



Facultad de Física y de Óptica y Optometría
Área de Óptica
Departamento de Física Aplicada

Espectrometría de masa y rigidez basada en resonadores nanomecánicos

Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Físicas presentada por:

Oscar Malvar Vidal

Dirigida por el Doctor:

Francisco Javier Tamayo de Miguel

Tutelada por el Doctor:

Vicente Moreno de las Cuevas





Facultad de Física y de Óptica y Optometría
Área de Óptica
Departamento de Física Aplicada

Espectrometría de masa y rigidez basada en resonadores nanomecánicos

Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Físicas presentada por:

Oscar Malvar Vidal

Dirigida por el Doctor:

Francisco Javier Tamayo de Miguel

Tutelada por el Doctor:

Vicente Moreno de las Cuevas





© 2017

Oscar Malvar Vidal
All Rights Reserved

La presente Tesis Doctoral ha sido llevada a cabo gracias a la financiación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) a través de una beca predoctoral del MINECO para la formación de investigadores (FPI) a través del proyecto MAT 2012-36197.

Agradecer el servicio del laboratorio X-SEM del IMM y la financiación del MINECO con el proyecto CSIC13-4E-1794 con el apoyo de la Unión Europea (FEDER, FSE).

Este trabajo fue apoyado por el MINECO a través del proyecto ERC (“European Research Council”) NANOFORCELLS (ERC-StG-2011-278860)



D. Francisco Javier Tamayo de Miguel, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) del grupo de Bionanomecánica del Instituto de Microelectrónica de Madrid, como director y **D. Vicente Moreno de las Cuevas** profesor del Área de Óptica del Dpto. de Física Aplicada de la Universidad de Santiago de Compostela, como tutor,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “*Espectrometría de masa y rigidez basado en resonadores nanomecánicos*”, realizado por **D. Oscar Malvar Vidal** dentro del grupo de Bionanomecánica del Instituto de Microelectrónica de Madrid perteneciente al consejo superior de investigaciones científicas (IMM-CSIC) situado en Tres Cantos (Madrid), ha sido revisado y está en disposición de ser presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias Físicas.

Fdo.: Francisco Javier Tamayo de Miguel

Director de la Tesis



Fdo.: Vicente Moreno de las Cuevas

Tutor de la Tesis

Fdo.: Oscar Malvar Vidal

Estudiante de doctorado

En Tres Cantos a 15 de mayo del 2017

D. Francisco Javier Tamayo de Miguel, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) del grupo de Bionanomecánica del Instituto de Microelectrónica de Madrid, como director y **D. Vicente Moreno de las Cuevas** profesor del Área de Óptica del Dpto. de Física Aplicada de la Universidad de Santiago de Compostela, como tutor,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “*Espectrometría de masa y rigidez basado en resonadores nanomecánicos*”, realizado por **D. Oscar Malvar Vidal** dentro del grupo de Bionanomecánica del Instituto de Microelectrónica de Madrid perteneciente al consejo superior de investigaciones científicas (IMM-CSIC) situado en Tres Cantos (Madrid), ha sido revisado y está en disposición de ser presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias Físicas.

Fdo.: Francisco Javier Tamayo de Miguel

Director de la Tesis

Fdo.: Vicente Moreno de las Cuevas

Tutor de la Tesis

Fdo.: Oscar Malvar Vidal

Estudiante de doctorado

Tres Cantos, a 15 de mayo 2017

RESUMEN

Este trabajo de tesis doctoral titulado: “*Espectrometría de masa y rigidez basada en resonadores nanomecánicos*” dirigido por el doctor Francisco Javier Tamayo de Miguel (Instituto de Microelectrónica de Madrid – CSIC) y bajo la tutela del doctor Vicente Moreno de las Cuevas (Facultad de Óptica y Optometría, Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Santiago de Compostela) ha sido realizada en el laboratorio de Bionanomecánica del Instituto de Microelectrónica de Madrid perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IMM-CSIC).

El objetivo principal de este trabajo de tesis doctoral ha sido el desarrollo de un espectrómetro de masa y rigidez basado en resonadores nanomecánicos. Un resonador nanomecánico, tipo puente o palanca en la escala micro- y nanométrica, es un tipo de dispositivo que se encuentra enmarcado dentro de lo que se conocen como sistemas nanoelectromecánicos o NEMS (“*NanoElectroMechanical Systems*”). Los NEMS aparecen por primera vez con la invención de la microscopía de efecto túnel o STM (“*Scanning Tunneling Microscopy*”) y del microscopio de fuerzas atómicas o AFM (“*Atomic Force Microscope*”). Este tipo de microscopios se basa en la medida directa de la deflexión de un resonador tipo palanca, o en la medida de su frecuencia de resonancia, para realizar la topografía de superficies con resolución atómica. Se pueden ver como un fonógrafo en miniatura, en el cual se utiliza una micropalanca con una punta afilada en su extremo libre. Para medir tanto la deflexión como la frecuencia de resonancia de las micropalancas se utiliza el método de deflexión de un haz láser, es decir, se hace incidir un láser en el extremo libre de la micropalanca y el haz reflejado es recogido por un fotodetector sensible a la posición o un fotodetector segmentado. Posteriormente, las micropalancas se empezaron a utilizar como sensores tanto en modo estático como en modo dinámico. Su uso como sensores abarca campos tan amplios como la calorimetría, sensores giroscópicos, sensores de masa, sensores de fuerza, detectores de explosivos, detección de la hibridación de ADN, sensores optoplasmónicos, entre otros.

Los resonadores micro- y nanomecánicos se pueden utilizar como sensores en dos modos de operación: modo estático y modo dinámico. El principio de operación en modo estático se basa en la medida de la deflexión de la palanca debido a una diferencia de tensión entre sus dos caras. Por otra parte, el modo dinámico se basa en la medida del cambio de la frecuencia de resonancia cuando el resonador sufre algún tipo de interacción, por ejemplo, mediante la adsorción de partículas sobre su superficie. En este trabajo nos hemos centrado en el uso de resonadores nanomecánicos en modo dinámico.

Para comenzar este manuscrito se introduce la teoría nanomecánica a partir de la teoría de la elasticidad, explicando el tensor deformación y el tensor de tensiones de un sistema elástico, así como la ley de Hooke. A continuación, se describe la ecuación de Euler-Bernoulli y se resuelve tanto espacial como temporalmente para los dos tipos de resonadores más utilizados: resonador tipo puente, es decir, con sus dos extremos anclados, y resonador tipo palanca, el cual solo tiene un extremo anclado y el otro libre. Finalmente, se introduce el modelo del oscilador armónico para modelizar la respuesta de los nanoresonadores. Las ecuaciones descritas en el primer capítulo de este trabajo serán utilizadas a lo largo de esta tesis doctoral y sientan las bases teóricas de los resonadores nanomecánicos.

Aunque este trabajo está centrado en el desarrollo de un espectrómetro de masa y rigidez nanomecánico basado en micropalancas, también se han realizado estudios de diferentes resonadores para ser utilizados en un futuro como sensores de masa y de rigidez. Los resonadores unidimensionales, como los nanohilos de silicio, han sido caracterizados y estudiados por el grupo de Bionanomecánica y se han propuesto como excelentes candidatos para su uso como sensores de masa y rigidez nanomecánicos. Los avances en las técnicas de nanofabricación y en la tecnología del silicio están permitiendo tener un control de las dimensiones de los nanoresonadores sin precedentes. Los nanohilos de silicio han sido fabricados mediante técnicas “*Bottom-up*” en el Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CSIC). Estos resonadores crecen horizontalmente en unas trincheras prefabricadas sobre silicio. Para la medida de su frecuencia de resonancia se ha desarrollado un sistema interferométrico tipo Fabry-

Perot, mediante un láser de Helio-Neón, el cual se enfoca en el extremo libre del nanohilo, y un fotodetector que recoge la señal reflejada en el sustrato. Básicamente, la señal incidente y reflejada en el sustrato genera una onda estacionaria la cual es modulada por la vibración del nanoresonador. De esta manera se consigue detectar el ruido termomecánico, y por tanto, medir las frecuencias de resonancia flexurales a partir de la transformada de Fourier de la señal del fotodetector.

Los nanohilos de silicio estudiados en este trabajo se presentan con un grado de conicidad, es decir, el radio en el extremo anclado es mayor que el radio en el extremo libre. Esta característica, muchas veces indeseable, hace que las frecuencias y las formas de los modos de oscilación cambien con respecto a los nanohilos uniformes. Esto se traduce en un aumento drástico en la sensibilidad en masa, lo cual hace de estos resonadores unos dispositivos muy interesantes para su utilización como sensores de masa y rigidez. Para estudiar estos nanoresonadores se han realizado simulaciones por elementos finitos, así como experimentos y un estudio teórico de cómo afecta este grado de conicidad a las propiedades mecánicas de los resonadores. Mediante estos estudios se ha obtenido como depende la forma del modo y la frecuencia de resonancia de los dos primeros modos flexurales de vibración en función de la conicidad del nanohilo. Una característica interesante es la posibilidad de obtener el grado de conicidad sin la necesidad de utilizar microscopios electrónicos de barrido (SEM, “*Scanning Electron Microscope*”), mediante la medida de la frecuencia de resonancia de los dos primeros modos flexurales de oscilación. Aunque estos nanoresonadores unidimensionales poseen excelentes características como sensores, como es su reducida masa, sus altas frecuencias de resonancia ($\sim MHz$) y sus altos factores de calidad ($\sim 10^4 - 10^6$), también poseen un importante inconveniente: su reducida área de detección. Esto ha hecho que los nanohilos de silicio no se hayan usado como sensores de masa y rigidez en el espectrómetro desarrollado en este trabajo.

Otro estudio realizado durante este trabajo de tesis doctoral ha sido la caracterización de microcapilares resonantes de sílice fundido como sensores de densidad de líquidos en tiempo real y a presión

atmosférica. En los últimos años han ido apareciendo diferentes publicaciones sobre microresonadores huecos en los cuales se hace fluir un líquido por unos canales micro-fabricados en su interior. Estos microresonadores tipo palanca necesitan de avanzadas técnicas de microfabricación, así como laboratorios altamente especializados. Debido a que el líquido y las partículas de intereses fluyen por el interior de los microresonadores y, por tanto, pueden ser introducidos en vacío, el factor de calidad no se ve degradado y la sensibilidad del dispositivo aumenta drásticamente si lo comparamos con las micropalancas convencionales en líquido. Con estos dispositivos se han conseguido medir la masa de proteínas, nanopartículas y bacterias con una gran sensibilidad. En este trabajo de tesis doctoral se ha desarrollado un sensor de densidad de líquidos basado en microcapilares disponibles comercialmente. El sensor se basa en un microcapilar resonante de sílice fundido tipo puente, es decir, anclado mecánicamente en sus dos extremos. El sistema experimental consiste en un láser de diodo que se hace incidir en la mitad de la región suspendida del microcapilar y el haz transmitido es recogido por un fotodetector. Una cerámica piezo eléctrica situada en uno de los extremos se utiliza para excitar el microcapilar resonante en torno a su frecuencia fundamental de oscilación. Mediante un amplificador lock-in con PLL (“Phase-Locked Loop”, o lazo de seguimiento de fase) se consigue seguir la frecuencia de resonancia del primer modo flexural en el tiempo. El principio físico del sensor se basa en la medida del cambio relativo de la frecuencia de resonancia en función de la densidad del líquido que fluye por su interior. Para ello se hace pasar un líquido de referencia y cuando el líquido de interés fluye por el interior del microcapilar, la frecuencia cambia. Este cambio depende del cambio de densidad entre los líquidos. Con este sencillo y barato sensor, realizable en la mayoría de laboratorios, se ha conseguido detectar un 0.5% de etanol en agua con una responsividad de 0.0314 mL/g. En un futuro, estos resonadores se podrían utilizar como sensores de masa y rigidez para la caracterización de entidades macromoleculares simplemente disminuyendo su tamaño, lo cual conlleva una disminución de su masa y un aumento de su frecuencia de resonancia. De esta manera se podrían alcanzar sensibilidades muchos

mayores, abriendo las puertas a nuevos sensores basados en la medida de la oscilación de microcapilares resonantes de sílice fundido.

