

19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 500 040**

21 Número de solicitud: 201330281

51 Int. Cl.:

G01Q 60/32 (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.02.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.09.2014

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070130

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, nº 117
28006 MADRID ES**

72 Inventor/es:

**TOMAS HERRUZO, Elena y
GARCIA GARCIA, Ricardo**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier54 Título: **MÉTODO BIMODAL PARA CUANTIFICAR PROPIEDADES NO TOPOGRÁFICAS EN
MICROSCOPIA DE FUERZAS**

57 Resumen:

Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas, basado en modular en frecuencia y de forma simultánea al menos dos modos de vibración de la micropalanca de un microscopio, que emplea los desplazamientos de frecuencia de los modos excitados y los cambios en la fuerzas de excitación para cuantificar propiedades nanomecánicas.

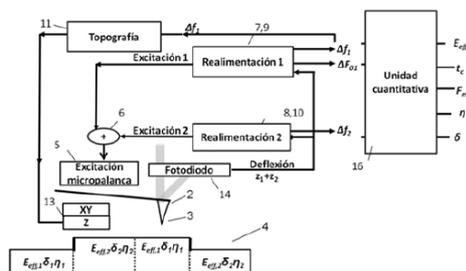


FIG. 7

DESCRIPCIÓN

MÉTODO BIMODAL PARA CUANTIFICAR PROPIEDADES NO TOPOGRÁFICAS EN MICROSCOPIA DE FUERZAS

5 OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método de utilización de un microscopio de fuerzas mediante modulación de frecuencia, excitando simultáneamente al menos dos modos de vibración de la micropalanca, siendo uno de ellos el modo principal que permite seguir la topografía y siendo el otro el modo secundario, caracterizado por una frecuencia más elevada que la del modo principal. Se utiliza cálculo fraccional para relacionar parámetros medidos directamente con el microscopio con las propiedades de las muestras. Se emplean los desplazamientos de frecuencia de los modos excitados y los cambios en la fuerzas de excitación para cuantificar propiedades nanomecánicas de una muestra a medir.

Este método permite calcular diversas propiedades cuantitativas no topográficas de los materiales, utilizando para ello modos de vibración dinámicos sin hacer hipótesis acerca de la indentación de la punta de la micropalanca en la muestra a analizar. Este método puede aplicarse en tiempo real durante la medición, o posteriormente a la obtención de los parámetros directamente medidos en la muestra.

El presente método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas encuentra aplicación en el ámbito de la investigación científica, mediante microscopía de fuerzas, de todo tipo de materiales, orgánicos e inorgánicos, estando la muestra inmersa en un medio, líquido, gaseoso, o bien en el vacío.

PROBLEMA TÉCNICO A RESOLVER Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La habilidad de la microscopía de fuerzas para la adquisición de imágenes de un amplio rango de materiales la han convertido en una de las técnicas relevantes para la caracterización de propiedades a escala nanométrica. Como consecuencia de su gran resolución (lateral y vertical), los microscopios de fuerza atómica (AFM, por las siglas en inglés de Microscopía de Fuerza Atómica). Se han introducido tanto en laboratorios de investigación como en departamentos de control de calidad en diversos sectores industriales (microelectrónica, polímeros).

Un microscopio de fuerzas puede operar tanto en modos estáticos como dinámicos. Uno de los métodos que pueden ser utilizados para la determinación cuantitativa de propiedades son los experimentos de nanoindentación, que se caracterizan por su lentitud, la elevada área de contacto y no controlar la fuerza aplicada. Los métodos estáticos están basados en la adquisición de curvas de fuerza de forma simultánea con la adquisición de la imagen topográfica (*force volume*). Estos métodos funcionan a frecuencias bajas (1-2 Hz) lo cual implica que un mapa completo requiera tiempos de adquisición de horas. Además, la resolución lateral de estos mapas es pequeña. El método de la fuerza pulsada (A. Rosa-Zeiser, E. Weilandt, S. Hild y O. Marti. *The simultaneous measurement of elastic, electrostatic and adhesive properties by scanning force microscopy: pulsed-force mode operation. Measurement Science and Technology* 8(11), 1333 (1997)) hace oscilar el piezoeléctrico que mueve la muestra en sentido vertical a frecuencias de entre 100 Hz y 2 kHz, lo que permite la determinación de propiedades mecánicas de forma más rápida, aunque la fuerza máxima aplicada es relativamente elevada (de decenas de nN).

La reciente invención descrita en el documento de patente US 20120131702 A1, introduce mejoras en la electrónica que han permitido el desarrollo del método '*peak force tapping*' capaz de extraer propiedades de forma robusta con indentaciones de al menos 2 nm y es capaz de establecer la máxima fuerza de interacción punta – muestra en el rango pN-nN. Es de notar que aunque el método ha sido verificado sobre multitud de materiales en aire y líquidos, no existen resultados significativos en cuanto a la cuantificación sobre imágenes con alta resolución lateral de nanopartículas o proteínas individuales.

Los modos dinámicos tienen la ventaja de ser generalmente no invasivos y de incrementar la velocidad de adquisición, de tal forma que la información cuantitativa sea simultánea con la imagen de topografía. Además, y más importante, el hecho de operar a frecuencias cercanas de la de resonancia aumenta la sensibilidad del microscopio. Muchos observables, (término que se refiere a magnitudes directamente medidas en el microscopio) como la fase, los cambios de frecuencia o la amplitud de armónicos superiores, pueden ser relacionados con información composicional de la muestra. Sin embargo, la cuantificación de estas propiedades no es inmediata.

Se puede distinguir entre métodos basados en la obtención de la fuerza de interacción punta – muestra a partir de la deflexión, y métodos paramétricos. En los documentos de patente US 746583 B1 y US 7404314 B2, así como en el artículo: M. Stark, C. Möller, D. J. Müller y R. Guckenberger. *From images to interactions: High-resolution phase imaging in tapping-mode atomic force microscopy. Biophysical Journal* 80, 3009-3018 (2001), se introducen

métodos que reconstruyen el comportamiento de la fuerza de interacción punta – muestra frente al tiempo, para cada píxel de la imagen obtenida mediante microscopía, métodos que permiten obtener el Módulo de Young efectivo, E_{eff} , y otras propiedades de la muestra a la vez que permiten observar si existen fuerzas que no han sido consideradas en el modelo que incrementan el error en la cuantificación. En particular, el método de Sahin (como en la patente US 7404314 B2) permite estimar el Módulo de Young efectivo, E_{eff} , tras una estimación de la indentación basada en la máxima resolución lateral obtenida en la imagen. Entre los métodos paramétricos destaca el trabajo de Raman (A. Raman, S. Trigueros, A. Cartagena, A. P. Z. Stevenson, M. Susilo, E. Nauman and S. Antoranz Contera, *Mapping nanomechanical properties of live cells using multi-harmonic atomic force microscopy*, *Nature Nanotechnology* 6, 809–814 (2011)) que describe la relación entre el Módulo de Young y distintos componentes armónicos de la oscilación.

Es de notar que para aumentar la precisión en la medida de propiedades mediante modos dinámicos se debe minimizar el número de hipótesis empleadas. La mayoría de los métodos anteriores efectúan ciertas hipótesis sobre la indentación, como suponer que el radio de contacto es equivalente a la resolución lateral obtenida en la imagen. El radio de contacto real se relaciona con la indentación y el radio de la punta a través de la fórmula

$$r_c = \sqrt{\text{indentación}} \cdot \sqrt{R_{\text{punta}}}$$

En general, un cambio en una propiedad física se manifiesta en un cambio en los observables y en un cambio en la distancia entre la punta y la muestra (debido a la realimentación topográfica). De esta forma, si se aumenta el número de ecuaciones que relacionan la fuerza y los observables, también se podrá determinar más propiedades de la muestra como la indentación de la punta de la micropalanca en la muestra.

La presente invención se basa en modos multifrecuencia de microscopía de fuerzas. Documentos pioneros a la presente invención pueden verse en los documentos de patente US 7958563 B2 y US 7921466 B2. La microscopía de fuerzas bimodal es un método de microscopía de fuerza que opera excitando simultáneamente dos modos de vibración de la micropalanca (o *cantiléver*, como es conocida comúnmente en el estado de la técnica) de un microscopio de fuerza atómica. Estos modos pueden ser, por orden de frecuencia de menor a mayor, el primero y el segundo, el primero y el tercero o, en general, dos cualesquiera. Esta excitación simultánea permite la duplicación de canales de información.

La Figura 1 muestra la forma teórica de los dos primeros modos flexurales (1 y 2) de vibración de una micropalanca rectangular que oscila en aire. La frecuencia del segundo

- modo es aproximadamente 6 veces mayor que la del primer modo. La Figura 2 muestra la oscilación vertical de una micropalanca cuando se excitan simultáneamente los dos primeros modos de resonancia, siendo la amplitud del segundo modo mucho menor que la amplitud del primer modo. La Figura 3 describe el funcionamiento de un microscopio de
- 5 fuerzas bajo la excitación de dos modos de vibración operando en modo de modulación en frecuencia, que consta de los pasos de excitar de forma simultánea al menos el modo fundamental de vibración y un modo más alto de la micropalanca del microscopio mientras la micropalanca se desplaza sobre la superficie de la muestra, y que establece una serie de condiciones para cada uno de los modos.
- 10 En las condiciones de funcionamiento del microscopio bimodal se satisfacen ciertas condiciones en el virial de la fuerza de interacción (V_{ts}) y en la energía disipada (J). *R. Lozano y R. Garcia. Theory of multifrequency atomic force microscopy. Physical Review Letters 100(7), 0761024 (2008).*, *J. R. Lozano y R. Garcia. Theory of phase spectroscopy in bimodal atomic force microscopy. Physical Review B 79, 0141104 (2009).*
- 15 Además, si la amplitud de vibración del segundo modo A_2 es mucho menor que la amplitud de vibración del primer modo A_1 ($A_2 \ll A_1$) el cambio en la frecuencia de resonancia del segundo modo Δf_2 está relacionado directamente con el virial de la fuerza del primer modo (*S. Kawai, T. Glatzel, S. Koch, B. Such, A. Baratoff y E. Meyer. Systematic achievement of improved atomic-scale contrast via bimodal dynamic force microscopy. Physical Review Letters 103(22) (2009).*)
- 20 Cuando la amplitud de vibración del primer modo A_1 es mayor que la longitud típica de la fuerza, los cambios en la frecuencia de resonancia del primer y del segundo modo se relacionan directamente con la semi-integral y semi-derivada de la fuerza a través de cálculo fraccional (*E T. Herruzo and R Garcia, Theoretical study of the frequency shift in bimodal*
- 25 *FM-AFM by fractional calculus, Beilstein J. of Nanotechnol. 3, 198-206 (2012).*)
- 30 Cuando la semi-integral ($I_{-}^{1/2}F(d)$) y la semi-derivada ($D_{-}^{1/2}F(d)$) de la fuerza de interacción pueden calcularse analíticamente se obtiene un sistema de dos ecuaciones del que se pueden extraer los valores de Módulo de Young efectivo, E_{eff} , y la indentación, δ , a través de las imágenes en tiempo real de Δf_1 and Δf_2 . Las definiciones de la semi-derivada y semi-integral corresponden a las formas de la derivada e integral fraccional de Liouville (desde un valor dado de la variable hasta infinito). (*Fractional Calculus: An Introduction for Physicists, R. Herrmann, World Scientific Publishing, 2011.*)

Cuando la frecuencia de excitación es muy próxima a la frecuencia de resonancia (operación en ultra-alto vacío o aire), el virial del modo n puede aproximarse por

$$V_{ts,n} = -k_n A_n^2 \frac{\Delta f_n}{f_n} \quad (\text{E.1})$$

5 donde k_n , A_n , f_n y Df_n son, respectivamente, la constante de fuerza, la amplitud, la frecuencia de resonancia en presencia de una fuerza y el desplazamiento de la frecuencia de resonancia del modo n . Para el caso de la excitación a los dos primeros modos se obtiene

$$\Delta f_1(d) = \frac{f_1}{k_1 \sqrt{2\rho} A_1^3} I_-^{1/2} F(d) \quad (\text{E.2})$$

$$\Delta f_2(d) = \frac{f_2}{2k_2 \sqrt{2\rho} A_1} D_-^{1/2} F(d) \quad (\text{E.3})$$

10 De manera similar, operando en medio líquido, la frecuencia de excitación es diferente de la frecuencia de resonancia y el virial del modo n puede aproximarse por

$$V_{ts,n} = \frac{k_n A_n^2}{2} \left(1 - \frac{f_n}{f_{0,n}} - 2 \frac{f_n \Delta f_n}{f_{0,n}^2} \right) \quad (\text{E.4})$$

donde $f_{0,n}$ es la frecuencia de resonancia del modo n en ausencia de fuerzas de interacción.

