13**: p. 771.
78. Efremov, Y.M., et al., *Measuring nanoscale viscoelastic parameters of cells directly from AFM force-displacement curves*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 1541.
79. Macis, M., F. Lugli, and F. Zerbetto, *Modeling Living Cells Response to Surface Tension and Chemical Patterns*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017. **9**(23): p. 19552-19561.
80. López-Guerra, E.A. and S.D. Solares, *Modeling viscoelasticity through spring-dashpot models in intermittent-contact atomic force microscopy*. Beilstein Journal of Nanotechnology, 2014. **5**: p. 2149-2163.
81. Cohen, S.R. and E. Kalfon-Cohen, *Dynamic nanoindentation by instrumented nanoindentation and force microscopy: a comparative review*. Beilstein Journal of Nanotechnology, 2013. **4**: p. 815-833.
82. Solares, S.D., *A simple and efficient quasi 3-dimensional viscoelastic model and software for simulation of tapping-mode atomic force microscopy*. Beilstein Journal of Nanotechnology, 2015. **6**: p. 2233-2241.
83. Susana, M.-F., et al., *Stress relaxation and creep on living cells with the atomic force microscope: a means to calculate elastic moduli and viscosities of cell components*. Nanotechnology, 2010. **21**(44): p. 445101.
84. Cartagena, A. and A. Raman, *Local Viscoelastic Properties of Live Cells Investigated Using Dynamic and Quasi-Static Atomic Force Microscopy Methods*. Biophysical Journal, 2014. **106**(5): p. 1033-1043.
85. Fischer-Friedrich, E., et al., *Rheology of the Active Cell Cortex in Mitosis*. Biophysical Journal, 2016. **111**(3): p. 589-600.
86. Cartagena-Rivera, A.X., et al., *Fast, multi-frequency, and quantitative nanomechanical*

- mapping of live cells using the atomic force microscope*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 11692.
87. Tamayo, J. and R. García, *Relationship between phase shift and energy dissipation in tapping-mode scanning force microscopy*. Applied Physics Letters, 1998. **73**(20): p. 2926-2928.
 88. Nawaz, S., et al., *Cell Visco-Elasticity Measured with AFM and Optical Trapping at Sub-Micrometer Deformations*. PLOS ONE, 2012. **7**(9): p. e45297.
 89. Garcia, R., et al., *Identification of nanoscale dissipation processes by dynamic atomic force microscopy*. Phys Rev Lett, 2006. **97**(1): p. 016103.
 90. Dimitriadis, E.K., et al., *Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope*. Biophysical Journal, 2002. **82**(5): p. 2798-2810.
 91. Andrew, R.H. and G.T. Charras, *Experimental validation of atomic force microscopy-based cell elasticity measurements*. Nanotechnology, 2011. **22**(34): p. 345102.
 92. Valero, C., et al., *Finite element simulation for the mechanical characterization of soft biological materials by atomic force microscopy*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2016. **62**: p. 222-235.
 93. Ding, Y., G.-K. Xu, and G.-F. Wang, *On the determination of elastic moduli of cells by AFM based indentation*. Scientific Reports, 2017. **7**: p. 45575.
 94. Managuli, V. and S. Roy, *Simultaneous Analysis of Elastic and Nonspecific Adhesive Properties of Thin Sample and Biological Cell Considering Bottom Substrate Effect*. Journal of Biomechanical Engineering, 2017. **139**(9): p. 091008-091008-10.
 95. Chadwick, R., *Axisymmetric Indentation of a Thin Incompressible Elastic Layer*. SIAM Journal on Applied Mathematics, 2002. **62**(5): p. 1520-1530.
 96. Gavara, N., *Combined strategies for optimal detection of the contact point in AFM force-indentation curves obtained on thin samples and adherent cells*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 21267.
 97. Sader, J.E., J. Lu, and P. Mulvaney, *Effect of cantilever geometry on the optical lever sensitivities and thermal noise method of the atomic force microscope*. Review of Scientific Instruments, 2014. **85**(11): p. 113702.
 98. Schillers, H., et al., *Standardized Nanomechanical Atomic Force Microscopy Procedure (SNAP) for Measuring Soft and Biological Samples*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 5117.