El pilar central de este trabajo de tesis doctoral ha sido el desarrollo de un espectrómetro de masa y rigidez nanomecánico para la caracterización de nanopartículas y entidades biológicas intactas. Los espectrómetros de masa convencionales son capaces de medir la relación carga/masa de especies moleculares cargadas con una gran precisión. Sin embargo, están limitadas a especies ligeras, entre 100 *Da* y 100 *kDa* y por lo tanto poseen un bajo rango dinámico. Cuando se quieren caracterizar partículas de mayor tamaño la espectrometría convencional utiliza diversas técnicas de fragmentación, lo cual produce un espectro complejo y difícil de interpretar. Por otra parte, un espectrómetro basado en resonadores nanomecánicos no necesita ionizar ni fragmentar las especies, ya que se basa en la medida directa y en tiempo real del cambio en la frecuencia de resonancia producida por la adsorción de especies sobre la superficie del resonador. Además, los resonadores nanomecánicos no son sólo sensibles a la masa de los adsorbatos, sino también a su rigidez. Por lo tanto, estos dispositivos se postulan como extraordinarios candidatos para su utilización como sensores de masa y rigidez. En los últimos años se ha demostrado la importancia que tiene la rigidez en los procesos biológicos. Por ejemplo, la rigidez de una célula sana difiere de la rigidez de una célula cancerígena o metastásica. También se ha demostrado que la rigidez juega un papel vital en el ciclo biológico de los virus, por ejemplo, el virus del VIH cambia drásticamente su rigidez cuando pasa de estado latente a estado infeccioso. Por tanto, existe la necesidad de nuevos sensores capaces de caracterizar diferentes entidades por medio de su masa y rigidez.

En este trabajo se introduce la técnica de ionización mediante electrospray utilizada para ionizar las partículas de interés presentes en la disolución y enviarlas al resonador. Para ello se ha utilizado la técnica del electrospray o ESI (“*ElectroSpray Ionization*”). El ESI es una técnica de ionización débil capaz de pasar las partículas de interés presentes en una disolución en estado líquido a partículas en fase gas. Junto con la técnica MALDI (“*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*”), la ESI es una de las técnicas más utilizadas en espectrometría de masas

convencionales para la ionización de partículas. Se trata de una técnica de ionización débil y que no produce fragmentación.

El espectrómetro de masa y rigidez basado en resonadores nanomecánicos desarrollado en este trabajo se ha utilizado para la caracterización de nanopartículas de oro de 100 nm de diámetro y de bacterias *Escherichia coli* mediante la medida de su masa y rigidez. El primer prototipo del espectrómetro estaba formado por dos campanas de vacío. La primera etapa se encontraba a presión atmosférica y era donde se nebulizaban las partículas por medio de la técnica del electrospray. Un orificio separaba la primera etapa de la segunda la cual se encontraba a una presión de 10 mbar y alojaba el sensor, es decir, la micropalanca. Este primer prototipo tenía una serie de desventajas que se han ido solventando a lo largo de este trabajo. El problema fundamental de este primer prototipo era que las partículas de interés llegaban al resonador sin estar completamente evaporado el solvente.

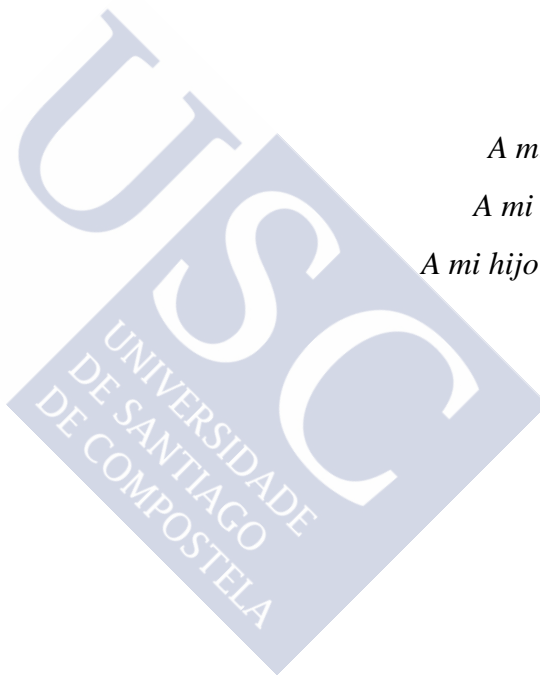
El prototipo final utilizado para la medida de la masa y rigidez de partículas consta de tres etapas claramente diferenciadas. La primera etapa está a presión atmosférica y es donde tiene lugar la nebulización de las partículas por medio de la técnica ESI. La segunda etapa se encuentra a 10 mbar y alberga un capilar caliente, es decir, un tubo metálico con un orificio interior de 400 – 500 μm y una longitud de 110 mm el cual se encuentra a una temperatura de $\sim 200^\circ\text{C}$. Su función es ayudar a la completa evaporación del solvente, evitar que las partículas se adhieran a las paredes gracias a la agitación térmica y ayudar al guiado de las partículas a la siguiente etapa de vacío diferencial mediante un gradiente de presión. La segunda y tercera etapa diferencial están separadas por un “skimmer” con un orificio de 100 μm . La última etapa está a una presión de 0.1 mbar y es donde se encuentra el sensor, es decir, la micropalanca. Para la medida de las frecuencias de resonancia se utiliza la técnica de la deflexión del haz. Como ya se ha explicado, un haz láser es enfocado en el extremo libre de la micropalanca y la luz reflejada se hace incidir sobre un fotodetector segmentado de cuatro cuadrantes. La micropalanca se excita en torno a sus frecuencias de resonancia mediante una cerámica piezoeléctrica situada debajo del resonador. La señal del fotodetector es pre-amplificada y enviada a un amplificador lock-in con PLL. El PLL nos permite seguir hasta 6

frecuencias de vibración simultáneamente en el tiempo con una buena estabilidad.

El principio físico de funcionamiento del espectrómetro nanomecánico se basa en la medida del cambio de las frecuencias de resonancia de la micropalanca cuando una partícula es adsorbida sobre su superficie, es decir, se utiliza el nanoresonador en modo dinámico. Cuando una partícula aterriza sobre la superficie de la micropalanca su frecuencia de resonancia cambia. Este cambio en la frecuencia de resonancia es debido a dos efectos contrapuestos. Por un lado, el efecto de masa hace que la frecuencia de resonancia disminuya, mientras que por otro lado el efecto de rigidez hace que la frecuencia aumente. Esta es la primera vez que se utiliza un microresonador como sensor de masa y rigidez en un espectrómetro en tiempo real para la medida de nanopartículas y entidades biológicas. En este trabajo se describe la teoría de la espectrometría nanomecánica y como la masa y rigidez de los adsorbatos afectan a la frecuencia de vibración de los microresonadores. Se introducen los efectos de borde, así como la forma y el ángulo de adsorción y como esto afecta de diferente forma a la rigidez del sistema. El estudio realizado nos permite obtener, con gran precisión, el cambio esperado en las frecuencias de resonancia en función de la posición de adsorción, de su masa y de su rigidez, así como de su forma y ángulo de adsorción. Sin embargo, lo que nos interesa es obtener las propiedades del adsorbato a partir de la medida de los cambios en frecuencia. Para ello se desarrolla el algoritmo del problema inverso, es decir, a partir de los cambios relativos en las frecuencias de resonancia de varios modos flexurales de vibración, se obtienen los tres parámetros de interés: la posición de adsorción, el término de masa y el término de rigidez. Finalmente se han realizado una serie de experimentos para corroborar la teoría de la espectrometría nanomecánica, así como el método del problema inverso. Para ello se ha utilizado el espectrómetro desarrollado a lo largo de este trabajo para la caracterización de nanopartículas de oro de 100 nm de diámetro, así como de bacterias *Escherichia coli* mediante la medida de su masa y rigidez. Uno de los resultados obtenidos de este estudio es que, si se desprecia la rigidez del adsorbato a la hora de utilizar los resonadores como sensores de masa, se subestima la masa del adsorbato, siendo este

efecto mayor cuando más delgados sean los microresonadores. Esto resalta la importancia de tener en cuenta la rigidez a la hora de utilizar los resonadores como sensores de masa. Esta es la primera vez que se obtiene el módulo de Young de bacterias intactas mediante espectrometría nanomecánica. Para corroborar el resultado obtenido se han caracterizado las bacterias mediante nanoindentación con AFM obteniendo magníficos resultados. La posibilidad de describir los analitos que aterrizan en el resonador por medio de dos coordenadas ortogonales, la masa y la rigidez, mejora, claramente, la selectividad de la espectrometría nanomecánica y abre las puertas a nuevas y relevantes aplicaciones en biomedicina.





*A mis padres,
A mi hermano,
A mi hijo y para ti,
Vanesa*



AGRADECIMIENTOS

Desde que empecé a elaborar este manuscrito me ha estado rondando por la cabeza como agradecer a todas las personas que, de una forma u otra, me han ayudado en estos cinco años. Por un lado, me apetece mucho escribir esta parte de la tesis, la cual es en la que más libertad me puedo tomar, pero por otro lado me entra el pánico por no saber hacerlo bien, o aún peor, por olvidarme de alguien. Bueno, espero que no sea así y estar a la altura. Empezaré por el principio.

Aún me acuerdo, como si fuese ayer, como el 22 de diciembre del 2011, después de 6 meses de prácticas en Eindhoven, llegué al Instituto de Microelectrónica de Madrid en Tres Cantos para una entrevista con Javier Tamayo. Recuerdo como me sentó en una silla en el laboratorio de Bionanomecánica (un sitio extraño y lleno de equipos raros), laboratorio que ahora considero mi casa, junto con Álvaro San Paulo y me empezaron a realizar preguntas, muchas de las cuales, con poco sentido, otras más personales y algunas de carácter profesional. Ese mismo día Javi me dijo que contaba conmigo en su grupo. Sin duda, uno de los días más felices en mi vida laboral. Recuerdo como le dije, “me ha tocado el gordo de navidad” y como al acabar la entrevista me fui con una sonrisa camino a pasar las navidades con mi familia en Vigo. Quiero empezar agradeciendo a Javi por haber confiado en mí. Gracias por haberme dado la oportunidad de empezar mi carrera científica en uno de los mejores (para mí el mejor) grupo de investigación del mundo. Tu simpatía, sabiduría, tu arte escribiendo y sobre todo tu locura y alma de niño han hecho que estos 5 años pasaran volando, de nuevo gracias.

Muchas gracias también a Montserrat Calleja. Gracias por haberme permitido realizar la entrevista. Sé que era contigo y llegué tarde, pero te aseguro que salí con mucho tiempo de Sol. Me engañaron en el cercanías. Gracias por confiar en mí para formar parte de este grupo. ¡Y aunque te empeñes no salimos en la misma orla de la facultad de física de la USC! Tu simpatía, tu sabiduría y tu disponibilidad para toda clase de dudas y problemas han sido de gran ayuda durante estos 5 años. Nunca tendré palabras suficientes para agradecer a Javi y Montse toda la confianza depositada en mí, muchas gracias. Gracias también a Alvaro por toda tu ayuda y esos nanohilos tan buenos, gracias.