15 La fuerza de interacción puede aproximarse en base a varios modelos donde aparecen propiedades mecánicas de la muestra: el modelo de Hertz (Intermolecular & Surface Forces, Jacob Israelachvili, 1985, Elsevier Academic Press), el de DMT (*Amplitude Modulation AFM in Liquid*, R: García,; Wiley-VCH: Weinheim, Germany), el de Lennard Jones (*Intermolecular and Surface Force*, Israelachvili, J. N., Elsevier Academic Press: London, 2005.), etc.

Por ejemplo, en el modelo de Hertz la fuerza conservativa de interacción viene dada por:

$$F_{\text{Hertz}}(d) = \frac{4}{3} E_{\text{eff}} \sqrt{R} (a_0 - d)^{3/2} = \frac{4}{3} E_{\text{eff}} \sqrt{R} d^{3/2} \quad (\text{E.5})$$

20

donde d es la distancia instantánea entre la punta de la micropalanca y la muestra y a_0 es un parámetro intermolecular que normalmente vale 0.165 nm y el módulo de Young efectivo E_{eff} se define como:

$$\frac{1}{E_{eff}} = \frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_2} \quad (E.6)$$

- 5 siendo E_1 y E_2 los módulos de Young y ν_1 y ν_2 los coeficientes de Poisson de la punta de la micropalanca y de la muestra respectivamente.

En el actual estado de la técnica, hasta ahora no se han podido obtener para diferentes modelos de fuerza de interacción, relaciones analíticas entre los observables producidos en este tipo de microscopía en tiempo real, y las propiedades mecánicas de la muestra. Todo ello maximizaría la velocidad de funcionamiento del microscopio y evitaría los problemas de convergencia que muestran los métodos iterativos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas basado en modular en frecuencia y de forma simultánea al menos dos modos de vibración de la micropalanca.

Según el método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas, objeto de la presente invención, se emplean los desplazamientos de frecuencia de los modos excitados y los cambios en la fuerzas de excitación para cuantificar propiedades nanomecánicas.

El presente método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas comprende:

- a) colocar en la cabeza de un microscopio de fuerzas una micropalanca con una punta en su extremo, que interactúa con la muestra, y que presenta al menos dos modos de vibración, un modo principal y un modo secundario;
- 25 b) disponer de dos elementos, uno para hacer vibrar a la micropalanca y el otro para desplazar a la micropalanca sobre la muestra o parte de ella;
- c) enviar a la unidad de excitación asociada a la micropalanca de la cabeza del microscopio, las señales de excitación generadas por y sumar, mediante un

sumador de señales, las mencionadas señales de excitación que hacen vibrar a la micropalanca;

d) calibrar los siguientes parámetros asociados a la operación de la micropalanca:

- 5 – constante de fuerzas, k_i ;
- factor de calidad, Q_i ;
- inversa de la sensibilidad óptica del fotodiodo, i , en cada uno de los dos modos de vibración;
- radio, R , de la punta de la micropalanca;

10 e) comprobar las hipótesis de partida, según las siguientes etapas:

e.1) comprobar que la amplitud de vibración del modo principal de la micropalanca es mayor que la longitud de escala de la fuerza de interacción.

15 e.2) comprobar que la amplitud de vibración, del modo secundario de la micropalanca es muy inferior a la amplitud de vibración, del modo principal;

e.3) fijar una pluralidad de bucles de realimentación que comprenden:

20 –un bucle de realimentación de la amplitud, A_1 , del modo principal de vibración, donde se hace variar la amplitud de excitación de la micropalanca en dicho modo principal, manteniendo constante dicha amplitud, A_1 ;

25 –un bucle de realimentación de la amplitud, A_2 , del modo secundario de vibración, donde se hace variar la amplitud de excitación de la micropalanca en dicho modo secundario, manteniendo constante dicha amplitud, A_2 ;

 –un bucle de realimentación, de fase, φ_1 , del modo principal de vibración, donde se hace variar la frecuencia de excitación, f_1 de la

micropalanca en dicho modo principal, manteniendo constante la fase, φ_1 , en un valor igual a $\pi/2$;

–un bucle de realimentación, de fase, φ_2 , del modo secundario de vibración, donde se hace variar la frecuencia de excitación, f_2 , de la micropalanca en dicho modo secundario, manteniendo constante la fase, φ_2 , en un valor igual a $\pi/2$;

–un bucle de realimentación responsable de regular la distancia media entre la punta de la micropalanca y la muestra y controlar así la realimentación topográfica.

- 10 f) detectar, mediante un sistema adaptado al efecto, la señal de deflexión de la micropalanca;
- g) registrar, mediante una unidad de procesamiento provista de al menos dos canales de transferencia de información, las señales correspondientes a los modos de vibración, donde dicho registro puede realizarse simultáneamente o
- 15 posteriormente a la adquisición de una imagen de microscopía;
- h) transformar, mediante el empleo de fórmulas analíticas, los datos mostrados en los mapas paramétricos de propiedades de la muestra.

Según el método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas objeto de la presente invención, el sistema punta - micropalanca se sitúa sobre una muestra heterogénea para

20 medir diversas propiedades mecánicas como el Módulo de Young efectivo, E_{eff} , la viscosidad, η , de la muestra, o la constante de Hamaker, H , de la interfase.

Según el presente método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas, en la etapa (c) del método en que se generan las señales de excitación, la micropalanca es excitada según los mencionados modo principal y modo

25 secundario de vibración.

Según una realización del presente método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas, la señal resultante que llega a la micropalanca viene expresada según la siguiente relación matemática:

$$F_{exc}(t) = F_{01}z_1\left(t - \frac{4}{3}f_1\right) + F_{02}z_2\left(t - \frac{4}{3}f_2\right) \quad (E.7)$$

donde F_{0i} , f_i son, respectivamente, la señal de excitación, y la frecuencia de excitación del modo i que son transferidas al elemento que excita la vibración de la micropalanca.

En una forma de realización, dicha señal se genera utilizando la señal de referencia de un dispositivo *lock-in* digital comprendido dentro de un procesador digital de señal.

- 5 Según una posible forma de realización, en la etapa (h) del método en que se transforman los datos mostrados en los mapas paramétricos de propiedades de la muestra, se utilizan los cambios en las frecuencias de resonancia del modo principal, Δf_1 , y del modo secundario, Δf_2 , para hallar el Módulo de Young efectivo, E_{eff} , de la muestra y la indentación, δ , en función de la posición de la micropalanca sobre la muestra.
- 10 Asimismo, típicamente, en el presente método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas, los datos de cambio en la frecuencia de resonancia del modo principal, Δf_1 , y cambio en la frecuencia de resonancia del modo secundario, Δf_2 , se convierten, mediante un cálculo analítico, y simultáneamente o posteriormente a la adquisición de una imagen, en mapas paramétricos que expresan el Módulo de Young
- 15 efectivo, E_{eff} , y la indentación, δ .

En el presente método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas, la fuerza de interacción se modela típicamente de acuerdo al modelo de Hertz y el Módulo de Young efectivo, E_{eff} , y la indentación, δ , se calculan mediante el siguiente sistema de ecuaciones:

$$E_{eff} = \frac{2\sqrt{2}}{\sqrt{A_1 R}} \frac{k_2^2 f_1 \Delta f_2^2}{k_1 f_2^2 \Delta f_1} \quad (\text{E.8})$$

$$d = \frac{A_1 k_1 f_2 \Delta f_1}{k_2 f_1 \Delta f_2} \quad (\text{E.9})$$

20

El tiempo de contacto, t_c , entre la punta y la muestra se calcula, en una determinada realización del método objeto de la presente invención, mediante la siguiente expresión matemática:

$$t_c = \frac{1}{p f_1} \arccos \left(1 - \frac{d}{A_1} \right) = \frac{1}{p f_1} \arccos \left(1 - \frac{k_1 f_2 \Delta f_1}{k_2 f_1 \Delta f_2} \right) \quad (\text{E.10})$$

En una forma de realización del presente método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas, cuando la punta se encuentra a una distancia mínima de la muestra, se calcula la fuerza máxima conservativa de Hertz, F_{\max} , según la siguiente expresión matemática:

$$F_{\max} = \frac{4}{3} E_{\text{eff}} \sqrt{Rd^3} = \frac{8\sqrt{2}}{3} \frac{A_1 \sqrt{k_1 k_2 \Delta f_1 \Delta f_2}}{\sqrt{f_2 f_1}} \quad (\text{E.11})$$

Adicionalmente, en la etapa (h) del método en que se transforman los datos mostrados en los mapas paramétricos de propiedades de la muestra, típicamente se utilizan los cambios en las frecuencias de resonancia del modo principal, y del modo secundario, y el cambio en la señal de excitación del modo principal para hallar la viscosidad, η , el Módulo de Young efectivo, E_{eff} , de la muestra, y la indentación, δ , en función de la posición de la micropalanca sobre la muestra.

Adicionalmente, en una forma de realización del método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas, objeto de la presente invención, se añade al modelo de la fuerza conservativa de Hertz una componente disipativa que puede modelarse como proporcional a la velocidad de indentación, de tal forma que la fuerza total de interacción se expresa mediante la siguiente relación matemática:

$$F(d) = F_{\text{cons}} + \Delta\Gamma \dot{d} = \frac{4}{3} E^* \sqrt{R(d)}^{3/2} + h \sqrt{Rd} \dot{d} \quad (\text{E.12})$$

donde $\Delta\Gamma$ es una función par denominada función de rozamiento generalizado, y \dot{d} es la velocidad de indentación en la muestra.

La inclusión de la mencionada componente disipativa de la fuerza da lugar a una ecuación adicional para la energía disipada en términos de la semi-integral de una función, $B(d)$, relacionada con la fuerza disipativa:

$$\Delta F_{01}(d) = F_{01} \left(\frac{\Delta f_1(d)}{f_1} + \frac{\sqrt{2p} Q_1 f_1}{k_1 A_1^{3/2}} I_-^{1/2} B(d) \right) \quad (\text{E.13})$$

donde la función B se define mediante la siguiente expresión matemática:

$$B(x) = 2 \int_x^{\infty} \Delta\Gamma(x) dx \quad (\text{E.14})$$

dando lugar a una ecuación adicional que permite la conversión de las imágenes de Δf_1 , Δf_2 y F_{01} en mapas paramétricos del módulo de Young efectivo, E_{eff} , de la viscosidad, η , y de la indentación, δ , y haciendo que el siguiente sistema de tres ecuaciones:

$$\Delta f_1(d) = \frac{f_1}{k_1 \sqrt{2p} A_1^3} \frac{E_{\text{eff}} \sqrt{p} R d^2}{2} \quad (\text{E.15})$$

$$\Delta f_2(d) = \frac{f_2}{2k_2 \sqrt{2p} A_1} E_{\text{eff}} \sqrt{p} R d \quad (\text{E.16})$$

$$\Delta F_{01}(d) = F_{01} \left(\frac{\Delta f_1(d)}{f_1} + \frac{\sqrt{2p} Q_1 f_1 h \sqrt{p} R d^2}{k_1 A_1^{3/2} 2} \right) \quad (\text{E.17})$$

con tres incógnitas, E_{eff} , δ , η , se pueda expresar explícitamente, proporcionando además de las ecuaciones para el Módulo de Young efectivo, E_{eff} , y para la indentación, δ , una ecuación para la viscosidad, η , expresada de la siguiente manera:

$$h = - \frac{\sqrt{2}}{\sqrt{p} A_1 R} \frac{k_2^2}{k_1 f_1 f_2^2 Q_1} \frac{\Delta f_2^2 (\Delta f_1 f_1 F_{01} - \Delta F_{01} f_1^2)}{\Delta f_1^2 F_{01}} \quad (\text{E.18})$$

Según una forma de realización del presente método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas, la micropalanca del microscopio opera en régimen atractivo o de no contacto, y la fuerza de interacción entre la punta y la muestra se modela de acuerdo al siguiente modelo matemático, conocido como modelo de Van der Waals:

$$F_{vdw}(d) = - \frac{HR}{6d^2} \quad (\text{E.19})$$

donde d es la distancia entre la punta y la muestra.