 99. Liu, R., M. Roman, and G. Yang, *Correction of the viscous drag induced errors in macromolecular manipulation experiments using atomic force microscope*. Review of Scientific Instruments, 2010. **81**(6): p. 063703.
 100. Berthold, T., et al., *Numerical Study of Hydrodynamic Forces for AFM Operations in Liquid*. Scanning, 2017. **2017**: p. 6286595.
 101. Tatara, Y., *On Compression of Rubber Elastic Sphere Over a Large Range of Displacements—Part 1: Theoretical Study*. Journal of Engineering Materials and Technology, 1991. **113**(3): p. 285-291.
 102. Dhaliwal, R.S. and I.S. Rau, *The axisymmetric boussinesq problem for a thick elastic layer under a punch of arbitrary profile*. International Journal of Engineering Science, 1970. **8**(10): p. 843-856.
 103. Gavara, N. and R.S. Chadwick, *Determination of the elastic moduli of thin samples and adherent cells using conical AFM tips*. Nature nanotechnology, 2012. **7**(11): p. 733-736.
 104. de Sousa, J.S., et al., *Analytical model of atomic-force-microscopy force curves in viscoelastic materials exhibiting power law relaxation*. Journal of Applied Physics, 2017. **121**(3): p. 034901.
 105. Moeendarbary, E., *The cytoplasm of living cells behaves as a poroelastic material*. Nat.

- Mater., 2013. **12**.
106. Eghiaian, F., A. Rigato, and S. Scheuring, *Structural, mechanical, and dynamical variability of the actin cortex in living cells*. Biophys J, 2015. **108**(6): p. 1330-1340.
 107. Diebold, A.C., *Subsurface imaging with scanning ultrasound holography*. Science, 2005. **310**: p. 61-62.
 108. Shekhawat, G., et al., *Ultrasound holography for noninvasive imaging of buried defects and interfaces for advanced interconnect architectures*. Appl. Phys. Lett., 2009. **95**: p. 263101.
 109. Shekhawat, G.S. and V.P. Dravid, *Nanoscale imaging of buried structures via scanning near-field ultrasound holography*. Science, 2005. **310**: p. 89-92.
 110. Reggente, M., et al., *Detection of stiff nanoparticles within cellular structures by contact resonance atomic force microscopy subsurface nanomechanical imaging*. Nanoscale, 2017. **9**(17): p. 5671-5676.
 111. Ebeling, D., B. Eslami, and S.D.J. Solares, *Visualizing the Subsurface of Soft Matter: Simultaneous Topographical Imaging, Depth Modulation, and Compositional Mapping with Triple Frequency Atomic Force Microscopy*. ACS Nano, 2013. **7**(11): p. 10387-10396.
 112. Perrino, A.P., et al., *Subsurface imaging of silicon nanowire circuits and iron oxide nanoparticles with sub-10 nm spatial resolution*. Nanotechnology, 2016. **27**(27): p. 275703.
 113. Radotić, K., et al., *Atomic Force Microscopy Stiffness Tomography on Living Arabidopsis thaliana Cells Reveals the Mechanical Properties of Surface and Deep Cell-Wall Layers during Growth*. Biophysical Journal, 2012. **103**(3): p. 386-394.
 114. Roduit, C., et al., *Stiffness tomography exploration of living and fixed macrophages*. Journal of Molecular Recognition, 2012. **25**(5): p. 241-246.
 115. Tschoegl, N.W., *Linear Viscoelastic Response*, in *The Phenomenological Theory of Linear Viscoelastic Behavior: An Introduction*, N.W. Tschoegl, Editor. 1989, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 35-68.
 116. Landau, L.D., et al., *CHAPTER I - FUNDAMENTAL EQUATIONS*, in *Theory of Elasticity (Third Edition)*. 1986, Butterworth-Heinemann: Oxford. p. 1-37.
 117. Sneddon, I.N., *The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile*. International Journal of Engineering Science, 1965. **3**(1): p. 47-57.
 118. Wilkes, R.P. and K.A. Athanasiou, *The Intrinsic Incompressibility of Osteoblast-like Cells*. Tissue Engineering, 1996. **2**(3): p. 167-181.
 119. Trickey, W.R., et al., *Determination of the Poisson's ratio of the cell: recovery properties of chondrocytes after release from complete micropipette aspiration*. Journal of Biomechanics, 2006. **39**(1): p. 78-87.