Todo este viaje comenzó con un profesor del Máster de la USC, gracias Vicente Moreno de las Cuevas. Realizar el trabajo fin de máster contigo me ayudó a afianzar mi pasión por el mundo de la física experimental. Las horas que pasé en el laboratorio alineando un láser con fibras ópticas para implementar un sensor de desplazamientos despertaron en mi la pasión por lo experimental. Gracias por ser tan simpático y tan buen profesor. Gracias por esas pachangas con los compañeros del master. Todo esto ha comenzado gracias a ti, así que, de nuevo, muchas gracias.

Como no agradecer a uno de los grandes amigos que he hecho durante la realización de mi tesis. Su locura, su forma de publicar como si un hubiera un mañana, su manera de afrontar las noches de fiesta y su contagiosa energía en el laboratorio me han guiado durante mi primer año. Después se marchó a hacer su postdoc a Paris, pero ahora ha regresado para ayudarme (“martirizarme”) con las correcciones de mi tesis. Gracias Edu, eres un crack. Tú me enseñaste el laboratorio el día de la entrevista y mientras me invitabas a un café en el TVL entendí que quería trabajar aquí. Gracias por ser mi maestro, tanto en el laboratorio como en las fiestas. Espero seguir trabajando contigo durante muchos años.

Hablando de maestros, gracias Dani. Puede que seas una de las personas que conozco que más me han demostrado su infinito conocimiento de todo lo relacionado con la física. Tus simulaciones, discusiones teóricas y experimentales, así como tu disponibilidad, tanto para implementar sistemas como para temas más personales, han sido de gran ayuda. Estoy seguro que mi tesis nunca hubiera sido la misma sin ti, gracias por contagiarme tu amor por la ciencia.

Pedazo teórico. Así te resuelve la ecuación de nanohilos cónicos con funciones de Bessel de muchas especies, como te hace un algoritmo para describir perfectamente las partículas que caen sobre un resonador. Y todo sin protestar, siempre con una sonrisa y con su acento andalú. Muchas gracias Joselo por ser de tantísima ayuda. Algún día te veremos en la Ryder Cup, con tu gran drive, metiéndola dentro del Green (o como se diga). Gracias. Y hablando de teóricos y experimentales, ¡¡Pini!!, no veas como se te echa de menos en el laboratorio. Gracias Valerio por tu disponibilidad para todo, ya sea para ayudarme a montar un sistema experimental, para discutir sobre una fórmula teórica, para simular en

Comsol o para ayudarme con programas en Matlab. Yo también te he ayudado y enseñado como cambiar la fuente y el tipo de letra en PowerPoint (siempre fallando en lo básico). Gracias Valerio por toda tu ayuda y simpatía. Y ahora salsa, carnaval y.... sushi?, gracias Priscila Kosaka. Tu alma brasileña, llena de simpatía, bailoteos, música y siempre con una sonrisa, así como tu espíritu japonés han sido de una ayuda incalculable. Tus disoluciones, conocimientos en química y biología me han ayudado mucho. Muchas horas nos hemos pasado probando diferentes tipos de disoluciones para el electrospray, y siempre preparándolas en cualquier momento, a cualquier hora y bajo demanda. Con un equipo así es mucho más fácil hacer una tesis. Muchas gracias Pris. Hablando de disoluciones y de conocimientos de biología, Dra. Carmen Martínez Domínguez, GRACIAS. Los dos empezamos casi juntos nuestras tesis, y tú la has acabado antes, pero por poco...ya estoy ahí. Gracias por ayudarme con la química, biología y con las bacterias, esos bichitos que tan bien han aterrizado sobre sobre las palancas. Tú fuiste mi Carmen, y algo así como una novia de laboratorio, con todo lo bueno y lo malo de las relaciones. Gracias por ser como eres, gracias por tu ayuda y por tus clases de baile. Gracias por tu sonrisa.

Muchas gracias también a todo el equipo de Bionanomecánica que me ha acompañado durante este viaje tan emocionante, divertido y productivo. Empezando por Sheila que tanto me ayudó a adaptarme en mi nuevo puesto de trabajo y a Mercedes con sus soldaduras y diseños en CAD. Gracias también a Mario, “cazador de portales”, espero que todo te vaya muy bien en tu nueva aventura con el BigData. Gracias Ali, tanto la de día como la de noche. Aún recuerdo como me caí encima de ti en las fiestas de La Latina y no te reconocía, espero que sigas disfrutando como DJ y como científica y gracias también a Guillermo Mokry. También quiero dar las gracias a las nuevas incorporaciones. Y diréis: “Si somos nuevos, ¿qué nos tienes que agradecer?”, pues me recordáis a mí cuando empecé y con vosotros este grupo seguirá siendo el mejor, estoy seguro. Gracias Gopika, contigo he aprendido y mejoraré mi inglés, gracias Xavi, no te preocupes, me caes muy bien, aunque te empeñes en lo contrario. Bienvenido Alberto, seguro que los microcapilares empezarán pronto a darte alegrías y bienvenida Zofia (*de krakovia*) de Poznan, tu acento polaco-andaluz le ha dado un nuevo aire al laboratorio, seguro que los nanohilos de silicio te aportaran grandes descubrimientos. Gracias Marina por tu preocupación diaria sobre mi

estado anímico (jejeje), es un placer trabajar contigo y estoy seguro que aún nos quedan muchas cervezas juntos. Muchas gracias Sergio. Desde el día en que llegaste supe que haríamos muy buenas migas, siempre dispuesto a ayudar, tanto con un chiste, una canción o con un experimento. Tus tonterías me recuerdan a las mías, tenemos que plantearnos en serio ese canal de YouTube. Gracias por tu simpatía diaria. Gracias Ana, aunque siempre vienes al laboratorio a envenenarnos con el ozono, siempre lo haces con una sonrisa.

En cuanto a la gente del Instituto de Microelectrónica de Madrid comenzaré dando las gracias al maestro de recepción, siempre con una sonrisa, tan eficiente y servicial. Siempre dispuesto a ayudar. Muchas gracias Manuel, el IMM no sería lo mismo sin ti. Hablando de gente servicial, gracias Margarita, que sería del centro sin ti. Haciendo muchas veces el trabajo que no te corresponde, siempre ayudando a los estudiantes y becarios. Gracias por estar ahí para solucionar toda clase de problemas y para tomar un café cuando se necesita. Tu alma reivindicativa le da un toque diferente al centro, gracias. Gracias a todo el personal de mantenimiento, sobre todo gracias a Pulpón, espero que ahora estés mejor. Gracias también al personal administrativo, a la gerencia, a la dirección del centro y a los informáticos. Vuestra ayuda ha sido siempre muy útil.

Es difícil agradecer colectivamente a todos mis compañeros del IMM. Espero no alargarme mucho más, pero si sólo pongo gracias a todos, o gracias y vuestros nombres, siento que no os estoy correspondiendo como os merecéis y además me apetece un montón agradecerlos, uno a uno, a los que ahora considero ya mis amigos y una parte importante de mi vida. Empezaré por lo gallegos:

Gracias Marcos por hacerme sentir como en casa desde el primer día. Por organizar tantas y tan buenas fiestas y salidas, por estar ahí siempre que se te necesita, por tu humildad y tu generosidad infinita, ¡¡¡desprendes amor!!!, gracias Penedo, nos vemos por los bares. Gracias Elias, juntos hemos compartido, no solo un chalet en Tres Cantos, sino también momentos inolvidables y muy divertidos (¡¡Ala Celta!!), estoy seguro de que te volverás a enamorar. Gracias Ivan Prieto, compañero de mudanzas, compañero de piso, compañero de pachangas (lanzador de faltas a 200 km/h) y de fiestas. Siempre dispuesto a ayudar en todo sin pedir nada a cambio. Como se dice na terriña: home campechano.

Gracias también a Xesus de Arzúa por tantos y tan buenos momentos. Gracias gallegos.

Y ahora mi morena, gracias por coger los chistes tarde, por ser tan maña, por rechazarme tantas veces (yo te esperaré), por tu simpatía, por tu carácter y tu genio, por tantas y tantas fiestas y anécdotas que hemos compartido y por las que aún quedan por compartir. Empezamos la tesis a la vez y la vamos a terminar casi a la vez. Lo que nunca se va a terminar es nuestra amistad. Gracias Estela por formar parte de mi vida y por ayudarme siempre que lo he necesitado, ¡¡castañuelas!! ¿Quién ha dicho que las rubias son tontas? Siempre dispuesta a ayudar, a hacer una medida en el SEM, a cortar unos nanohilos con el FIB, a tomar una caña (o unas docenas), ella siempre está para todo (menos para Baiona). Esos ojos azules (que son verdes), esa amabilidad, simpatía, ese enfoque nocturno y esa samba de pucela hacen que te enamores de ella desde el primer momento. Aún recuerdo la primera noche de fiesta, cuando saltaste desde un escenario como una estrella del rock, pero sin comprobar previamente que no había nadie. Yo aún era un recién llegado y pensé: “esta chica tiene que ser de mis mejores amigas”. Muchas gracias Raquel, de verdad, me has ayudado mucho, tanto profesional como personalmente.

Desde el día en que nos presentaron y entré en el 105 supe que serías una parte importante de mi vida. Me da la sensación de que te conozco desde hace mucho más, como si formara parte de tu cuadrilla. Gracias Etor por ser como eres, eres un ejemplo a seguir. Tu simpatía, tu humor, tu cultura general (imposible ganarle en el Trivial), tu disponibilidad, en fin, aquí tienes un amigo para lo que necesites, eres como un hermano. Gracias Etor, te echamos de menos.

Gracias Fuster por estar tan loco. Por tener tantas y tan buenas historias. Gracias por tu ayuda y tu disponibilidad, es un placer compartir experiencias contigo. Tus ideas siempre me han ayudado.

Gracias Patricia, aunque tardé en ganarte, sé que ahora te caigo bien, gracias por tu ayuda y tus consejos, siempre con una sonrisa. Muchas gracias también a Carmen Robles, se te echa de menos, a ti, a tu “*tuerking*”, a la cecina de León y por su puesto a tu simpatía. Seguro que ahora te irá mucho mejor. Gracias Blanca, compañera de despacho. Ya sé que no lo parece, porque no lo he pisado, pero era el mismo. Como echo de menos también la flor del cerezo y el Valle del Jerte y, por su

puesto, a ti CrisVi. Al igual que con Patri, me costó caerte bien, y lo sé, no puedes mentirme. Pero ahora sé que tengo una amiga en el Jerte. Gracias por tu ayuda, por tu sonrisa, por esos findes viendo el cerezo en flor, solo hay una cosa más bonita: tus ojos. Gracias por todo. Gracias Lorena, por estar siempre ahí, por recordarme que no estoy solo en el mundo de los vagos mañaneros. Como mola dormir hasta la hora de comer. Gracias por tu simpatía y tu disponibilidad. Gracias por “enseñarme” a hacer “*Hadouken*” con el *scriber*, por esas imágenes de SEM y por mostrarme los secretos de la sala de litografía, ¡con lo que te gusta a ti el SU-8! Juntos hemos compartido alegrías y buenos chistes, gracias mañica.

Gracias también a Llorens, tu humor inteligente y tu simpatía contagiosa hicieron que esos cigarros en la terraza fuesen diferentes. A ver cuando te unes al club de los exfumadores. Gracias Piñera por tantos y tan buenos momentos. Gracias Benito por tu ayuda siempre que la he necesitado. Gracias por tu locura. Echo de menos las discusiones entre Fuster y tú. Tengo la sensación de que si hubiera llegado unos años antes tendríamos muchas más historias que contar.