Se calculan analíticamente la semi-derivada y la semi-integral de la fuerza de interacción del modelo de van der Waals, dando lugar a un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas, que se puede expresar explícitamente, proporcionando relaciones para la constante de Hamaker, H, y la distancia mínima, d_{min} , entre punta y muestra:

$$H = -9 \sqrt{\frac{3}{2}} \frac{A_1^3}{R} \frac{k_1 \Delta f_1}{f_1} \left(\frac{k_1 f_2 \Delta f_1}{k_2 f_1 \Delta f_2} \right)^{3/2} \quad (E.20)$$

$$d_{min} = \frac{3A_1}{4} \frac{k_1 f_2 \Delta f_1}{k_2 f \Delta f_2} \quad (E.21)$$

La distancia media entre la punta y la muestra se controla, opcionalmente, manteniendo un cambio en la frecuencia, Δf_1 , fijo mientras la micropalanca se desplaza a lo largo y ancho de la muestra.

- 10 La distancia media entre la punta y la muestra también puede controlarse manteniendo una fuerza de excitación, F_{01} , fija.

Según una realización del método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas, en la etapa e3) se establece el sistema de realimentación topográfico del quinto bucle en otros parámetros como el tiempo de contacto, t_c , o la fuerza máxima, F_{max} , en valores pre-establecidos alternativos al cambio de frecuencia de resonancia, Δf_1 , o disipación, ΔF_{01} .

La realimentación en tiempo de contacto, t_c , se puede utilizar para efectuar medidas no invasivas en materiales blandos.

Opcionalmente, las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra se modelan mediante dos parámetros además de la separación entre la punta y la muestra, de manera que se añade una nueva ecuación que se obtiene al excitar un modo adicional de vibración, n , y registrando como canal adicional, Δf_n , para tener tres observables conservativos, siendo éstos los cambios de frecuencia de cada modo de vibración, de manera que se obtiene un sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas del que extraer las propiedades de la muestra.

Se entiende por observables los parámetros medidos directamente por el microscopio de fuerzas bimodal.

Alternativamente, las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra se modelan mediante dos parámetros además de la separación entre la punta y la muestra, de manera que la ecuación adicional se halla registrando la amplitud B_m de un armónico superior, m , del modo principal con frecuencia $m f_1$, para tener tres observables que dan lugar a un sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas del que extraer las propiedades de la muestra, donde por un armónico superior, B_m , del modo principal se entiende un múltiplo entero de la frecuencia de resonancia de dicho modo principal, y donde los tres observables mencionados son: cambio de frecuencia del modo principal y del modo secundario, Δf_1 , Δf_2 , y amplitud, B_m , del armónico superior, m ,

$$\Delta B_2(d) = \frac{2}{3k \sqrt{2p} A_1} \left(I_-^{1/2} F(d) - \frac{1}{A_1} I_-^{3/2} F(d) \right) \quad (E.22)$$

donde $I_-^{3/2} F(d)$ es la integral 3/2 de la fuerza de interacción y B_2 es la amplitud del segundo armónico.

En una realización del método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas, el modelo de fuerza de interacción contiene una componente disipativa dependiente de dos parámetros y se registra de forma adicional el canal disipación del modo secundario de vibración para utilizar la ecuación que relaciona la energía disipada por el modo secundario con la semi-integral de la función $\Gamma(d)$:

$$\Delta F_{02}(d) = F_{02} \left(\frac{\Delta f_2(d)}{f_2} + \frac{\sqrt{2p} Q_2 f_2}{k_2 \sqrt{A_1}} I_-^{1/2} \Delta \Gamma(d) \right) \quad (E.23)$$

dando lugar a una ecuación adicional que permite la transformación de las imágenes de Δf_1 , Δf_2 , F_{01} y F_{02} en observables que aparecen en un sistema de cuatro ecuaciones para hallar simultáneamente la viscosidad, η , y la histéresis de la energía superficial, ΔE_{adh} .

Según una forma de realización del método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas, objeto de la presente invención, la medida se realiza teniendo la muestra inmersa en líquido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La presente invención se entenderá mejor a la vista de las siguientes figuras que muestran diversas formas de realización del presente método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas.

5 Figura 1: Muestra de forma esquemática los dos primeros modos flexurales de vibración (V1 y V2) según los cuales oscilan en el aire las micropalanca rectangular normalizadas de los microscopios de fuerzas en el estado de la técnica.

Figura 2: Muestra esquemáticamente la excitación y la oscilación de una micropalanca de un microscopio de fuerzas, cuando ésta es excitada simultáneamente según sus dos primeros modos de vibración, y donde la amplitud de vibración del segundo modo es mucho menor
10 que la amplitud de vibración del primer modo.

Figura 3: Muestra un esquema del funcionamiento de un microscopio de fuerzas bajo la excitación de dos modos de vibración operando en modo de modulación de frecuencia.

Figura 4: Muestra un esquema del método objeto de la presente invención, según una forma de realización.

15 Figura 5: Muestra un esquema del método objeto de la presente invención, según una forma de realización.

Figura 6: Muestra un esquema del método objeto de la presente invención, según una forma de realización.

Figura 7: Muestra un esquema del método objeto de la presente invención, según una forma
20 de realización.

Figura 8: Muestra un esquema del método objeto de la presente invención, según una forma de realización.

Figura 9: Muestra una gráfica comparativa, de las curvas correspondientes a la semi-integral de la fuerza de interacción punta-muestra, en un caso determinada numéricamente b (17), y
25 en otro caso obtenida a partir del método propuesto empleando los datos en Δf_1 (18).

Figura 10: Muestra una gráfica comparativa, de las curvas correspondientes a la semi-derivada de la fuerza de interacción punta-muestra, en un caso determinada numéricamente a partir de la fuerza reconstruida (19), y en otro caso obtenida a partir del método propuesto empleando los datos en Δf_2 (20).

Figura 11: Muestra cuatro gráficas que representan los resultados del presente método, determinándose: el Módulo de Young efectivo, E_{eff} (a), la indentación, δ (b), la fuerza máxima (c) y el tiempo de contacto, t_c (d).

5 Figura 12: Muestra seis gráficas que representan los resultados del presente método, aplicado al análisis de una muestra de PLGA (ácido poli-láctico co-glicólico, por sus siglas en inglés), determinándose simultáneamente: la topografía (a), los mapas del Módulo de Young efectivo, E_{eff} (b), la viscosidad, η (c), la indentación, δ (d), la fuerza máxima (e) y el tiempo de contacto, t_c (f).

10 Figura 13: Muestra un esquema del método objeto de la presente invención, según una forma de realización.

Figura 14: Muestra un esquema del método objeto de la presente invención, según una forma de realización.

15 Figura 15: Muestra tres imágenes, obtenidas durante el análisis de microscopía de fuerzas de una muestra de nano-partículas de oro de 5 nm sobre una base de silicio, imágenes correspondientes a: un mapa topográfico de la muestra (a); un mapa paramétrico del Módulo de Young efectivo, E_{eff} (b), y; una gráfica que representa el Módulo de Young frente a la posición (c).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE UNA FORMA DE REALIZACION DE LA INVENCION

20 La presente invención se refiere a un método, en adelante método de la invención, para usar un microscopio (1) de fuerzas mediante modulación en frecuencia (algunos de cuyos elementos se ilustran a nivel esquemático en la figura 3), excitando simultáneamente dos modos de vibración de la micropalanca (2) o “cantiléver” de un microscopio de fuerza (1) atómica (AFM, por sus siglas en inglés), que comprende las siguientes etapas:

- 25 a) colocación de una micropalanca (2) con una punta (3) en su extremo que interactúa con la muestra (4) que presenta varios modos de vibración; en este sentido, la figura 1 hace referencia a un modo principal, 1, y a un modo secundario, 2, de vibración de la micropalanca (2);
- b) disponer de dos elementos, uno para hacer vibrar (5) a la micropalanca (2) y el otro para desplazar (13) a la micropalanca (2) sobre la muestra (4) o parte de ella;

- c) generación de las señales de excitación (7, 8, 9, 10) y un sumador (6) de manera que la señal resultante que excita a la micropalanca (2) es:

$$F_{exc}(t) = F_1 + F_2 = G_1 z_1 \left(t - \frac{4}{3} f_1 \right) + G_2 z_2 \left(t - \frac{4}{3} f_2 \right) \quad (E.7)$$

5 donde F_{0i} , G_i y f_i son, respectivamente, la fuerza de excitación, la ganancia y la frecuencia de excitación del modo i que son transferidas al elemento que excita la vibración de la micropalanca (5);

- d) calibración de la constante de fuerzas k_i , del factor de calidad Q_i , de la inversa de la sensibilidad óptica del fotodiodo de cada uno de los modos i , y del radio, R, de la punta (3).
- 10

- e) comprobación de las hipótesis de partida que incluye las siguientes subetapas:

o comprobación de que la amplitud de vibración del modo principal de la micropalanca (2), sea mayor que la longitud de escala de la fuerza de interacción, esto es, la longitud típica a la que una fuerza puede ser despreciada;

15

o comprobación de que la amplitud de vibración del modo secundario de la micropalanca (2) es mucho menor que la amplitud de vibración del modo principal;

o fijación de cinco bucles de realimentación (figura 3) incluyendo: cuatro bucles de realimentación sobre las amplitudes y fases de ambos modos donde dos bucles de realimentación (7 y 9) mantienen la amplitud del primer modo A_1 constante variando la amplitud de excitación del mismo y la fase del primer modo φ_1 igual a $\pi/2$ variando la frecuencia de excitación f_1 respectivamente y los otros dos bucles

20

de realimentación (8, 10) que mantienen la amplitud del segundo modo A_2 constante variando la amplitud de excitación del mismo y la fase del segundo modo φ_2 igual a $\pi/2$ variando la frecuencia de excitación f_2 respectivamente, el quinto bucle de realimentación (11) es responsable de la regulación de la distancia media entre la punta

25

de la micropalanca (2) y la muestra (4) que genera una imagen topográfica;

f) detección de la señal de deflexión (14) de la micropalanca (2);

5 g) registro de un mínimo de dos canales de información, durante o después de la adquisición de la imagen, mediante una unidad de procesamiento (15);

h) transformación de la colección de datos elegidos entre en mapas de las propiedades de la muestra (4) mediante la unidad cuantitativa (16) descrita en la figura 4.

Este método permite calcular diversas propiedades cuantitativas de materiales sin hacer hipótesis acerca de la indentación de la punta de la micropalanca en la muestra.

10 La micropalanca puede ser excitada en dos modos de vibración, pero preferentemente es excitada según los modos principal y secundario de vibración.

En una realización preferente del método de la invención, en la etapa (a) del método, el sistema punta (3) – micropalanca (2) se sitúa sobre una muestra heterogénea (4) que puede presentar propiedades mecánicas variables tales como el Módulo de Young efectivo, E_{eff} , y la viscosidad de la muestra, η , o la constante de Hamaker, H , de la interfase.

15 En la etapa (c) del método, la señal se genera utilizando la señal de referencia de un *lock-in* digital que hay dentro de un procesador digital de señal.

En la etapa (d) del método, el radio, R , de la punta (3) se calibra utilizando una muestra (4) de nanopartículas de radio conocido, donde a partir de la medida aparente que da el microscopio y, conocido el radio de las nanopartículas se obtiene el radio, R , de la punta (3). El radio de la punta se puede obtener también a partir de otros métodos, como puede ser el método de Sergio Santos (Sergio Santos, Li Guang, Tewfik Souier, Karim Gadelrab, Matteo Chiesa, and Neil H. Thomson “A method to provide rapid in situ determination of tip radius in dynamic atomic force microscopy” Review Science Instruments, 83, 043707 (2012)).

25 El método de la invención permite medir ciertas propiedades que dependerán del modelo de fuerza de interacción (Módulo de Young, E , viscosidad, η , indentación, δ , fuerza máxima conservativa, F_{max} , tiempo de contacto, t_c) y, al mismo tiempo, determinar si se trabaja en el rango de aplicación del modelo utilizado. Para ello se graban al menos dos observables (magnitudes directamente medidas por el microscopio) de forma simultánea e independiente

30

en tiempo real. Los valores numéricos se obtienen mediante fórmulas analíticas. Todo ello maximiza la velocidad de funcionamiento del microscopio (1) y evita los problemas de convergencia que muestran los métodos iterativos.