 120. Martínez-Martín, D., et al., *Inertial picobalance reveals fast mass fluctuations in mammalian cells*. Nature, 2017. **550**: p. 500.
 121. Hilton, H.H., *Implications and Constraints of Time-Independent Poisson Ratios in Linear Isotropic and Anisotropic Viscoelasticity*. Journal of elasticity and the physical science of solids, 2001. **63**(3): p. 221-251.
 122. Johnson, K.L., *Contact Mechanics*. 1985, Cambridge: Cambridge University Press.
 123. Hertz, H., *Über den Kontakt elastischer Körper*. J. Reine Angew Math., 1881. **92**.
 124. Ting, T.C.T., *The Contact Stresses Between a Rigid Indenter and a Viscoelastic Half-Space*. Journal of Applied Mechanics, 1966. **33**(4): p. 845-854.
 125. Lee, E.H. and J.R.M. Radok, *The Contact Problem for Viscoelastic Bodies*. Journal of Applied Mechanics, 1960. **27**(3): p. 438-444.
 126. Greenwood, J., *Contact between an axisymmetric indenter and a viscoelastic half-space*. Vol. 52. 2010. 829-835.

127. Sollich, P., *Rheological constitutive equation for a model of soft glassy materials*. Physical Review E, 1998. **58**(1): p. 738-759.
128. Gittes, F. and F.C. MacKintosh, *Dynamic shear modulus of a semiflexible polymer network*. Physical Review E, 1998. **58**(2): p. R1241-R1244.
129. Fletcher, D.A. and R.D. Mullins, *Cell mechanics and the cytoskeleton*. Nature, 2010. **463**: p. 485.
130. Barber, J.R. and F.A. Sturla, *Application of the reciprocal theorem to some problems for the elastic half-space*. Journal of the Mechanics and Physics of Solids, 1992. **40**(1): p. 17-25.
131. Shield, R.T., *Load-displacement relations for elastic bodies*. Zeitschrift für angewandte Mathematik und Physik ZAMP, 1967. **18**(5): p. 682-693.
132. Ting, T.C.T., *Contact Problems in the Linear Theory of Viscoelasticity*. Journal of Applied Mechanics, 1968. **35**(2): p. 248-254.
133. Kaufman, A.E., *Voxels as a Computational Representation of Geometry*. in The Computational Representation of Geometry. SIGGRAPH '94 Course Notes, 1994: p. 45.
134. Zernike, F., *How I Discovered Phase Contrast*. Science, 1955. **121**(3141): p. 345-349.
135. Kienberger, F., et al., *Improving the contrast of topographical AFM images by a simple averaging filter*. Ultramicroscopy, 2006. **106**(8): p. 822-828.
136. Zienkiewicz, O.C., R.L. Taylor, and J.Z. Zhu, *Chapter 7 - Elasticity: Two- and Three-Dimensional Finite Elements*, in *The Finite Element Method: its Basis and Fundamentals (Seventh Edition)*, O.C. Zienkiewicz, R.L. Taylor, and J.Z. Zhu, Editors. 2013, Butterworth-Heinemann: Oxford. p. 211-255.
137. COMSOL, *COMSOL Multiphysics® v. 5.2*. www.comsol.com. COMSOL AB, Stockholm, Sweden.
138. Prentice, J.H., *Dimensional Problem of the Power Law in Rheology*. Nature, 1968. **217**: p. 157.
139. Guzman, H.V., P.D. Garcia, and R. Garcia, *Dynamic force microscopy simulator (dForce): A tool for planning and understanding tapping and bimodal AFM experiments*. Beilstein Journal of Nanotechnology, 2015. **6**: p. 369-379.
140. Garcia, P.D., C.R. Guerrero, and R. Garcia, *Time-resolved nanomechanics of a single cell under the depolymerization of the cytoskeleton*. Nanoscale, 2017. **9**(33): p. 12051-12059.
141. Garcia, P.D. and R. Garcia, *Determination of the Elastic Moduli of a Single Cell Cultured on a Rigid Support by Force Microscopy*. Biophysical Journal, 2018. **114**(12): p. 2923-2932.
142. Garcia, P.D. and R. Garcia, *Determination of the viscoelastic properties of a single cell cultured on a rigid support by force microscopy*. Nanoscale, 2018. **10**(42): p. 19799-19809.