Gracias también a todos los compañeros de fatigas y laboratorios, con los cuales no he compartido tantos buenos momentos como me hubiera gustado: gracias Begoña por tu sonrisa, tus rizos son un pasote. Gracias Marta, los pinchos de navidad con la guitarra siempre son más divertidos. Gracias también a Elena, Merce, Diana B, Diana M, Ripi, Marco, Horacio, Ryu, Miguel, Kamal y Olga. Gracias a Fran y Dani, con los que compartí mis primeros meses en el chalet de Tres Cantos (casa Chon). Vuestra compañía fue de mucha ayuda. Gracias también Jaime Andrés, Lili, Jero *GoodBody*, Andrés (¡qué manera de comer!), Lucasz, Pedro, Carolina (échale algo de carne, aunque sea un trocito de jamón a esos caldos tan paliduchos que traes) y Mónica. Agradecer también a todos los que han pasado de una manera fugaz por el instituto: Rubens y Roseli. Gracias también a Chemi, por tus discusiones futbolística y tu espíritu quinielista, en el fondo seguro que eres más celtista que madridista. Gracias también a Pedro por saber cómo bajarme los humos, deja de ponerme nervioso, por favor.

Gracias también a los nuevos, que venís pegando “duro”. Marina F. no te enfades tanto conmigo, espero que en Dinamarca todo te vaya muy bien. Gracias Sandra por estar siempre ahí y por tu simpatía, tus

taconeos dan ambiente a los pasillos. Muchas gracias Joaquín por toda tu ayuda, así es más fácil compaginar la vida laboral y la familiar. Espero que nunca te canses de traer esos postres tan ricos. Muchas gracias David por sacar unas imágenes tan buenas con el SEM y estar siempre disponible para hacer una inspección cuando se necesita, espero que tu doctorado vaya rodado. Espero no haberme olvidado de nadie.

Aunque estoy casi seguro de que nunca leeréis esto, gracias Waldo y Mar. Me habéis ayudado mucho en momentos muy difíciles y nunca os lo he agradecido lo suficiente. Gracias a todos mis amigos de Vigo, en especial a Dani. Y muchas gracias a mis amigos de Santiago: Alba, Chete, Turnes, David y Berni. Os echo mucho de menos. Muchas gracias también a Nuria (de tu biólogo marino, informático, matemático, químico, etc.), Joaquín y a las niñas por tan buenos momentos, y los que aún nos quedan.

Muchas gracias a mi familia. Está claro que esta tesis no existiría si no fuese por ellos. Gracias papá y mamá por dejaros la espalda trabajando en el bar los 365 días del año, prácticamente las 24h, para poder pagarme la carrera. Siento haber tardado tanto. Confiabais más vosotros en mí que yo mismo. Espero poder recompensaros. Gracias por esas empanadillas y bocadillos de Jamón Asado del Nueva Amistad que me han alimentado durante muchos años. Gracias por la educación que me habéis dado, estoy orgulloso de ser lo que soy y eso os lo debo a vosotros. Os quiero.

Gracias Fernando por ser como eres. Más que un hermano mayor has sido como otro padre. Me has educado y ayudado siempre que has podido. Ya sé que al principio fue difícil (o eso decís, yo era un bebé y no me acuerdo) pero ahora sé que sin ti yo no estaría donde estoy. Gracias por toda tu ayuda, por tu confianza y por estar siempre ahí. Gracias hermano. Muchas gracias Tere por ser mi cuñada. Gracias por darme un sobrinito (y ahijado) tan guapo y gracias por cuidar de mi hermano. Muchas gracias Xián por estar ahí con esa sonrisa y esos ojazos azules. Espero saber corresponderos a todos.

Gracias también a todos mis tíos y primos. En especial a Manu y Mari. Ya sabéis que sois como hermanos para nosotros. Gracias también a mis cuñados y cuñadas: José Luis y Lucia, Marta e Isma. Y gracias también a mi suegro Manolo por tener tres hijas como tres soles, aunque ya sabéis que yo me he llevado la mejor.

Y, por último, gracias a ti, Vanesa. Gracias por haber jugado a Krynea, a ese juego tan friki, y por haber hecho de mi estancia en Eindhoven mucho más llevadera. Cuando volví sentí que ya te conocía. Gracias por llevarme a ver esas vistas tan bonitas en Narón. Gracias por haber tenido paciencia y saber esperarme. Muchas gracias por haberte venido a vivir conmigo a Colmenar Viejo, gracias por tu valentía, gracias por el sí, espero estar a la altura. Y, por su puesto, muchas gracias por hacerme papá, gracias por Iker e Iker gracias por ser como eres. Que sepas que he aprendido yo mucho más de ti de lo que tu aprenderás de mí. Contigo he aprendido a tener paciencia y a ser más responsable. Espero ser un buen padre para ti. Las palabras no pueden describir lo que siento por vosotros, pero creo que ya sabéis lo agradecido que os estoy, y aunque no lo digo nunca ya sabéis lo mucho que os quiero.

De nuevo gracias a todos los que habéis participado, de una manera u otra, en esta tesis. Muchas gracias a todos, esto no hubiera sido posible sin vosotros.



GRACIAS

Índice

INTRODUCCIÓN	5
1. Contexto histórico y científico	5
2. Motivación y Objetivos	11
3. Estructura.....	15
<i>Referencias</i>	19
CAPÍTULO 1	23
1. Teoría de Resonadores	23
1.1. Teoría de la Elasticidad	23
1.1.1. El Tensor Deformación.....	24
1.1.2. El Tensor de Tensiones	27
1.1.3. Ley de Hooke.....	30
1.2. Ecuación de Euler-Bernoulli	31
1.2.1. Energía de Deformación y Ecuaciones de Equilibrio	32
1.2.2. Deflexión en Palancas.....	33
1.2.3. Euler-Bernoulli.....	35
1.2.4. Solución de la Ecuación de Euler-Bernoulli	38
1.3. Oscilador Armónico	43
<i>Referencias</i>	47
CAPÍTULO 2	49
2. Nanohilos de Silicio Como Sensores de Masa	49
2.1. Introducción	49
2.2. Nanohilos de Silicio	50
2.2.1. Fabricación de los Nanohilos de Silicio	50

2.2.2.	Ecuación de E-B para Nanohilos no Uniformes.....	52
2.2.3.	Simulación por Elementos Finitos.....	57
2.3.	Experimento y Resultados	59
2.3.1.	Sistema Experimental	59
2.3.2.	Resultados.....	61
2.3.3.	Sensibilidad y Mínima Masa Detectable	64
2.4.	Conclusiones	67
	<i>Referencias</i>	69
CAPÍTULO 3	73
3. Microcapilares Resonantes de Sílice	73
3.1.	Introducción.....	73
3.2.	Microcapilares de Sílice.....	74
3.2.1.	Ecuación de Euler-Bernoulli para Microcapilares.....	75
3.2.2.	Detección Óptica.....	78
3.3.	Experimentos y Resultados	79
3.3.1.	Sistema Experimental	80
3.3.2.	Resultados.....	81
3.3.3.	Responsividad	84
3.4.	Conclusiones	86
	<i>Referencias</i>	89
CAPÍTULO 4	93
4. Espectrómetro de Masa y Rigidez Nanomecánico:		
Sistema experimental	93
4.1.	Introducción.....	93
4.2.	Técnica de Ionización Mediante Electrospray	94
4.2.1.	Cono de Taylor.....	95
4.3.	Espectrómetro de Masa y Rigidez	99
4.3.1.	Etapas del ElectroSpray	104
4.3.2.	Etapas de Transferencia.....	105

4.3.3. Etapa de Detección	108
4.4. Conclusiones	110
<i>Referencias</i>	111
Capítulo 5	115
5. Espectrometría de Masa y Rigidez Nanomecánica de Nanopartículas y Bacterias	115
5.1. Introducción	115
5.2. Teoría de la Espectrometría Nanomecánica	116
5.2.1. Efectos de Borde y Ángulo de Adsorción.....	122
5.2.2. Desacoplo de la Masa, Rigidez y Posición de Adsorción. 127	
5.3. Espectrometría de Nano-Partículas de Oro.....	131
5.3.1. Verificación del Algoritmo del Problema Inverso.....	133
5.3.2. Espectrometría de <i>GNPs</i>	136
5.4. Espectrometría de Masa y Rigidez de Bacterias <i>E. coli</i>	144
5.4.1. Espectrometría de Bacterias.....	146
5.5. Conclusiones	156
<i>Referencias</i>	159
Apéndice A	163
A. Métodos de Transducción y Excitación Nanomecánica.	163
A.1. Métodos de Transducción	163
A.1.1. Métodos de Transducción Eléctrica.....	164
A.1.2. Métodos de Transducción Óptica.....	165
A.1.3. Técnica de Deflexión del Haz	168
A.2. Métodos de Excitación	170
A.2.1. Excitación Piezoeléctrica	170
<i>Referencias</i>	173

CONCLUSIONES GENERALES.....	177
LISTA DE PUBLICACIONES	179
PATENTES	181



INTRODUCCIÓN

1. Contexto histórico y científico

Este trabajo de tesis doctoral, desarrollado dentro del grupo de Bionanomecánica en el Instituto de Microelectrónica de Madrid perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IMM-CSIC), se encuentra enmarcado dentro del campo de la nanotecnología. La nanotecnología se define como la manipulación de la materia en la escala nanométrica ($1\text{ nm} = 10^{-9}\text{ m}$), donde al menos una de las dimensiones está entre 1 y 100 nm . Citando al premio Nobel de Física Richard Feynman en su famoso discurso en la “*American Physical Society*” que tuvo lugar el 29 de diciembre de 1959 en la universidad de Caltech (Instituto Tecnológico de California): “*There’s Plenty of Room*

*at the Bottom*¹, que se puede traducir como “Hay mucho espacio al fondo” dónde se sentaron las bases de lo que ahora se conoce como nanotecnología. En esta famosa conferencia, Feynman especuló con la posibilidad de controlar, fabricar y manipular objetos en la escala nanométrica. El estudio de las nuevas e interesantes propiedades físicas (ópticas, mecánicas, térmicas, eléctricas, ...) en la nanoescala han permitido la fabricación de nuevos dispositivos que han revolucionado todos los campos de la ciencia y, podemos decir, sin miedo a equivocarnos, que esto no ha hecho más que empezar.

El impacto de la nanotecnología será crucial en campos como la biología, la biotecnología y la medicina, entre otros. Los sistemas biológicos están gobernados por procesos que ocurren en el mundo nanométrico. La mayoría de las proteínas y partículas virales poseen dimensiones en el rango de las decenas de nanómetros. Por ejemplo, un virión de VIH (*Virus de la Inmunodeficiencia Humana*) se puede aproximar a una esfera con un diámetro de $\sim 100 \text{ nm}$, mientras que una partícula viral del Ébola, que tiene forma lineal, mide aproximadamente $\sim 1 \mu\text{m}$ de largo por 80 nm de diámetro. A su vez, en las células y bacterias los procesos que regulan su crecimiento y las interacciones intermoleculares tienen lugar en la nanoescala. Por ejemplo, los liposomas que conforman las paredes celulares tienen un espesor de decenas de nanómetros².

En el año 1982 Gerard Binnig y Heinrich Rohrer, de los laboratorios de IBM, inventan el microscopio de efecto túnel, STM⁴ (del inglés “*Scanning Tunneling Microscopy*”) lo cual supone una revolución en el campo de la nanotecnología y por lo cual reciben el Premio Nobel en 1986. Este invento tiene especial relevancia en la realización de este trabajo de tesis doctoral debido a que es la primera vez que se utiliza una micropalanca como elemento sensor. Un STM está formado por una micropalanca que posee una punta metálica en su extremo libre. Esta se posiciona muy cerca de una superficie conductora ($\sim \text{Å}$) y cuando se aplica un voltaje entre la punta metálica y la muestra se genera una corriente por efecto túnel entre ellas. El principio de funcionamiento se basa en mantener esta corriente constante ($\sim 1 \text{ nA}$) mientras se realiza un barrido a la muestra que queremos caracterizar. Como esta corriente depende de la distancia entre la punta y la muestra es necesario desplazarla verticalmente para mantener la corriente constante, lo que permite reconstruir la topografía de la muestra. Se puede ver, grosso

modo, como un fonógrafo en miniatura. Con esta técnica se ha logrado obtener una resolución atómica⁵, es decir, se ha conseguido la “visualización de los átomos” que conforman la materia. Sin embargo, una de las desventajas de la técnica del STM es que está limitada a muestras conductoras.