El método de la invención hace uso de al menos dos ecuaciones que relacionan analíticamente los parámetros físicos y los observables. Las ecuaciones anteriores permitirán la determinación del Módulo de Young efectivo, E_{eff} , la viscosidad, η , y la indentación, δ , utilizando modos dinámicos del microscopio de fuerzas. Esto permite la caracterización de las propiedades de la superficie de una muestra (4), de una forma reproducible y con una alta resolución lateral en tiempo real aplicando las fórmulas ya que son analíticas y no tienen problemas de convergencia que tienen otros métodos iterativos numéricos.

En una realización preferente del método de la invención que se ilustra en la Figura 4, en la etapa (h) del método, se utilizan los cambios en las frecuencias de resonancia del modo principal y del modo secundario, Δf_1 , Δf_2 , para determinar el Módulo de Young efectivo, E_{eff} , de la muestra (4) y la indentación, δ , en función de la posición de la micropalanca (2). Para el cálculo analítico de la semi-derivada y de la semi-integral para la fuerza de interacción se utiliza el modelo de Hertz, que permite convertir los datos de Δf_1 y Δf_2 en mapas del Módulo de Young efectivo, E_{eff} , y de la indentación, δ , de forma simultánea y/o posterior a la adquisición de la imagen topográfica). Finalmente, el sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas se puede despejar explícitamente:

$$E_{eff} = \frac{2\sqrt{2}}{\sqrt{A_1 R}} \frac{k_2^2 f_1}{k_1 f_2^2} \frac{\Delta f_2^2}{\Delta f_1} \quad (E.8)$$

$$d = \frac{A_1 k_1 f_2}{k_2 f_1} \frac{\Delta f_1}{\Delta f_2} \quad (E.9)$$

La última ecuación (E.9) representa una ventaja significativa con respecto a otros métodos que precisan realizar hipótesis sobre la indentación de la muestra (4).

El método de la invención presenta también la ventaja de que un cambio en el punto de trabajo, entendido como el cambio de frecuencia que se mantiene fija cuando se mantiene la realimentación topográfica, produce cambios en los mapas de la indentación, la fuerza máxima y el tiempo de contacto, no provoca sin embargo cambios en el Módulo de Young efectivo, E_{eff} , la viscosidad, η , ni en la topografía medidas en la muestra (4).

En una realización más preferida del método de la invención, partiendo de la indentación, δ , y del Módulo de Young efectivo, E_{eff} , se halla una expresión para el tiempo de contacto t_c (esquema de la figura 5), a partir de los datos de Δf_1 y Δf_2 .

$$t_c = \frac{1}{\rho f} \arccos\left(1 - \frac{d}{A_1}\right) = \frac{1}{\rho f} \arccos\left(1 - \frac{k_1 f_2 \Delta f_1}{k_2 f_1 \Delta f_2}\right) \quad (E.10)$$

- 5 En una realización más preferida (figura 6), partiendo de la indentación, δ , y del Módulo de Young efectivo, E_{eff} , cuando la punta se encuentra a una distancia mínima de la muestra, se halla una expresión la fuerza máxima conservativa, F_{max} , a partir de los datos de Δf_1 y Δf_2 .

$$F_{max} = \frac{4}{3} E_{eff} \sqrt{Rd^3} = \frac{8\sqrt{2}}{3} \frac{A_1 \sqrt{k_1 k_2 \Delta f_1 \Delta f_2}}{\sqrt{f_2 f_1}} \quad (E.11)$$

- 10 En el esquema del método de la invención que se ilustra en la Figura 6, el método proporciona los valores del Módulo de Young, la indentación, δ , el tiempo de contacto, t_c , y la fuerza máxima conservativa, F_{max} , en función de la posición de la micropalanca (2).

- En otra realización preferente del método de la invención en la etapa (h) se utiliza otro modelo de fuerza de interacción, donde el cambio en la disipación del modo principal, relacionado con fuerzas no conservativas, permite determinar la viscosidad, η , de la muestra
 15 (4). Para ello se añade al modelo de la fuerza de interacción de Hertz una componente disipativa que puede modelarse como una función par (función de rozamiento generalizado $\Delta\Gamma$) multiplicada por la velocidad de indentación, de tal forma que la fuerza disipativa, $\Delta\Gamma\dot{\delta}$, es una función impar y la fuerza total es:

$$F(d) = F_{cons} + \Delta\Gamma\dot{d} = \frac{4}{3} E^* \sqrt{R}(d)^{3/2} + h\sqrt{Rd} \dot{d} \quad (E.12)$$

- 20 donde η es la viscosidad, la inclusión de una fuerza disipativa da lugar a una ecuación adicional para la energía disipada en términos de la semi-integral de una función $B(d)$ relacionada con la fuerza disipativa.

$$\Delta F_{01}(d) = F_{01} \left(\frac{\Delta f_1(d)}{f_1} + \frac{\sqrt{2\rho} Q_1 f_1}{k_1 A_1^{3/2}} I_-^{1/2} B(d) \right) \quad (E.13)$$

$$B(x) = 2 \int_x^{\infty} \Delta \Gamma(x) dx \quad (\text{E.14})$$

La semi-derivada de la función B se puede calcular analíticamente, dando lugar a una ecuación adicional que permite la conversión de las imágenes de Δf_1 , Δf_2 , y F_{01} en mapas del Módulo de Young efectivo, E_{eff} , la viscosidad, η , y la indentación, δ . El sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas (E_{eff} , δ , η) se puede despejar explícitamente, proporcionando además de las ecuaciones para E_{eff} y δ una ecuación para la viscosidad:

$$h = - \frac{\sqrt{2}}{\sqrt{\rho} A_1 R} \frac{k_2^2}{k_1 f_1 f_2^2 Q_1} \frac{\Delta f_2^2 (\Delta f_1 f_1 F_{01} - \Delta F_{01} f_1^2)}{\Delta f_1^2 F_{01}} \quad (\text{E.18})$$

La Figura 7 muestra una realización del invento para obtener de forma simultánea el Módulo de Young, la viscosidad, la indentación, el tiempo de contacto y la fuerza máxima conservativa como función de la posición de la micropalanca (2) sobre la muestra (4). En una realización más preferente de la invención se aplica a la determinación del Módulo de Young y de la viscosidad en polímeros y moléculas biológicas.

Otra realización preferida del método de la invención tiene lugar cuando la micropalanca (2) opera en el régimen atractivo (no contacto). En este caso, la fuerza de interacción se puede modelar de acuerdo al modelo de Van der Waals,

$$F_{vdw}(d) = - \frac{HR}{6d^2} \quad (\text{E.19})$$

donde "H" es la constante de Hamaker y "d" la distancia mínima entre la punta (3) y la muestra (4). La semi-derivada y la semi-integral de la fuerza de Van der Waals se pueden calcular analíticamente, dando lugar a un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas que se puede despejar explícitamente, proporcionando relaciones para la constante de Hamaker y la distancia mínima entre la punta (3) y la muestra (4). La Figura 8 muestra una realización del invento para obtener de forma simultánea la constante de Hamaker y la distancia mínima sobre la muestra.

$$H = -9 \sqrt{\frac{3}{2}} \frac{A_1^3}{R} \frac{k_1 \Delta f_1}{f_1} \left(\frac{k_1 f_2 \Delta f_1}{k_2 f_1 \Delta f_2} \right)^{3/2} \quad (\text{E.20})$$

$$d_{\min} = \frac{3A_1}{4} \frac{k_1 f_2 \Delta f_1}{k_2 f \Delta f_2} \quad (\text{E.21})$$

5 Conocer la constante de Hamaker es importante para extraer información de la interfase punta (3) – muestra (4). Puede ser utilizada para calcular fuerzas de adhesión y energías superficiales.

10 La relación entre la distancia mínima y el cambio de frecuencia del primer modo, la fuerza de excitación o el tiempo de contacto (como puede verse aunque no se limita al caso de las fórmulas E.10 ó E.11) se puede utilizar para establecer la realimentación que controla la topografía. La determinación de la semi-derivada y la semi-integral de la fuerza de interacción permiten la determinación de dos parámetros que controlan el carácter destructivo de la medida, la fuerza máxima y el tiempo de contacto. Una aplicación del presente invento es precisamente la utilización de la realimentación en tiempo de contacto para efectuar medidas no invasiva de proteínas.

15 En una realización particular del método de la invención, el método se implementa para hallar propiedades de materiales en los que las fuerzas de interacción dependen de dos parámetros que caracterizan el tipo de interacción además de la separación entre la punta (3) y la muestra (4) (como es el caso de las fuerzas de Lennard-Jones, fuerzas del modelo DMT). En este caso es necesaria una ecuación adicional para calcular el resto de
20 parámetros.

En una realización más particular del método, la ecuación adicional se obtiene excitando de forma simultánea un modo adicional de vibración n (y registrando como canal adicional Δf_n). De esta forma se tendrían tres observables conservativos (cambio de frecuencia del primer, segundo y tercer modo) que dan lugar a un sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas
25 del que se extraen las propiedades de la muestra (4).

En otra realización más particular del método de la invención, la ecuación adicional se halla registrando la amplitud B_m de un armónico superior, m , del modo principal con frecuencia mf_1 , para tener tres observables que dan lugar a un sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas del que extraer las propiedades de la muestra (4), donde por un armónico
30 superior, B_m , del modo principal se entiende un múltiplo entero de la frecuencia de

resonancia de dicho modo principal, y donde los tres observables mencionados son: cambio de frecuencia del modo principal y del modo secundario, Δf_1 , Δf_2 , y amplitud, B_m , del armónico superior, m .

$$\Delta B_2(d) = \frac{2}{3k \sqrt{2\rho} A_1} \left(I_-^{1/2} F(d) - \frac{1}{A_1} I_-^{3/2} F(d) \right) \quad (\text{E.22})$$

5

donde $I_-^{3/2} F(d)$ es la integral 3/2 de la fuerza de interacción y B_2 es la amplitud del segundo armónico.

En una realización particular del método de la invención, el método se implementa para hallar propiedades de fuerzas disipativas que dependen de dos parámetros o para calcular el radio, R , de la punta (3) de forma simultánea con el cálculo de la viscosidad. Además de la ecuación que existe para la energía disipada por el modo principal de vibración, también existe una ecuación adicional para la energía disipada por el modo superior de vibración en términos de la semi-integral de la función $\Gamma(d)$:

10

$$\Delta F_{02}(d) = F_{02} \left(\frac{\Delta f_2(d)}{f_2} + \frac{\sqrt{2\rho} Q_2 f_2}{k_2 \sqrt{A_1}} I_-^{1/2} \Delta \Gamma(d) \right) \quad (\text{E.23})$$

15 Esto da lugar a una ecuación adicional que permite la transformación de las imágenes de Δf_1 , Δf_2 , F_{01} y F_{02} en observables que aparecen en un sistema de cuatro ecuaciones. De esta forma, si la componente disipativa de la fuerza incluye una fuerza de histéresis en la energía superficial además de la fuerza viscosa de Voigt, se pueden hallar de forma simultánea la viscosidad η y la histéresis en la energía superficial ΔE_{adh} .

20 El método se podría implementa en líquido, el funcionamiento es equivalente al del aire, incluso mejor porque las fuerzas atractivas están muy apantalladas y normalmente sólo hay régimen repulsivo.

Un ejemplo práctico de empleo de la siguiente invención, que se refiere al cálculo del Módulo de Young efectivo, E_{eff} , viscosidad, η , indentación, δ , fuerza máxima conservativa, F_{max} , y tiempo de contacto en aire, t_c , se describe a continuación, y se muestra en las figuras 9, 10, 11 y 12, utilizando la aproximación para la fuerza de interacción del modelo de Hertz.

25

En dicho ejemplo de aplicación, se analiza una muestra (4) de PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)). El radio, R , de la punta (3) fue estimado al finalizar el experimento, midiendo una

muestra (4) de nanopartículas de oro de radio conocido, obteniéndose un radio de 9.5 nm. Al principio del experimento, se ha de comprobar que se opera bajo las hipótesis correctas: que la amplitud del modo principal es mayor que la longitud típica de la fuerza, y que la amplitud del modo secundario es mucho menor que la del modo principal. Para ello se halla la semi-integral y semi-derivada de la fuerza de forma numérica a partir de la fuerza reconstruida y se compara con la semi-integral y semi-derivada que se hallan a partir del comportamiento de Δf_1 , Δf_2 con la distancia.

Si ambas curvas coinciden (lo que se ilustra en las Figuras 9 y 10), el método es válido para calcular de forma precisa las propiedades del material. Para comprobar la indentación necesaria para medir un Módulo de Young efectivo y una viscosidad constante en la muestra (4) se convierten los datos de Δf_1 , Δf_2 frente a distancia en curvas del Módulo de Young efectivo, E_{eff} , la indentación, δ , la fuerza máxima y el tiempo de contacto, t_c , (Figura 11). Se observa que en este caso el Módulo de Young efectivo, E_{eff} , es constante a partir de una indentación, δ , de sólo 0.25 nm.

Este resultado es una mejora significativa con respecto a otros métodos tales como el método '*peak force tapping*' para el que es necesario penetrar al menos 2 nm. Por último, se procede a registrar la imagen topográfica de forma simultánea a la obtención de los mapas de Módulo de Young efectivo, E_{eff} , viscosidad, η , indentación, δ , fuerza máxima conservativa y tiempo de contacto, t_c . Durante la adquisición de la imagen, se varía el punto de trabajo de tal forma que las fuerzas aumentan. Se observa que en la mitad inferior de las imágenes que se muestran en la Figura 12 se ha cambiado el punto de trabajo de tal forma que la fuerza que la punta (3) de la micropalanca (2) aplica sobre la muestra (4) ha cambiado. Los mapas de la indentación, la fuerza máxima y el tiempo de contacto también muestran un aumento, mientras el Módulo de Young efectivo, la viscosidad y la topografía no muestran cambios.

Este invento puede ser aplicado sobre muestras heterogéneas como se ve en la figura 15, donde sobre una muestra de nanopartículas de oro de 5nm sobre silicio se observa que el módulo de Young de la nanopartícula es del orden de 100-200 GPa.

La presente invención no debe verse limitada por las formas de realización aquí descritas. Otras formas de realización que introduzcan pequeñas variaciones en el método aquí descrito, pueden ser realizadas por los expertos en la materia.

En consecuencia, la presente invención queda definida por el siguiente juego de reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas, basado en modular en frecuencia y de forma simultánea al menos dos modos de vibración de una micropalanca (2) de un microscopio de fuerzas (1), **caracterizado** por emplear los desplazamientos de frecuencia de los modos excitados y los cambios en la fuerza de excitación para cuantificar propiedades nanomecánicas.
2. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según la reivindicación 1, **caracterizado** por que comprende:
 - a. colocar en la cabeza de un microscopio de fuerzas (1) una micropalanca (2) con una punta (3) en su extremo, que interactúa con la muestra (4), y que presenta al menos dos modos de vibración, un modo principal y un modo secundario;
 - b. disponer de dos elementos, uno para hacer vibrar (5) a la micropalanca (2) y el otro para desplazar (13) a la micropalanca (2) sobre la muestra (4) o parte de ella;
 - c. enviar a la unidad de excitación (5) asociada a la micropalanca (2) de la cabeza del microscopio (1), las señales de excitación generadas por (7, 8, 9, 10) y sumar, mediante un sumador de señales (6), las mencionadas señales de excitación que hacen vibrar a la micropalanca (2);
 - d. calibrar los siguientes parámetros asociados a la operación de la micropalanca (2):
 - constante de fuerzas, k_i ;
 - factor de calidad, Q_i ;
 - inversa de la sensibilidad óptica del fotodiodo, i , en cada uno de los dos modos de vibración;
 - radio, R , de la punta (3) de la micropalanca (2);
 - e) comprobar las hipótesis de partida, según las siguientes etapas:

e.1) comprobar que la amplitud de vibración del modo principal de la micropalanca (2) es mayor que la longitud de escala de la fuerza de interacción.

5

e.2) comprobar que la amplitud de vibración, del modo secundario de la micropalanca (2) es muy inferior a la amplitud de vibración, del modo principal;

e.3) fijar una pluralidad de bucles de realimentación que comprenden:

10

–un bucle de realimentación (7) de la amplitud, A_1 , del modo principal de vibración, donde se hace variar la amplitud de excitación de la micropalanca (2) en dicho modo principal, manteniendo constante dicha amplitud, A_1 ;

15

–un bucle de realimentación (8) de la amplitud, A_2 , del modo secundario de vibración, donde se hace variar la amplitud de excitación de la micropalanca (2) en dicho modo secundario, manteniendo constante dicha amplitud, A_2 ;

20

–un bucle de realimentación (9), de fase, φ_1 , del modo principal de vibración, donde se hace variar la frecuencia de excitación, f_1 de la micropalanca (2) en dicho modo principal, manteniendo constante la fase, φ_1 , en un valor igual a $\pi/2$;

25

–un bucle de realimentación (10), de fase, φ_2 , del modo secundario de vibración, donde se hace variar la frecuencia de excitación, f_2 , de la micropalanca (2) en dicho modo secundario, manteniendo constante la fase, φ_2 , en un valor igual a $\pi/2$;

–un bucle de realimentación (11) responsable de regular la distancia media (12) entre la punta (3) de la micropalanca (2) y la muestra (4) y controlar así la realimentación topográfica (11).

f) detectar, mediante un sistema (14) adaptado al efecto, la señal de deflexión de la micropalanca (2);

30

g) registrar, mediante una unidad de procesamiento (15) provista de al menos dos canales de transferencia de información, las señales correspondientes a

los modos de vibración, donde dicho registro puede realizarse simultáneamente o posteriormente a la adquisición de una imagen de microscopía;

- 5 h) transformar, mediante el empleo de fórmulas analíticas, los datos mostrados en los mapas paramétricos de propiedades de la muestra (4).
3. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según la reivindicación 2, **caracterizado** por que el sistema punta (3) - micropalanca (2) se sitúa sobre una muestra (4) heterogénea para medir diversas propiedades mecánicas como el Módulo de Young efectivo, E_{eff} , la viscosidad, η , de la muestra (5), o la constante de Hamaker, H , de la interfase.
- 10 4. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, **caracterizado** por que en la etapa (c) del método en que se generan las señales de excitación, la micropalanca (2) es excitada según los mencionados modo principal y modo secundario de vibración.
- 15 5. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según la reivindicación 4, **caracterizado** por que la señal resultante que llega a la micropalanca (2) viene expresada según la siguiente relación matemática:

$$F_{exc}(t) = F_{01}z_1(t - \frac{4}{3}f_1) + F_{02}z_2(t - \frac{4}{3}f_2) \quad (E.7)$$

20 donde F_{0i} , f_i son, respectivamente, la señal de excitación, y la frecuencia de excitación del modo i que son transferidas al elemento que excita la vibración de la micropalanca (2).

6. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según la reivindicación 5, **caracterizado** por que la señal se genera utilizando la señal de referencia de un dispositivo *lock-in* digital comprendido dentro de un procesador digital de señal.
- 25 7. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, **caracterizado** por que en la etapa (h) del método en que se transforman los datos mostrados en los mapas paramétricos de propiedades de la muestra (4), se utilizan los cambios en las frecuencias de resonancia del modo principal, Δf_1 , y del modo secundario, Δf_2 , para hallar el Módulo de Young
- 30

efectivo, E_{eff} , de la muestra (4) y la indentación, δ , en función de la posición de la micropalanca (2) sobre la muestra (4).

8. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según la reivindicación 7, **caracterizado** por que los datos de cambio en la frecuencia de resonancia del modo principal, Δf_1 , y cambio en la frecuencia de resonancia del modo secundario, Δf_2 , se convierten, mediante un cálculo analítico, y simultáneamente o posteriormente a la adquisición de una imagen, en mapas paramétricos que expresan el Módulo de Young efectivo, E_{eff} , y la indentación, δ .
9. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas según la reivindicación 8, **caracterizado** por que la fuerza de interacción se modela de acuerdo al modelo de Hertz y el Módulo de Young efectivo, E_{eff} , y la indentación, δ , se calculan mediante el siguiente sistema de ecuaciones:

$$E_{eff} = \frac{2\sqrt{2} k_2^2 f_1 \Delta f_2^2}{\sqrt{A_1 R} k_1 f_2^2 \Delta f_1} \quad (E.8)$$

$$d = \frac{A_1 k_1 f_2 \Delta f_1}{k_2 f_1 \Delta f_2} \quad (E.9)$$

10. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según la reivindicación 8, **caracterizado** por que el tiempo de contacto, t_c , entre la punta (3) y la muestra (4) se calcula mediante la siguiente expresión matemática:

$$t_c = \frac{1}{p f_1} \arccos\left(1 - \frac{d}{A_1}\right) = \frac{1}{p f_1} \arccos\left(1 - \frac{k_1 f_2 \Delta f_1}{k_2 f_1 \Delta f_2}\right) \quad (E.10)$$

11. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según la reivindicación 8, **caracterizado** por que cuando la punta (3) se encuentra a una distancia mínima de la muestra (4), se calcula la fuerza máxima conservativa de Hertz, F_{max} , según la siguiente expresión matemática:

$$F_{max} = \frac{4}{3} E_{eff} \sqrt{Rd^3} = \frac{8\sqrt{2}}{3} \frac{A_1 \sqrt{k_1 k_2 \Delta f_1 \Delta f_2}}{\sqrt{f_2 f_1}} \quad (E.11)$$

12. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 y 7, **caracterizado** por que en la etapa (h) del método en que se transforman los datos mostrados en los mapas paramétricos de propiedades de la muestra, se utilizan los cambios en las frecuencias de resonancia del modo principal, y del modo secundario, y el cambio en la señal de excitación del modo principal para hallar la viscosidad, η , el módulo de Young efectivo, E_{eff} , de la muestra (4) y la indentación, δ , en función de la posición de la micropalanca (2) sobre la muestra (4).

13. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según las reivindicaciones 8, 9 y 12, **caracterizado** por que se añade al modelo de la fuerza conservativa de Hertz una componente disipativa que puede modelarse como proporcional a la velocidad de indentación, de tal forma que la fuerza total de interacción se expresa mediante la siguiente relación matemática:

$$F(d) = F_{cons} + \Delta\Gamma\dot{d} = \frac{4}{3}E^*\sqrt{R}(d)^{3/2} + h\sqrt{Rd}\dot{d} \quad (E.12)$$

donde $\Delta\Gamma$ es una función par denominada función de rozamiento generalizado, y \dot{d} es la velocidad de indentación en la muestra (4);

de manera que la inclusión de la mencionada componente disipativa de la fuerza da lugar a una ecuación adicional para la energía disipada en términos de la semi-integral de una función, $B(d)$, relacionada con la fuerza disipativa:

$$\Delta F_{01}(d) = F_{01} \left(\frac{\Delta f_1(d)}{f_1} + \frac{\sqrt{2p} Q_1 f_1}{k_1 A_1^{3/2}} I_-^{1/2} B(d) \right) \quad (E.13)$$

donde la función B se define mediante la siguiente expresión matemática:

$$B(x) = 2 \int_x^\infty \Delta\Gamma(x) dx \quad (E.14)$$

dando lugar a una ecuación adicional que permite la conversión de las imágenes de Δf_1 , Δf_2 y F_{01} en mapas paramétricos del módulo de Young efectivo, E_{eff} , de la viscosidad, η , y de la indentación, δ , y haciendo que el sistema de tres ecuaciones:

$$\Delta f_1(d) = \frac{f_1}{k_1 \sqrt{2\rho} A_1^3} \frac{E_{eff} \sqrt{\rho} R d^2}{2} \quad (E.15)$$

5

$$\Delta f_2(d) = \frac{f_2}{2k_2 \sqrt{2\rho} A_1} E_{eff} \sqrt{\rho} R d \quad (E.16)$$

$$\Delta F_{01}(d) = F_{01} \left(\frac{\Delta f_1(d)}{f_1} + \frac{\sqrt{2\rho} Q_1 f_1 h \sqrt{\rho} R d^2}{k_1 A_1^{3/2} 2} \right) \quad (E.17)$$

con tres incógnitas, E_{eff} , δ , η , se pueda expresar explícitamente, proporcionando además de las ecuaciones para el módulo de Young efectivo, E_{eff} , y para la indentación, δ , una ecuación para la viscosidad, η , expresada de la siguiente manera:

10

$$h = -\frac{\sqrt{2}}{\sqrt{\rho} A_1 R} \frac{k_2^2}{k_1 f_1 f_2^2 Q_1} \frac{\Delta f_2^2 (\Delta f_1 f_1 F_{01} - \Delta F_{01} f_1^2)}{\Delta f_1^2 F_{01}} \quad (E.18)$$

14. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, **caracterizado** por que la micropalanca (2) opera en régimen atractivo o de no contacto, y la fuerza de interacción entre la punta (3) y la muestra (4) se modela de acuerdo al siguiente modelo matemático, conocido como modelo de Van der Waals:

15

$$F_{vdw}(d) = -\frac{HR}{6d^2} \quad (E.19)$$

donde d es la distancia entre la punta (3) y la muestra (4).

15. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según la reivindicación 14, **caracterizado** por que se calculan analíticamente la semi-derivada y la semi-integral de la fuerza de interacción del modelo de van der Waals, dando lugar a un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas, que se puede expresar

20

explícitamente, proporcionando relaciones para la constante de Hamaker, H, y la distancia mínima, d_{\min} , entre punta (3) y muestra (4):

$$H = -9 \sqrt{\frac{3}{2}} \frac{A_1^3}{R} \frac{k_1 \Delta f_1}{f_1} \left(\frac{k_1 f_2 \Delta f_1}{k_2 f_1 \Delta f_2} \right)^{3/2} \quad (\text{E.20})$$

$$d_{\min} = \frac{3A_1}{4} \frac{k_1 f_2 \Delta f_1}{k_2 f \Delta f_2} \quad (\text{E.21})$$

- 5 16. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según la reivindicación 15, **caracterizado** por que la distancia media (12) entre la punta (3) y la muestra (4) se controla manteniendo un cambio en la frecuencia, Δf_1 , fijo mientras la micropalanca (2) se desplaza a lo largo y ancho de la muestra (4).
- 10 17. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según la reivindicación 15, **caracterizado** por que la distancia media (12) entre la punta (3) y la muestra (4) se controla manteniendo una fuerza de excitación, F_{01} , fija.
- 15 18. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según la reivindicación 2, **caracterizado** por que en la etapa e3) se establece el sistema de realimentación (11) topográfico del quinto bucle en otros parámetros como el tiempo de contacto, t_c , o la fuerza máxima, F_{\max} , en valores pre-establecidos alternativas al cambio de frecuencia de resonancia, Δf_1 , o disipación, ΔF_{01} .
19. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según la reivindicación 18, **caracterizado** por que se utiliza realimentación en tiempo de contacto, t_c , para efectuar medidas no invasivas en materiales blandos.
- 20 20. Método bimodal para cuantificar propiedades, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** por que las fuerzas de interacción entre la punta (3) y la muestra (4) se modelan mediante dos parámetros además de la separación entre la punta y la muestra, de manera que se añade una nueva ecuación que se obtiene al excitar un modo adicional de vibración, n , y registrando como canal adicional, Δf_n , para tener tres observables conservativos, siendo éstos los cambios de frecuencia de cada modo de vibración, de manera que se obtiene un sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas del que extraer las propiedades de la muestra, donde por observables se entiende los parámetros medidos directamente por el microscopio de fuerzas bimodal.
- 25

21. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** por que las fuerzas de interacción entre la punta (3) y la muestra (4) se modelan mediante dos parámetros además de la separación entre la punta y la muestra, de manera que la ecuación adicional se halla registrando la amplitud B_m de un armónico superior, m , del modo principal con frecuencia m_{f_1} , para tener tres observables que dan lugar a un sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas del que extraer las propiedades de la muestra (4), donde por un armónico superior, B_m , del modo principal se entiende un múltiplo entero de la frecuencia de resonancia de dicho modo principal, y donde los tres observables mencionados son: cambio de frecuencia del modo principal y del modo secundario, Δf_1 , Δf_2 , y amplitud, B_m , del armónico superior, m ,

$$\Delta B_2(d) = \frac{2}{3k \sqrt{2p A_1}} \left(I_-^{1/2} F(d) - \frac{1}{A_1} I_-^{3/2} F(d) \right) \quad (\text{E.22})$$

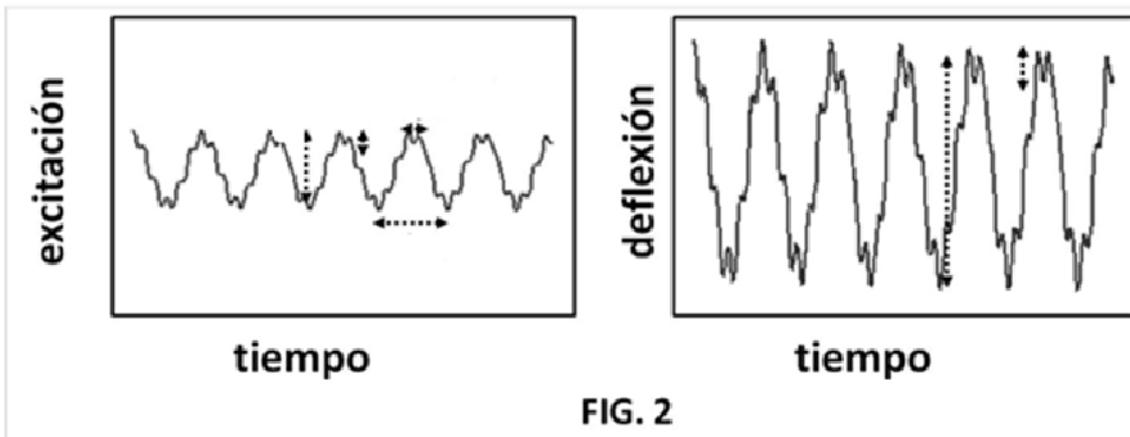
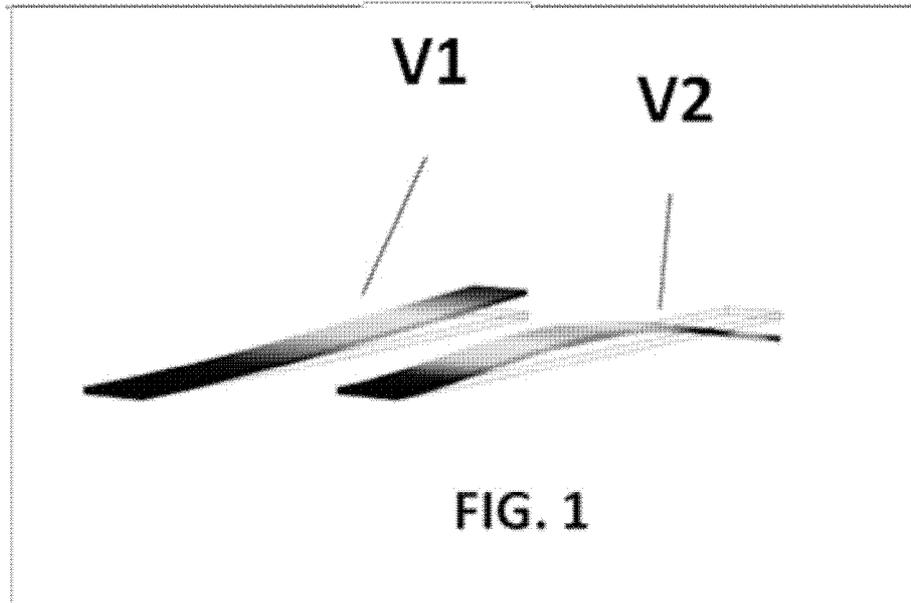
donde $I_-^{3/2} F(d)$ es la integral 3/2 de la fuerza de interacción y B_2 es la amplitud del segundo armónico.

22. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas según la reivindicación 13, **caracterizado** por que la fuerza de interacción contiene una componente disipativa dependiente de dos parámetros y se registra de forma adicional el canal disipación del modo secundario de vibración para utilizar la ecuación que relaciona la energía disipada por el modo secundario con la semi-integral de la función $\Gamma(d)$:

$$\Delta F_{02}(d) = F_{02} \left(\frac{\Delta f_2(d)}{f_2} + \frac{\sqrt{2\pi Q_2} f_2}{k_2 \sqrt{A_1}} I_-^{1/2} \Delta \Gamma(d) \right) \quad (\text{E.23})$$

dando lugar a una ecuación adicional que permite la transformación de las imágenes de Δf_1 , Δf_2 , F_{01} y F_{02} en observables que aparecen en un sistema de cuatro ecuaciones para hallar simultáneamente la viscosidad, η , y la histéresis de la energía superficial, ΔE_{adh} .

23. Método bimodal para cuantificar propiedades no topográficas en microscopía de fuerzas según cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por que la medida se realiza teniendo la muestra inmersa en líquido.