Solo cuatro años más tarde, la invención del microscopio de fuerzas atómicas⁶, AFM (del inglés “*Atomic Force Microscope*”) en 1986 por Binnig y Quate del “Edward L. Ginzton Laboratory” (Universidad de Stanford) y Gerber de IBM, marca otro importante hito en el avance imparable de la nanotecnología. De nuevo, una micropalanca con una punta afilada en su extremo libre conforma la base de este invento. Sin embargo, en este caso el principio de funcionamiento se basa en la medida de la deflexión de la micropalanca debido a las interacciones entre la punta y la muestra sin necesidad de aplicar un voltaje. Mientras que en el caso del STM lo que se mantiene constante es la corriente de efecto túnel, en el AFM es la deflexión de la palanca, pudiendo obtener la topografía de la superficie, sin la necesidad de que las muestras sean conductoras. A este principio de operación se le conoce como modo estático. Actualmente la mayoría de laboratorios alrededor del mundo poseen este instrumento tan potente y versátil, con la capacidad de adquirir imágenes de alta resolución de la topografía de diferentes tipos de sustratos.

La microscopía de fuerzas atómicas experimentó un avance significativo cuando en el año 1987, H. K. Wickramasinghe y colaboradores, de IBM, utilizaron la vibración de una micropalanca para explorar la topografía de la superficie³⁵. Este nuevo método de caracterización es conocido como modo dinámico. El principio de operación del modo dinámico es similar al del modo estático. Cuando una micropalanca es sometida a un campo de fuerzas, no solo se produce una deflexión, sino que también cambia su frecuencia de resonancia. Por lo tanto, para mantener la frecuencia de oscilación constante es necesario variar la posición vertical de la palanca con la muestra. Esta técnica aumenta la resolución espacial consiguiendo reconstruir la topografía de la muestra con resolución sub-nanométrica⁷. Además, debido a que las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra, como las fuerzas de van der Waals, interacciones dipolo-dipolo y fuerzas electroestáticas, son detectables antes de producirse el contacto, el AFM puede ser

utilizado en modo no-contacto⁸ y por lo tanto como un método de caracterización no invasivo.

Es en el año 1994 cuando el grupo de Welland y Gerber, de IBM, utilizan por primera vez una micropalanca como elemento sensor. La micropalanca estaba compuesta por dos materiales distintos y cuando se calentaba, debido a la diferencia del coeficiente de expansión térmico de los materiales, se producía su deflexión⁹. El sensor era capaz de detectar cambios de calor del orden de pJ (10^{-12} J) en modo estático. Un año más tarde, en 1995, el grupo de Thomas Thundat, del Oak Ridge National Laboratory (Tennessee), publica dos artículos en los cuales detectan vapor de agua¹⁰ y de mercurio¹¹ usando micropalancas en modo dinámico. Thundat detectó cambios en la frecuencia de resonancia de las micropalancas debido a la adsorción de masa sobre la superficie del resonador, siendo esta la primera vez en la que se utilizan las micropalancas como sensores de masa. En el año 1997 R. Berger y colaboradores, de IBM, publican un artículo en la revista *Science* donde utilizan micropalancas para medir *in situ* la tensión superficial inducida por la unión de alcanotioles¹². A partir de estas publicaciones aparecen números estudios sobre el uso de las micropalancas como sensores¹³, sentando las bases de lo que hoy se conoce como sensores basados en sistemas nanomecánicos, NEMS^{14,15} (del inglés “*NanoElectroMechanical Systems*”).

La aplicación de estos sensores nanomecánicos en la biología y medicina fue inminente. Solo seis años después de la aparición del primer artículo sobre el uso de resonadores nanomecánicos como sensores, aparece en el año 2000 una publicación en la revista *Science* del grupo de Ch. Gerber y J.K. Gimzewski, de IBM, en el que se detecta la hibridación de cadenas de ADN midiendo la deflexión de micropalancas debido a la diferencia de tensión superficial generada entre sus dos caras¹⁶.

En el año 2006 Daniel Ramos y Javier Tamayo, del grupo de Bionanomecánica del Instituto de Microelectrónica de Madrid (IMM-CSIC), publican un trabajo donde utilizan resonadores nanomecánicos tipo palanca en modo dinámico como sensores de masa y rigidez observando, por primera vez, como la adsorción de bacterias cerca del extremo libre de la palanca genera una disminución de la frecuencia de resonancia mientras que la adsorción cerca del extremo anclado provoca

un aumento de la frecuencia de resonancia¹⁷. Mientras que el cambio negativo en frecuencia es debido a la adsorción de una masa sobre el resonador, el cambio positivo en frecuencia se produce debido a un aumento en la rigidez del sistema. Unos años más tarde, en el 2010, Eduardo Gil-Santos y colaboradores del grupo de Bionanomecánica (IMM-CSIC) publican un trabajo en la revista *Nature Nanotechnology* donde consiguen mejorar la sensibilidad mediante el uso nanohilos de silicio como sensores de masa y rigidez nanomecánicos¹⁸. El experimento consistía en la medida de la deposición localizada de carbono crecido mediante un microscopio electrónico de barrido.

Un año antes, en el 2009, el grupo de Michael Lee Roukes del *California Institute of Technology, Caltech* (Pasadena, California) publican un artículo en la revista *Nature Nanotechnology* donde utilizan, por primera vez, un resonador nanomecánico como elemento sensor en un espectrómetro de masa¹⁹, midiendo cambios en la frecuencia de resonancia del primer modo flexural de vibración de una estructura tipo puente. En el año 2012 publican un nuevo artículo en la misma revista donde miden la masa de proteínas y nanopartículas de oro utilizando el mismo espectrómetro de masas nanomecánico en tiempo real²⁰, pero esta vez midiendo los dos primeros modos flexurales de oscilación, abriendo las puertas a nuevos dispositivos de espectrometría de masas basado en resonadores nanomecánicos.

Los avances en las técnicas de nanofabricación y en la industria de los semiconductores posibilitan la disminución del tamaño de los resonadores con un alto grado de calidad y reproducibilidad. Los nanoresonadores alcanzan altas frecuencias de resonancia y masas minúsculas, aumentando su resolución como sensores de masa hasta límites atómicos. En el año 2012 el grupo de A. Bachtold, del Instituto Catalán de Nanotecnología (ICN-CSIC), publica un artículo en la revista *Nature Nanotechnology* donde presenta un sensor nanomecánico²¹ con una resolución de yoctogramos (10^{-24} g), es decir, la masa de un protón. El resonador es un nanotubo de carbono con una longitud de ~ 150 nm el cual vibra a una frecuencia de ~ 2 GHz. Sin embargo, la disminución del tamaño de los resonadores para su utilización como sensores de masa y rigidez posee un gran inconveniente: su área de detección. Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar una relación de compromiso entre su tamaño y el área de detección.

A diferencia de un espectrómetro nanomecánico, un espectrómetro de masas convencional mide la relación carga/masa de especies moleculares cargadas con gran precisión. Utilizan campos eléctricos y magnéticos para guiar los iones hasta los detectores y, de esta manera, clasificar las diferentes especies. Sin embargo, están limitados a pequeños analitos, entre 100 *Da* hasta los 100 *kDa* y, por lo tanto, poseen un reducido rango dinámico^{22,23}. Para entidades de mayor tamaño se utilizan diversas técnicas de fragmentación, obteniendo un espectro complejo y difícil de interpretar y, por lo tanto, la necesidad de realizar laboriosos tratamientos de datos para poder reconstruir el analito inicial. El espectrómetro nanomecánico no necesita de la fragmentación ni ionización de las especies, ya que se basa en la medida directa y en tiempo real de los cambios en la frecuencia de resonancia del resonador a medida que las partículas son adsorbidas sobre su superficie. Los cambios en frecuencia producidos por un adsorbato son debidos a dos efectos contrapuestos: por un lado, el efecto de masa hace que la frecuencia disminuya y, por otro lado, el efecto de rigidez hace que la frecuencia aumente. Por lo tanto, la espectrometría nanomecánica³ se postula como un excelente candidato para medir no solo la masa, sino también la rigidez de compuestos biológicos macromoleculares complejos.



2. Motivación y Objetivos

Este trabajo de tesis doctoral está centrado en el estudio de los resonadores micro- y nanomecánicos para su utilización como elemento sensor en un espectrómetro de masa y rigidez nanomecánico. Para ello se realiza el estudio de diferentes tipos de resonadores, desde nanohilos de silicio hasta microcapilares resonantes de sílice fundido.

La medida de la rigidez en entidades biológicas tiene gran importancia en biología y medicina. Recientemente, se ha descubierto que la rigidez de las células es diferente dependiendo de si son células sanas, cancerígenas o metastásicas²⁴. Sucede lo mismo en virus y bacterias, en los cuales la rigidez tiene una importancia vital en sus ciclos biológicos naturales. Por ejemplo, el virus del VIH cambia drásticamente su rigidez cuando pasa de estado latente a un estado infeccioso²⁵. De ahí la importancia de desarrollar nuevos sensores biológicos que permitan medir, no solo la masa, sino también la rigidez de entidades biológicas.

El objetivo central de este trabajo de tesis doctoral ha sido el desarrollo de un espectrómetro de masa y rigidez basado en resonadores micro- y nanomecánicos. Este trabajo está inspirado en un artículo publicado en el año 2009 en la revista *Nature Nanotechnology* por el grupo de M. L. Roukes del *California Institute of Technology (Caltech)*, donde demostraron, por primera vez, el uso de resonadores nanomecánicos como elemento sensor en un espectrómetro de masa²⁰. En el espectrómetro desarrollado por este grupo se utiliza un resonador nanomecánico con una estructura tipo puente y, mediante la medida de cambios en la frecuencia de resonancia del primer modo flexural debido a la adsorción de partículas individuales, se estima el valor de la masa de los adsorbatos. Para la nebulización de las partículas de interés, desde presión atmosférica hasta el resonador situado en alto vacío, se utilizan dos técnicas de ionización diferentes: la técnica de electrospray, ESI (del inglés “*ElectroSpray Ionization*”) y la técnica MALDI (del inglés “*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*”). En un trabajo posterior del mismo grupo (2012), con el mismo sistema experimental, utilizaron la medida de los dos primeros modos flexural de vibración de un

resonador nanomecánico tipo puente, detectando, por primera vez, proteínas individuales. El espectrómetro desarrollado tenía una altura de 2 m y necesitaban de grandes bombas turbomoleculares para alcanzar un alto vacío en la campana de detección ($< 10^{-8}$ torr). Además, utilizaba hexapolos para el guiado de los iones hacia el resonador, así como la necesidad de criogenizar el elemento sensor con la finalidad de mejorar la adhesión de las partículas sobre su superficie e incrementar su sensibilidad, el cual se encontraba a una temperatura de 40K. Estas condiciones eran necesarias para conseguir medir partículas del orden de $\sim kDa$ con una alta resolución. Sin embargo, el espectrómetro no tenía en cuenta la rigidez del adsorbato y necesitaba de complejos equipos de laboratorio para su correcto funcionamiento. Para la medida y excitación de las frecuencias de resonancia utilizaba resonadores tipo puente con circuitos embebidos con tres terminales eléctricas, con lo cual era necesaria la utilización de conexiones eléctricas con el exterior, así como de avanzadas técnicas de nanofabricación. Debido a estos inconvenientes es de esperar que este tipo de equipos no lleguen a ser utilizado de manera práctica en clínicas y laboratorios.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un sistema más sencillo y compacto, que además pueda caracterizar las partículas no sólo por su masa, sino también por su rigidez. En este trabajo se ha desarrollado un espectrómetro de masa y rigidez con una altura total de 0.5 m, sin la necesidad de guías de iones, de sistemas de criogenizado ni conexiones eléctricas en el resonador, lo que abarata y simplifica la fabricación de los dispositivos. El sistema desarrollado utiliza un resonador tipo palanca localizado a un bajo vacío de 0.1 mbar y a temperatura ambiente. Para la medida de las frecuencias de resonancia se utiliza la técnica de deflexión del haz¹⁴. El espectrómetro ha demostrado ser capaz de medir la masa y rigidez de nanopartículas de oro individuales de 100 nm de diámetro, así como de bacterias *E. coli*. Para poder medir la rigidez de las partículas, además de su masa y su posición de adsorción, ha sido necesario seguir al menos tres modos de oscilación diferentes de manera simultánea.