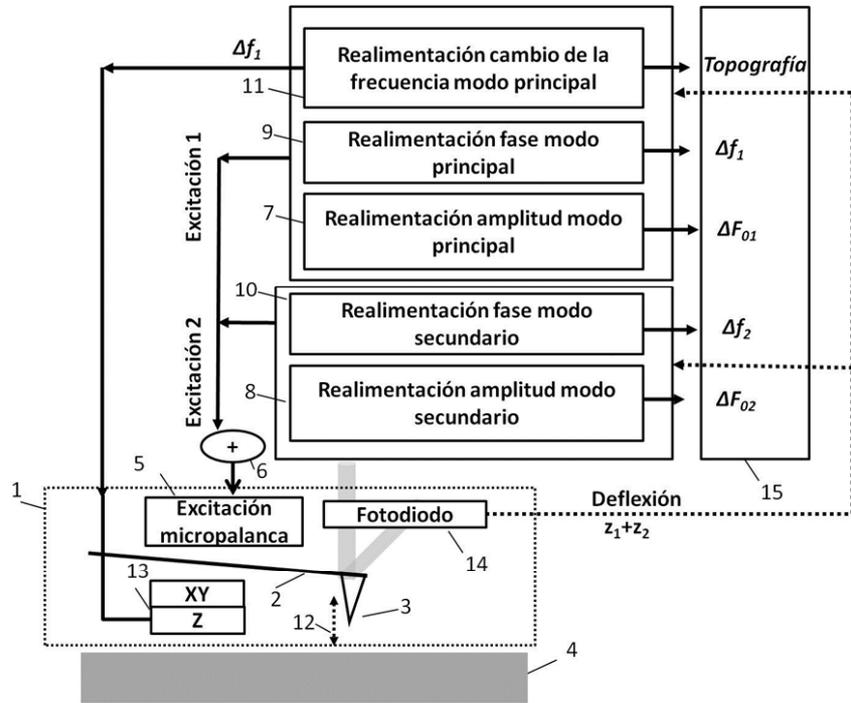


FIG. 3

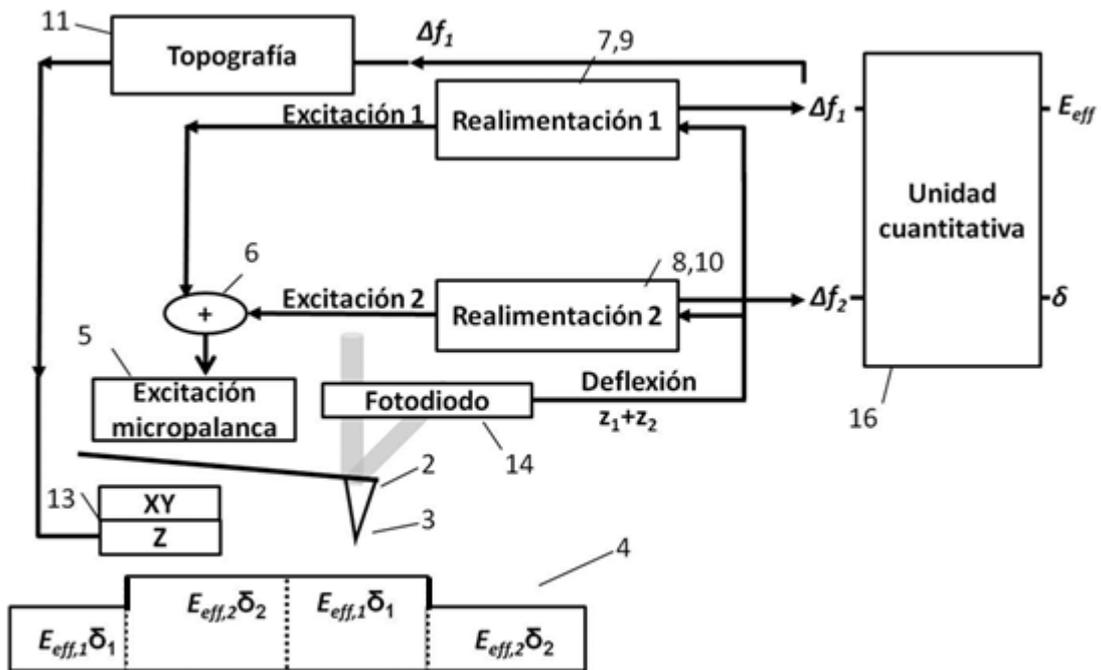


FIG. 4

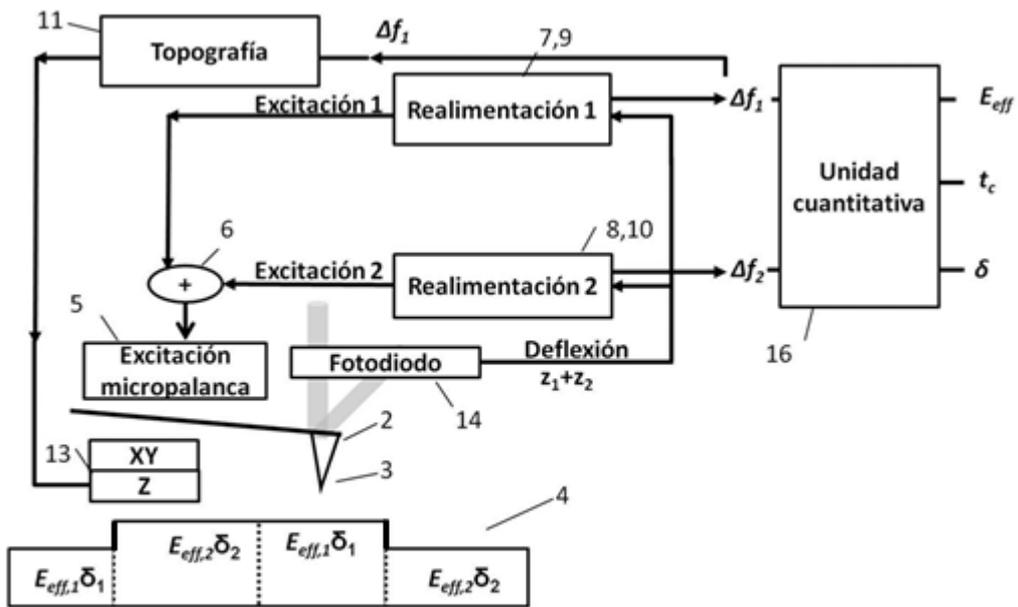


FIG. 5

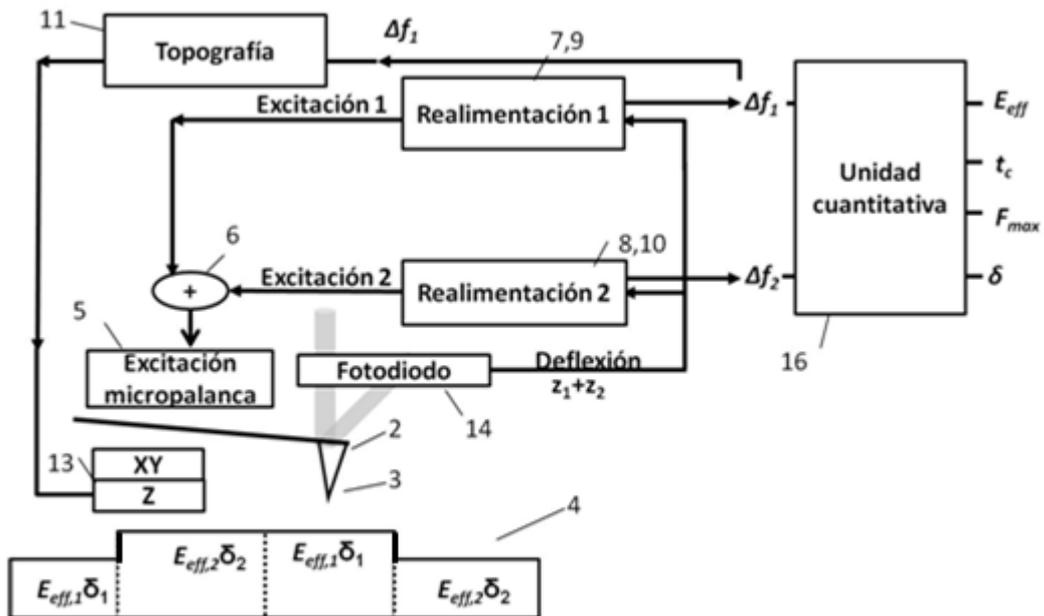


FIG. 6

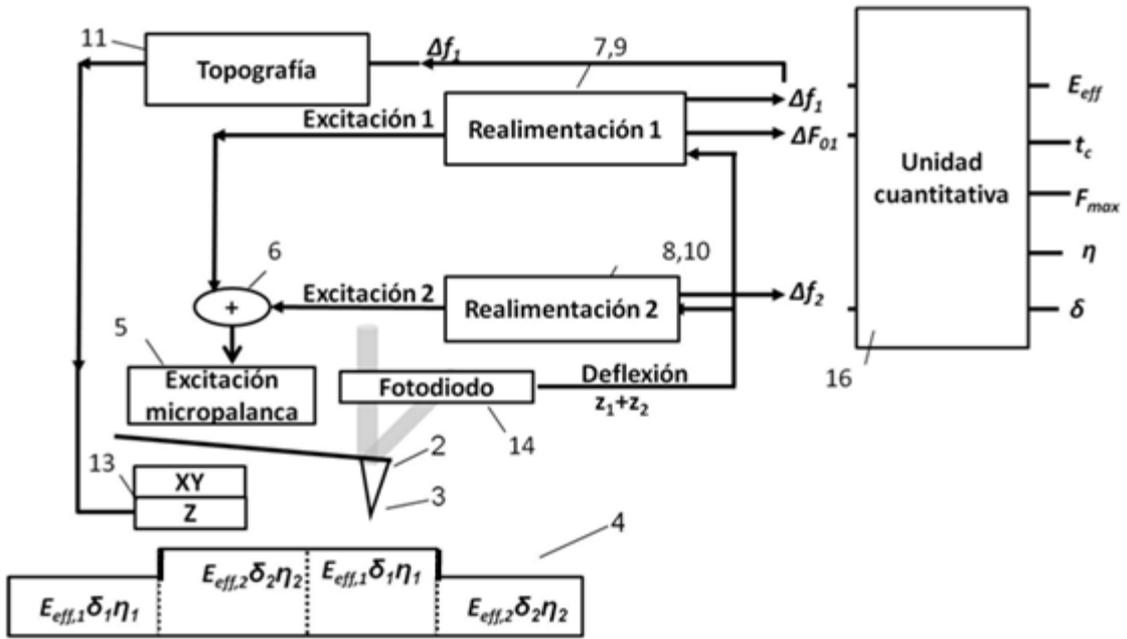


FIG. 7

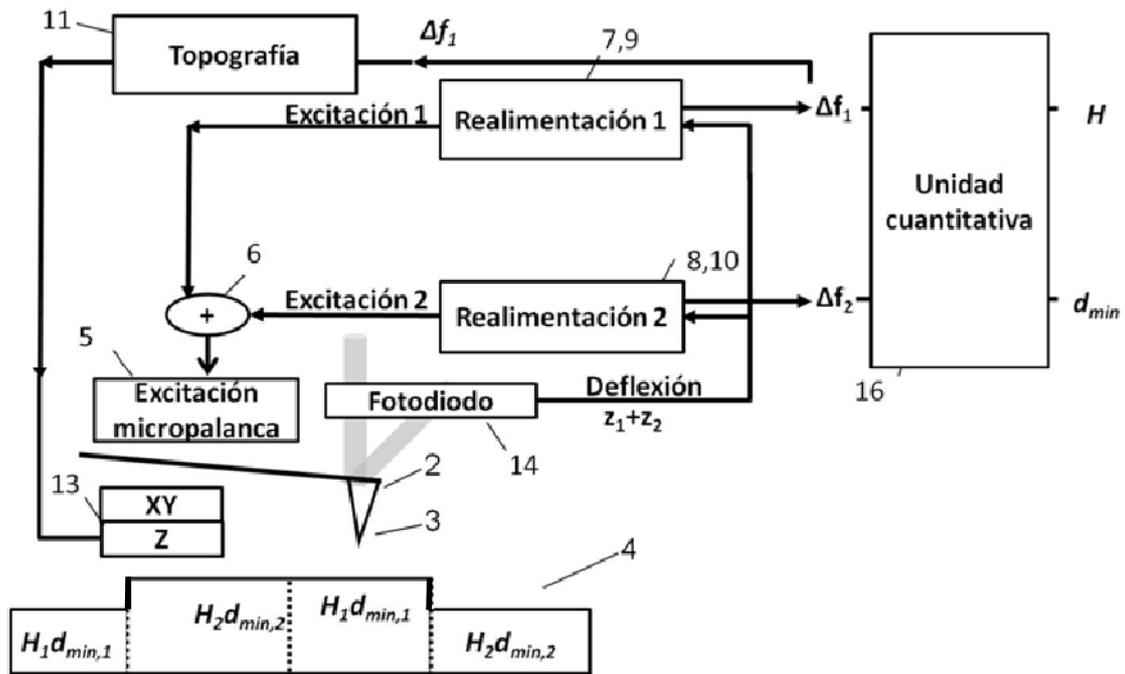


FIG. 8

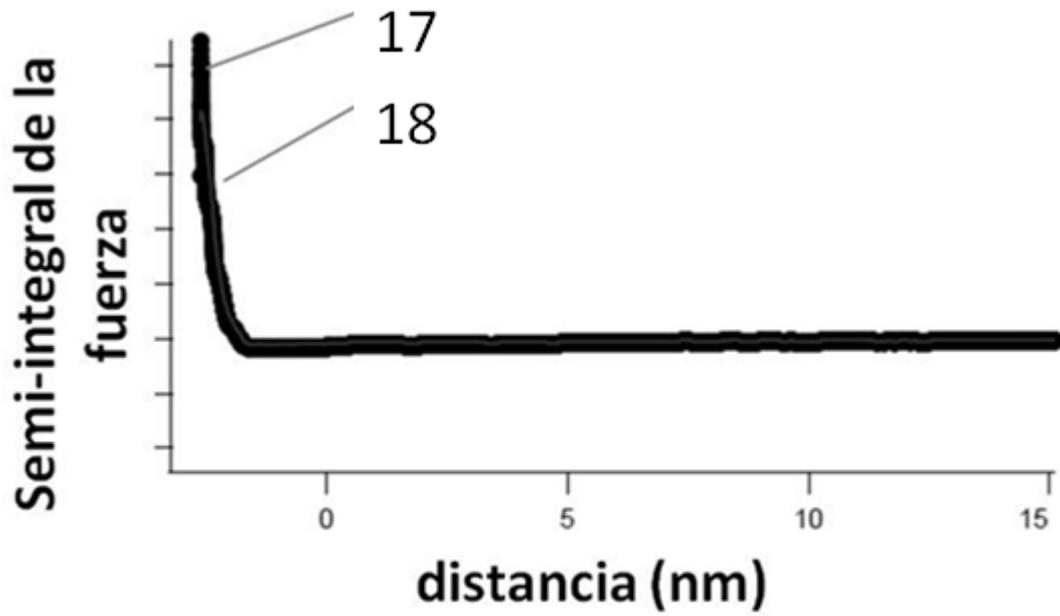


FIG. 9

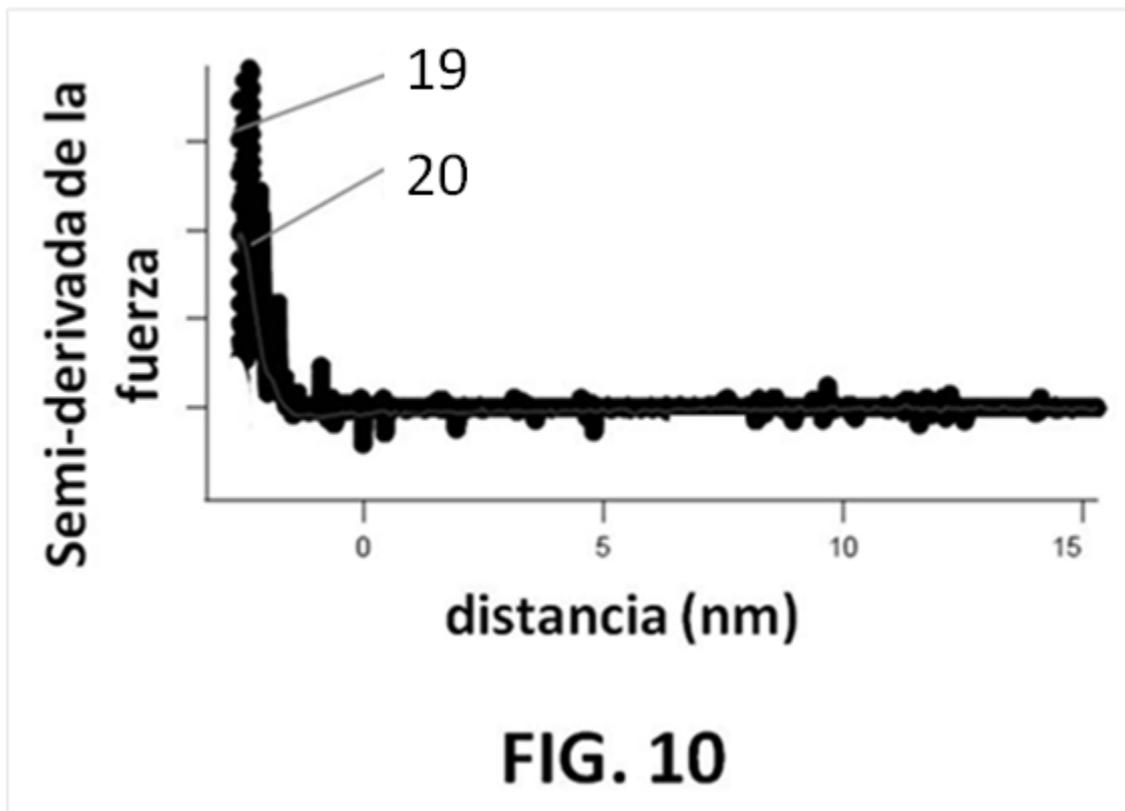


FIG. 10

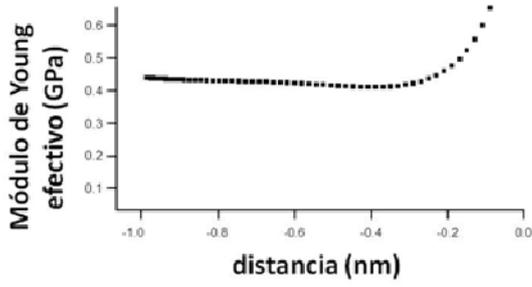


FIG. 11A

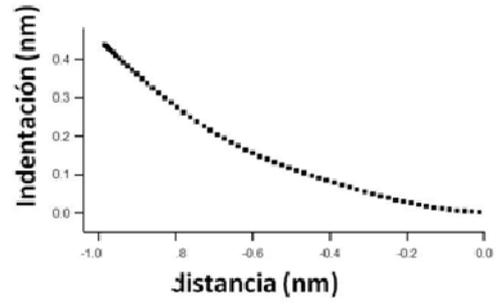


FIG. 11B

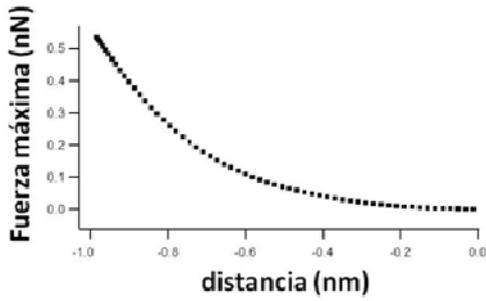


FIG. 11C

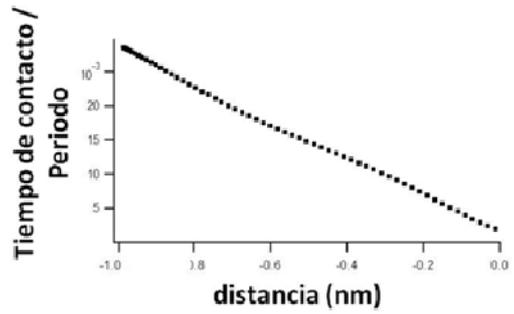


FIG. 11D

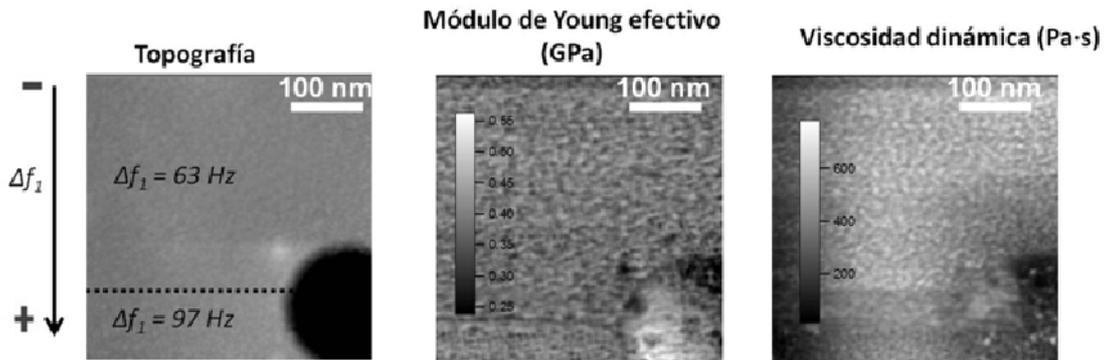


FIG. 12A

FIG. 12B

FIG. 12C

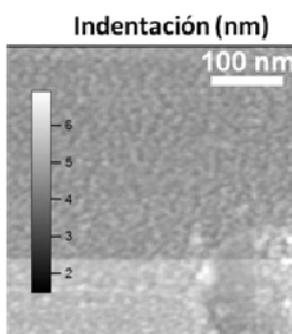


FIG. 12D

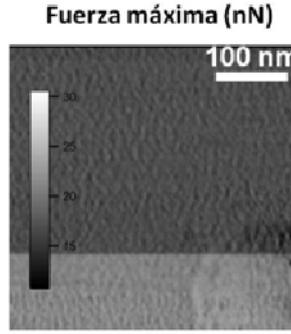


FIG. 12E

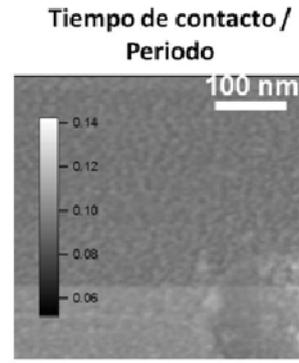


FIG. 12F

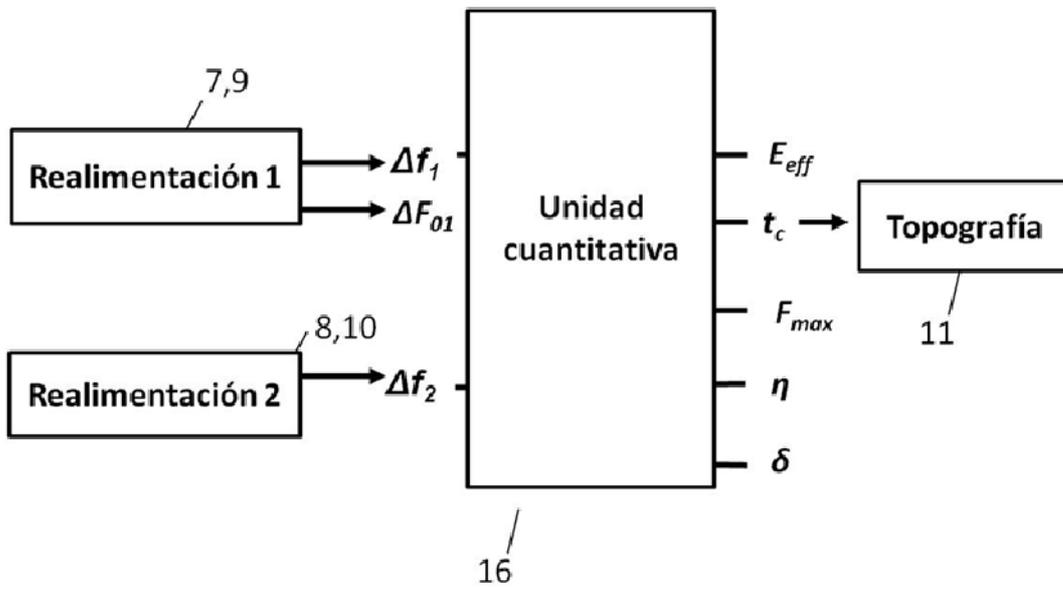


FIG. 13

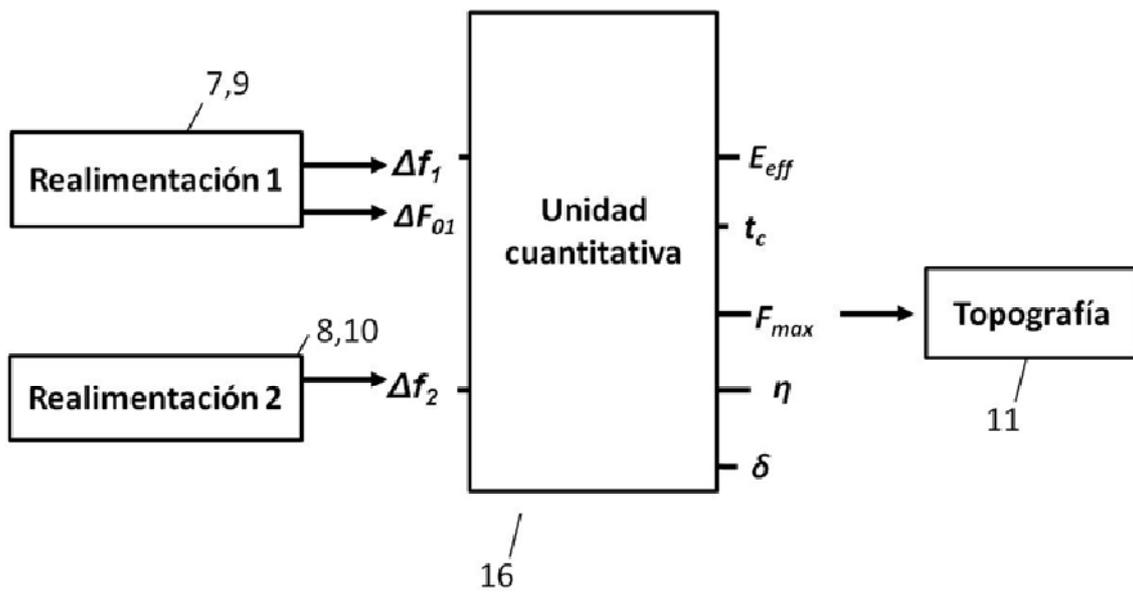


FIG. 14

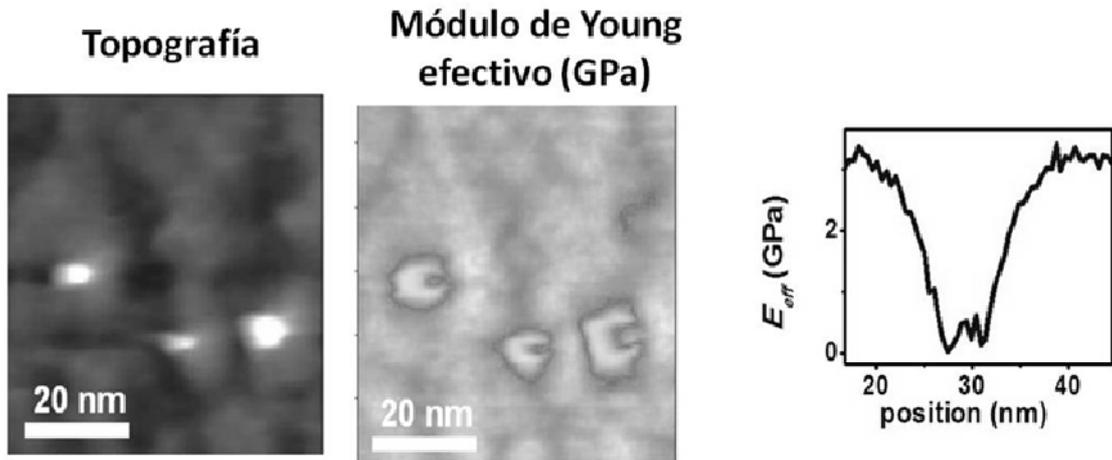


FIG. 15