Un objetivo secundario, pero no por ello menos importante, ha sido el estudio de resonadores unidimensionales como son los nanohilos de silicio, *SiNWs* (del inglés, “*Silicon NanoWires*”) cónicos, siguiendo

los trabajos del grupo de Bionanomecánica con *SiNWs* donde se ha demostrado la gran sensibilidad en masa y rigidez de estos resonadores^{18,26-28}. Los resonadores unidimensionales han sido propuestos como excelentes candidatos para ser utilizados como elementos sensores en un espectrómetro de masa y rigidez, gracias a su baja masa, altas frecuencias de resonancia y elevados factores de calidad. Sin embargo, su utilización se ve limitada por un factor importante: el área de detección.

Otro de los estudios realizados ha sido el trabajo desarrollado con microcapilares resonantes de sílice fundido para su utilización como sensores de masa y rigidez. Su fácil accesibilidad comercial y su bajo coste han motivado la investigación de estos microcapilares suspendidos para su uso como sensores biológicos. Como primer paso hacia la implementación de un espectrómetro se ha propuesto su utilización como sensor de densidad de líquidos en tiempo real y a presión atmosférica. En los últimos años han surgido diferentes publicaciones donde se utilizan resonadores huecos como sensores de masa²⁹⁻³¹. Estos resonadores tiene la ventaja de que por su interior puede fluir un líquido de interés con las partículas biológicas a detectar, por ejemplo, una solución de buffer con células. Como el líquido fluye por su interior, el resonador puede ser introducido en alto vacío, con lo cual su factor de calidad no se ve degradado^{32,33}, a diferencia de lo que ocurre cuando el resonador se encuentra en un líquido y, además, tampoco compromete la funcionalidad y propiedades del material biológico. Uno de los grupos más destacados en este campo es el de Scott R. Manalis del Massachusetts Institute of Technology (MIT), el cual publicó en 2007 un trabajo en la revista *Nature* donde demostraba el gran potencial de estos resonadores huecos³⁴. En este estudio se utilizaban resonadores tipo palanca introducidos en alto vacío y se hacía fluir las partículas de interés por unos microcanales embebidos en su interior. Siguiendo la frecuencia de resonancia del primer modo de oscilación se consiguió medir la masa de bacterias, nanopartículas de oro, micropartículas de poliestireno y también anticuerpos. Uno de los inconvenientes de estos dispositivos es la necesidad de utilizar técnicas complejas de nanofabricación. En este trabajo de tesis doctoral se ha propuesto el uso de los microcapilares resonantes de sílice fundido como una posible alternativa, barata y

sencilla de implementar, los cuales podrían utilizarse como sensores de masa y rigidez en un futuro.



3. Estructura

Este trabajo de tesis doctoral se encuentra dividido en 5 capítulos y un apéndice, comenzando con el desarrollo teórico de los resonadores nanomecánicos hasta la aplicación experimental de la teoría.

En el *capítulo 1* se recoge una introducción general a la teoría de los resonadores nanomecánicos. Se comienza con un resumen de la teoría de la elasticidad, describiendo tanto el tensor deformación como el tensor de tensiones de sistemas elásticos. A continuación, se introduce la ecuación de Euler-Bernoulli, la cual se utiliza para describir el movimiento flexural de los resonadores nanomecánicos utilizados en este trabajo. Además, se resuelve la parte temporal y espacial de la ecuación de Euler-Bernoulli, tanto para el caso de un resonador tipo palanca como para un resonador tipo puente. Finalmente se realiza una breve comparativa con el modelo del oscilador armónico. Las ecuaciones descritas en este capítulo serán utilizadas a lo largo de esta tesis doctoral.

En el *capítulo 2* se ha realizado un estudio sobre el impacto de la conicidad en nanohilos de silicio, para su aplicación como sensores de masa, mediante la medida de la frecuencia de resonancia de sus dos primeros modos flexurales de oscilación. Para ello, se ha desarrollado un sistema interferométrico para detectar las vibraciones subnanométricas de estos nanoresonadores unidimensionales. En este capítulo también se realiza una breve descripción del proceso de fabricación mediante técnicas de crecimiento conocidas como “*Bottom-up*”. Debido a su fabricación, los nanohilos pueden presentar un grado de conicidad, es decir, que el radio en el extremo anclado sea diferente del radio en el extremo libre. Esta conicidad hace que las frecuencias de resonancia y la forma de los modos de vibración difieran de nanohilos con sección uniforme. Esto hace que la sensibilidad en masa de los nanohilos cónicos mejore sustancialmente siendo, por lo tanto, un tipo de resonadores muy interesantes para su utilización como sensores.

En el *capítulo 3* se estudian los microcapilares de sílice fundidos como un tipo de resonadores huecos. Los microcapilares de sílice fundido se encuentran disponibles comercialmente con diferentes formas

y tamaños, siendo baratos, accesibles y fáciles de manipular. En este capítulo se implementa un sensor de densidad de líquidos en tiempo real. Para ello se desarrolla un sistema experimental que consiste en un haz láser enfocado en el capilar y en un fotodetector que recoge el haz transmitido. El microcapilar resonante se encuentra anclado por ambos extremos, es decir, en una configuración tipo puente. A su vez, se desarrolla la teoría para capilares y se realizan simulaciones por elementos finitos con la finalidad de localizar la zona de máxima transducción óptica de la vibración del resonador. Finalmente, se ha estudiado la responsividad del dispositivo, definida como la relación entre el cambio relativo de la frecuencia de resonancia y la variación en la densidad, mediante la realización de una serie de experimentos consistentes en la medida de la densidad de diferentes mezclas binarias de líquidos, consiguiendo detectar hasta un 0.5% de etanol en agua con una responsividad de 0.0314 mL/g .

En el *capítulo 4* se describe el sistema experimental que ha sido el pilar central de este trabajo de tesis doctoral: el espectrómetro de masa y rigidez nanomecánico. Se introducen los conceptos fundamentales de la técnica de ionización mediante electrospray, la cual ha sido utilizada para nebulizar partículas sobre un resonador nanomecánico. Se describe brevemente el primer prototipo de espectrómetro elaborado en el Instituto de Microelectrónica de Madrid, IMM-CSIC, y como ha ido evolucionando hasta el prototipo actual, el cual cuenta con tres partes claramente diferenciadas. La primera parte contiene la etapa del electrospray, que se encarga de la nebulización de las partículas de interés. La segunda parte se encarga de la transferencia de las partículas y consta de un capilar caliente, cuya función es la evaporación del solvente y el guiado de partículas a la tercera etapa la cual contiene el elemento sensor que, en nuestro caso, es un resonador nanomecánico.

En el *capítulo 5* se introduce la teoría de la espectrometría nanomecánica. Se realiza un estudio de cómo la masa y la rigidez de una partícula adsorbida sobre la superficie de un resonador nanomecánico cambian sus frecuencias de vibración. Mientras que la masa del adsorbato hace que la frecuencia de resonancia disminuya, la rigidez hace que la frecuencia aumente. En este capítulo también se estudia cómo influye la forma de adsorción de las partículas, así como los efectos

de borde, y de cómo estos efectos afectan la respuesta dinámica de nuestros sensores nanomecánicos. Asimismo, se desarrolla un algoritmo para calcular la masa, la rigidez y la posición de adsorción de partículas a partir de la medida del cambio relativo en la frecuencia de resonancia de varios modos de vibración medidos de manera simultánea y, a continuación, se valida el algoritmo con experimentos. Los experimentos se realizan con nanopartículas de oro de 100 nm de diámetro y bacterias *E. coli*, siendo esta la primera vez que se mide la masa y la rigidez simultáneamente de nanopartículas individuales y bacterias con resonadores nanomecánicos. Finalmente se calcula el módulo de Young de las bacterias *E. coli* y se compara el valor obtenido con medidas realizadas del módulo de Young mediante indentación con AFM obteniendo excelentes resultados.

En el *Apéndice A* se introducen brevemente los diferentes métodos de transducción y excitación nanomecánicos, describiendo, con mayor detalle, el método utilizado para la medida de las frecuencias de resonancia de los resonadores nanomecánicos utilizados en el espectrómetro.

Por último, se recogen las conclusiones generales de este trabajo de tesis doctoral.



REFERENCIAS

- 1 Feynman, R. P. There's plenty of room at the bottom. *Engineering and science* **23**, 22-36 (1960).
- 2 Whitesides, G. M. The 'right' size in nanobiotechnology. *Nat Biotech* **21**, 1161-1165 (2003).
- 3 Malvar, O. *et al.* Mass and stiffness spectrometry of nanoparticles and whole intact bacteria by multimode nanomechanical resonators. *Nature communications* **7**, 13452 (2016).
- 4 Binnig, G. & Rohrer, H. Scanning tunneling microscopy. *Surface Science* **126**, 236-244, doi:http://dx.doi.org/10.1016/0039-6028(83)90716-1 (1983).
- 5 Binnig, G., Rohrer, H., Salvan, F., Gerber, C. & Baro, A. Revisiting the 7×7 reconstruction of Si(111). *Surface Science* **157**, L373-L378, doi:http://dx.doi.org/10.1016/0039-6028(85)90666-1 (1985).
- 6 Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* **56**, 930-933 (1986).
- 7 Jalili, N. & Laxminarayana, K. A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. *Mechatronics* **14**, 907-945, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mechatronics.2004.04.005 (2004).
- 8 Morita, S., Giessibl, F. J., Meyer, E. & Wiesendanger, R. *Noncontact atomic force microscopy*. Vol. 3 (Springer, 2015).
- 9 Barnes, J. R., Stephenson, R. J., Welland, M. E., Gerber, C. & Gimzewski, J. K. Photothermal spectroscopy with femtojoule sensitivity using a micromechanical device. *Nature* **372**, 79-81 (1994).
- 10 Thundat, T., Chen, G. Y., Warmack, R. J., Allison, D. P. & Wachter, E. A. Vapor Detection Using Resonating Microcantilevers. *Analytical Chemistry* **67**, 519-521, doi:10.1021/ac00099a006 (1995).
- 11 Thundat, T., Wachter, E. A., Sharp, S. L. & Warmack, R. J. Detection of mercury vapor using resonating microcantilevers. *Applied Physics Letters* **66**, 1695-1697, doi:10.1063/1.113896 (1995).
- 12 Berger, R. *et al.* Surface Stress in the Self-Assembly of Alkanethiols on Gold. *Science* **276**, 2021-2024, doi:10.1126/science.276.5321.2021 (1997).
- 13 T. Thundat, P. I. O. & Warmack, R. J. MICROCANTILEVER SENSORS. *Microscale Thermophysical Engineering* **1**, 185-199, doi:10.1080/108939597200214 (1997).

- 14 Tamayo, J., Kosaka, P. M., Ruz, J. J., San Paulo, A. & Calleja, M. Biosensors based on nanomechanical systems. *Chemical Society Reviews* **42**, 1287-1311, doi:10.1039/C2CS35293A (2013).
- 15 Anja, B., Søren, D., Stephan Sylvest, K., Silvan, S. & Maria, T. Cantilever-like micromechanical sensors. *Reports on Progress in Physics* **74**, 036101 (2011).
- 16 Fritz, J. *et al.* Translating Biomolecular Recognition into Nanomechanics. *Science* **288**, 316-318, doi:10.1126/science.288.5464.316 (2000).
- 17 Ramos, D., Tamayo, J., Mertens, J., Calleja, M. & Zaballos, A. Origin of the response of nanomechanical resonators to bacteria adsorption. *Journal of Applied Physics* **100**, 106105, doi:10.1063/1.2370507 (2006).
- 18 Gil-Santos, E. *et al.* Nanomechanical mass sensing and stiffness spectrometry based on two-dimensional vibrations of resonant nanowires. *Nature nanotechnology* **5**, 641-645, doi:10.1038/nnano.2010.151 (2010).
- 19 Naik, A. K., Hanay, M. S., Hiebert, W. K., Feng, X. L. & Roukes, M. L. Towards single-molecule nanomechanical mass spectrometry. *Nature nanotechnology* **4**, 445-450, doi:10.1038/nnano.2009.152 (2009).
- 20 Hanay, M. S. *et al.* Single-protein nanomechanical mass spectrometry in real time. *Nature nanotechnology* **7**, 602-608, doi:10.1038/nnano.2012.119 (2012).
- 21 ChasteJ *et al.* A nanomechanical mass sensor with yoctogram resolution. *Nat Nano* **7**, 301-304, doi:http://www.nature.com/nnano/journal/v7/n5/abs/nnano.2012.42.html#supplementary-information (2012).
- 22 Angel, T. E. *et al.* Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions. *Chemical Society Reviews* **41**, 3912-3928, doi:10.1039/C2CS15331A (2012).
- 23 Aebersold, R. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198-207 (2003).
- 24 Calzado-Martín, A., Encinar, M., Tamayo, J., Calleja, M. & San Paulo, A. Effect of Actin Organization on the Stiffness of Living Breast Cancer Cells Revealed by Peak-Force Modulation Atomic Force Microscopy. *ACS Nano*, doi:10.1021/acsnano.5b07162 (2016).
- 25 Pang, H.-B. *et al.* Virion stiffness regulates immature HIV-1 entry. *Retrovirology* **10**, 4, doi:10.1186/1742-4690-10-4 (2013).

- 26 Malvar, O. *et al.* Tapered silicon nanowires for enhanced nanomechanical sensing. *Applied Physics Letters* **103**, 033101, doi:10.1063/1.4813819 (2013).
- 27 Ramos, D. *et al.* Silicon nanowires: where mechanics and optics meet at the nanoscale. *Scientific reports* **3**, 3445, doi:10.1038/srep03445 (2013).
- 28 Ramos, D. *et al.* Optomechanics with silicon nanowires by harnessing confined electromagnetic modes. *Nano letters* **12**, 932-937, doi:10.1021/nl204002u (2012).
- 29 Burg, T. P. & Manalis, S. R. Suspended microchannel resonators for biomolecular detection. *Applied Physics Letters* **83**, 2698, doi:10.1063/1.1611625 (2003).
- 30 Lee, D. *et al.* Pulled microcapillary tube resonators with electrical readout for mass sensing applications. *Scientific reports* **6**, 33799, doi:10.1038/srep33799
- 31 Khan, M. F. *et al.* Online measurement of mass density and viscosity of pL fluid samples with suspended microchannel resonator. *Sensors and Actuators B: Chemical* **185**, 456-461, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.04.095 (2013).
- 32 Yasumura, K. Y. *et al.* Quality factors in micron- and submicron-thick cantilevers. *Journal of Microelectromechanical Systems* **9**, 117-125, doi:10.1109/84.825786 (2000).
- 33 Eysden, C. A. V. & Sader, J. E. Resonant frequencies of a rectangular cantilever beam immersed in a fluid. *Journal of Applied Physics* **100**, 114916, doi:10.1063/1.2401053 (2006).
- 34 Burg, T. P. *et al.* Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature* **446**, 1066-1069, doi:http://www.nature.com/nature/journal/v446/n7139/supinfo/nature05741_S1.html (2007).
- 35 Wickramasinghe, H. K. *et al.* Atomic force microscope-force mapping and profiling on a sub 100-Å scale. *Journal of Applied Physics* **61**, 4723-4729, doi:10.1063/1.338807 (1987).



CAPÍTULO 1

1. Teoría de Resonadores

1.1. TEORÍA DE LA ELASTICIDAD

La teoría de la elasticidad es la parte de la física que estudia la mecánica de los sólidos considerándolos como medios continuos. Se dice que una deformación es elástica si el sólido recupera su forma inicial cuando dejan de actuar las fuerzas que causaron dicha deformación, es decir, se trata de una deformación reversible^{1,2}. Sus fundamentos fueron establecidos a principios del siglo XIX por Cauchy y Poisson. En esta sección se resume la teoría fundamental utilizada a lo largo de este trabajo de tesis doctoral. Para ello, primero se introduce el tensor deformación y el tensor de tensiones en sólidos y se relaciona la tensión y la deformación que sufre un sólido por medio de la ley de Hooke. En la siguiente sección, se describe y resuelve la ecuación de Euler-

Bernoulli. Por último, se modeliza el comportamiento de un resonador por medio del oscilador armónico.

1.1.1. EL TENSOR DEFORMACIÓN

Un sólido tiende a cambiar de forma y volumen bajo la acción de fuerzas externas. Para estudiar cómo se produce la deformación de un sólido, empezaremos definiendo la posición de un punto cualquiera de un sólido de manera analítica mediante un vector $\mathbf{r}(x_i)$ con componentes $x_i = x, y, z$.

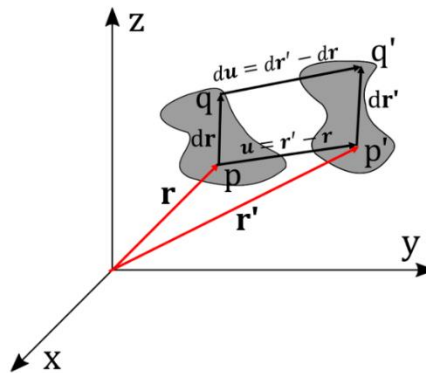


Figura. 1.1. Deformación general de un sólido sometido a fuerzas externas.

Cuando el sólido es deformado bajo la acción de una fuerza externa, cada punto del mismo se desplaza. Sea \mathbf{r} el vector posición de un punto p cualquiera del sólido antes de la deformación y \mathbf{r}' el vector posición del punto p' después de la deformación. El desplazamiento de este punto vendrá dado por un vector $\mathbf{u} = \mathbf{r}' - \mathbf{r}$ el cual se conoce como vector desplazamiento (Figura 1.1).

La distancia entre dos puntos infinitesimalmente próximos (p y q) vendrá dado por,

$$dr = \sqrt{dx^2 + dy^2 + dz^2} \quad (1.1)$$

y la distancia después de la deformación será,

$$dr' = \sqrt{dx'^2 + dy'^2 + dz'^2} \quad (1.2)$$

A no ser que se diga lo contrario se usará el convenio de Einstein de índices repetidos³ de tal forma que,

$$dr = \sqrt{dx_i^2}, \quad dr' = \sqrt{dx_i'^2} \quad \text{donde } i = 1, 2, 3 \quad (1.3)$$

Las coordenadas del punto después de la deformación (x'_i) serán función de las coordenadas del punto antes del desplazamiento (x_i). Por lo tanto, el vector desplazamiento \mathbf{u} se puede expresar en función de las coordenadas x_i , ya que $d\mathbf{r}' = d\mathbf{r} + d\mathbf{u}$. Finalmente, podemos escribir la ecuación 1.2 como,

$$dr' = \sqrt{(dx_i + du_i)(dx_i + du_i)} \quad (1.4)$$

Sustituyendo $du_i = \frac{\partial u_i}{\partial x_k} dx_k$ tenemos,

$$dr'^2 = dr^2 + 2 \frac{\partial u_i}{\partial x_k} dx_i dx_k + \frac{\partial u_i}{\partial x_k} \frac{\partial u_i}{\partial x_j} dx_k dx_j \quad (1.5)$$

Como el segundo término de la derecha se extiende sobre los subíndices i y k , se puede expresar,

$$\frac{\partial u_i}{\partial x_k} dx_i dx_k = \frac{\partial u_k}{\partial x_i} dx_i dx_k \quad (1.6)$$

Intercambiando en el tercer término los subíndices i y j , y teniendo en cuenta que se puede escribir el término $2 \frac{\partial u_k}{\partial x_i} dx_i dx_k$ en forma simétrica como $\left(\frac{\partial u_i}{\partial x_k} + \frac{\partial u_k}{\partial x_i}\right) dx_i dx_k$, se tiene que la distancia entre puntos después de la deformación viene dada por,

$$dr'^2 = dr^2 + 2\varepsilon_{ij} dx_i dx_j \quad (1.7)$$

Donde se define el tensor ε_{ij} como *tensor deformación*,

$$\varepsilon_{ij} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_k} + \frac{\partial u_k}{\partial x_i} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \frac{\partial u_j}{\partial x_k} \right) \quad (1.8)$$

Usando la notación $u_{i,j} = \frac{\partial u_i}{\partial x_j}$ podemos reescribir la ecuación 1.8 de forma más compacta de la siguiente manera,

$$\varepsilon_{ij} = \frac{1}{2}(u_{i,k} + u_{k,i} + u_{j,i}u_{j,k}) \quad (1.9)$$

Por definición se trata de un tensor simétrico, es decir,

$$\varepsilon_{ij} = \varepsilon_{ji} \quad (1.10)$$

y, por tanto, puede ser diagonalizado, lo que implica que podemos elegir, en cualquier punto del sólido, un sistema de ejes coordenados (ejes principales del tensor) de manera que solo las componentes diagonales del tensor sean distintas de cero, $\varepsilon_{11} \neq 0$, $\varepsilon_{22} \neq 0$, $\varepsilon_{33} \neq 0$, teniendo en cuenta que no todos los puntos del sólido tendrán los mismos ejes principales, es decir, que si el tensor está diagonalizado en un punto del cuerpo, en general no lo estará en otros puntos del mismo.

Cuando el tensor deformación ε_{ij} está diagonalizado en un punto del sólido tendremos que el elemento de longitud definido en la ecuación 1.7 vendrá dado por,

$$dr'^2 = (\delta_{ij} + 2\varepsilon_{ij})dx_i dx_j = (1 + 2\varepsilon_1)dx_1^2 + (1 + 2\varepsilon_2)dx_2^2 + (1 + 2\varepsilon_3)dx_3^2 \quad (1.11)$$

donde $\varepsilon_1, \varepsilon_2, \varepsilon_3$ son los valores principales del tensor deformación, es decir, las componentes diagonales. La ecuación 1.11 es la suma de tres términos independientes y, por tanto, la deformación de un elemento de volumen en el sólido se compone de las deformaciones a lo largo de los tres ejes ortogonales. Las longitudes dx_1, dx_2, dx_3 a lo largo de los correspondientes ejes principales se convierten en $dx'_1 = \sqrt{1 + 2\varepsilon_1}$, $dx'_2 = \sqrt{1 + 2\varepsilon_2}$ y $dx'_3 = \sqrt{1 + 2\varepsilon_3}$ respectivamente. Por lo tanto, el alargamiento relativo vendrá dado por $\frac{(dx'_i - dx_i)}{dx_i} = \sqrt{1 + 2\varepsilon_i} - 1$ a lo largo del eje principal i .

Vamos a considerar como primera aproximación que las deformaciones que sufre un sólido son pequeñas y, por tanto, las componentes del vector desplazamiento también lo serán. Esto nos permite despreciar los términos de segundo orden en el tensor deformación, es decir, para la elasticidad lineal tenemos que,

$$\varepsilon_{ij} = \frac{1}{2}(u_{i,k} + u_{k,i}) \quad (1.12)$$

Por lo tanto, el alargamiento relativo a lo largo de los ejes principales del tensor en un punto dado del sólido se puede aproximar a $\sqrt{1+2\varepsilon_i} - 1 \approx \varepsilon_i$, es decir, son los valores principales del tensor ε_{ij} . Desarrollando la ecuación 1.12 tenemos las componentes del tensor deformación en la teoría de la elasticidad lineal vienen dadas por,

$$\left\{ \begin{array}{l} \varepsilon_{xx} = \frac{\partial u}{\partial x} \quad \varepsilon_{yy} = \frac{\partial v}{\partial y} \quad \varepsilon_{zz} = \frac{\partial w}{\partial z} \\ \varepsilon_{xy} = \varepsilon_{yx} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial x} \right) \\ \varepsilon_{xz} = \varepsilon_{zx} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u}{\partial z} + \frac{\partial w}{\partial x} \right) \\ \varepsilon_{yz} = \varepsilon_{zy} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial v}{\partial z} + \frac{\partial w}{\partial y} \right) \end{array} \right. \quad (1.13)$$

1.1.2. EL TENSOR DE TENSIONES

Cuando un sólido se encuentra en equilibrio térmico con su entorno todas las partes del cuerpo se hallan en equilibrio mecánico y, por lo tanto, la resultante de la suma de las fuerzas, así como de los momentos que actúan sobre el mismo, es igual a cero. Sin embargo, cuando un sólido es sometido a una fuerza externa se produce la deformación. El sólido deja de encontrarse en equilibrio y como consecuencia aparecen unas fuerzas internas que tienden a llevarlo nuevamente a su posición de equilibrio. Estas fuerzas internas se conocen como *tensiones internas* y son debidas a fuerzas moleculares y por lo tanto de corto alcance.

Cuando se aplica una fuerza sobre el volumen, esta fuerza será la suma de todas las fuerzas que actúan sobre cada uno de los elementos del sólido. Por tanto, podemos definir \mathbf{F} como la fuerza por unidad de longitud. La fuerza total que se ejerce sobre el sólido puede escribirse como, $\int_V \mathbf{F} dV$. Teniendo en cuenta la tercera ley de Newton⁴, las fuerzas de los distintos elementos de volumen se anulan mutuamente en concordancia con la igualdad de la acción y la reacción. Para cualquier elemento del sólido, cada una de las tres componentes $\int_V F_i dV$ se puede expresar en una integral de superficie aplicando el teorema de Gauss⁵ o de la divergencia, donde \mathbf{F} será la divergencia de un tensor de segundo orden,

$$\mathbf{F} = \nabla \cdot \boldsymbol{\sigma} \quad (1.14)$$

es decir,

$$F_i = \frac{\partial \sigma_{ij}}{\partial x_j} \quad (1.15)$$

obteniendo que,

$$\int_V F_i dV = \int_V \frac{\partial \sigma_{ij}}{\partial x_j} dV = \oint \sigma_{ij} df_i \quad (1.16)$$

El tensor σ_{ij} se denomina *tensor de tensiones* y tiene en cuenta, como su propio nombre indica, la distribución de tensiones en el medio continuo. La figura 1.2 representa un elemento diferencial de volumen donde se muestran las tensiones normales y tangenciales en cada cara. Como se puede observar, el primer índice hace referencia a la componente normal de la cara y el segundo a la dirección del tensor, por ejemplo, σ_{yz} representa la tensión en la cara perpendicular a y en la dirección z , por tanto, las tensiones normales tienen el índice repetido.

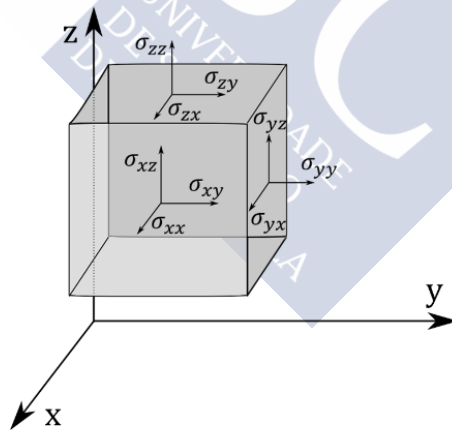


Figura 1.2. Elemento diferencial de volumen donde se representan las componentes del tensor de tensiones originados por la aplicación de una fuerza \mathbf{F} .

Desarrollando el tensor de tensiones tenemos que,

$$\sigma_{ij} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \quad (1.17)$$

El momento que actúa sobre una región del cuerpo viene dado por el producto vectorial, $\mathbf{M} = \mathbf{F} \times \mathbf{r}$, que podemos expresar haciendo uso del tensor de Levi-Civita como,

$$M_i = \epsilon_{ijk} \int_V F_j x_k dV \quad (1.18)$$

donde el tensor de Levi-Civita⁶ se define como,

$$\epsilon_{ijk} = \begin{cases} 1 & \text{si } (i, j, k) \text{ es } (1,2,3), (2,3,1) \text{ o } (3,1,2) \\ -1 & \text{si } (i, j, k) \text{ es } (3,2,1), (2,1,3) \text{ o } (1,3,2) \\ 0 & \text{en otros casos} \end{cases} \quad (1.19)$$

por lo tanto, el momento de fuerzas se puede expresar como,

$$M_{ij} = \int_V (F_i x_j - F_j x_i) dV \quad (1.20)$$

Sustituyendo en la ecuación 1.20 la ecuación 1.15, podemos reescribir el momento de fuerzas de la siguiente forma,

$$M_{ik} = \int_V \left(\frac{\partial \sigma_{il}}{\partial x_l} x_k - \frac{\partial \sigma_{kl}}{\partial x_l} x_i \right) dV = \int_V \frac{\partial (\sigma_{il} x_k - \sigma_{kl} x_i)}{\partial x_l} dV - \int_V \left(\sigma_{il} \frac{\partial x_k}{\partial x_l} - \sigma_{kl} \frac{\partial x_i}{\partial x_l} \right) dV \quad (1.21)$$

Donde podemos expresar $\frac{\partial x_k}{\partial x_l} = \delta_{kl}$, siendo δ_{kl} la delta de Kroneker, y por lo tanto $\delta_{kl} \sigma_{il} = \sigma_{ik}$ y $\delta_{il} \sigma_{kl} = \sigma_{ki}$. Haciendo uso del teorema de Gauss⁵, la integral de volumen puede ser expresada como una integral de superficie tal que,

$$M_{ik} = \int_S (\sigma_{jl} x_k - \sigma_{kl} x_i) dn_l - \int_V (\sigma_{jk} - \sigma_{kj}) dV \quad (1.22)$$

Para que M_{ik} pueda ser expresada como una integral de superficie debe cumplirse que el tensor de tensiones sea simétrico, es decir, $\sigma_{jk} = \sigma_{kj}$. Por lo tanto, podemos escribir el momento de fuerzas que actúan sobre una región del sólido como,

$$M_{ik} = \int_V (F_i x_k - F_k x_i) dV = \int_S (\sigma_{jl} x_k - \sigma_{kl} x_i) dn_l \quad (1.23)$$

$$M_i = \epsilon_{ijk} \int_S \sigma_{ij} x_k dn_l$$

1.1.3. LEY DE HOOKE

Una vez que se ha definido el tensor deformación y el tensor de tensiones, introduciendo así la teoría de la elasticidad lineal, el siguiente paso será relacionar la deformación que sufre un sólido con la tensión aplicada. Para ello se hará uso de la ley de Hooke⁷ para deformaciones pequeñas, la cual establece una deformación lineal entre la tensión y la deformación. Supongamos un alargamiento en la dirección x en el elemento diferencial de volumen (Figura 1.2) generado por una tensión σ_{xx} . Esta tensión producirá un estrechamiento en las direcciones perpendiculares tal que,

$$\epsilon_{xx} = \frac{1}{E} \sigma_{xx} \quad \epsilon_{yy} = -\frac{\nu}{E} \sigma_{xx} \quad \epsilon_{zz} = -\frac{\nu}{E} \sigma_{xx} \quad (1.24)$$

Las constantes E y ν se conocen como módulo de Young (definido por primera vez por Thomas Young en 1807) y coeficiente de Poisson (definido por Siméon Poisson 1830's) respectivamente y dependen del material. De la misma manera podemos encontrar las deformaciones producidas por las tensiones σ_{yy} y σ_{zz} obteniendo,

$$\begin{cases} \epsilon_{xx} = \frac{1}{E} (\sigma_{xx} - \nu(\sigma_{yy} + \sigma_{zz})) \\ \epsilon_{yy} = \frac{1}{E} (\sigma_{yy} - \nu(\sigma_{xx} + \sigma_{zz})) \\ \epsilon_{zz} = \frac{1}{E} (\sigma_{zz} - \nu(\sigma_{xx} + \sigma_{yy})) \end{cases} \quad (1.25)$$

Para obtener las componentes cruzadas haremos uso de las propiedades tensoriales de la tensión y de la deformación. Para ello aplicamos una rotación $\frac{\pi}{4}$ a un sistema de coordenadas (x, y) situándonos en un sistema (x', y') de tal manera que podemos escribir el tensor como $\sigma' = \begin{bmatrix} \sigma_{xy} & 0 \\ 0 & -\sigma_{xy} \end{bmatrix}$ y por lo tanto el tensor deformación en el sistema (x', y')

vendrá dado por $\varepsilon' = \begin{bmatrix} \frac{\sigma_{xy}(1+\nu)}{E} & 0 \\ 0 & -\frac{\sigma_{xy}(1+\nu)}{E} \end{bmatrix}$. Aplicando la rotación inversa para volver al sistema de referencia (x, y) obtenemos $\varepsilon' = \begin{bmatrix} 0 & \frac{\sigma_{xy}(1+\nu)}{E} \\ \frac{\sigma_{xy}(1+\nu)}{E} & 0 \end{bmatrix}$. El mismo proceso se puede aplicar a las componentes xz y yz y, por lo tanto, podemos escribir las componentes cruzadas como,

$$\begin{cases} \varepsilon_{xy} = \frac{1+\nu}{E} \sigma_{xy} \\ \varepsilon_{xz} = \frac{1+\nu}{E} \sigma_{xz} \\ \varepsilon_{yz} = \frac{1+\nu}{E} \sigma_{yz} \end{cases} \quad (1.26)$$

En forma tensorial,

$$\varepsilon_{ij} = \frac{1}{E} [(1+\nu)\sigma_{ij} - \nu\sigma_{kk}\delta_{ij}] \quad (1.27)$$

O recíprocamente,

$$\sigma_{ij} = \frac{E}{(1+\nu)} \left[\varepsilon_{ij} + \frac{\nu}{1-2\nu} \varepsilon_{kk}\delta_{ij} \right] \quad (1.28)$$

Las ecuaciones 1.27 y 1.28 son conocidas como ecuaciones constitutivas, las cuales constituyen la base de la teoría lineal de la elasticidad.

1.2. ECUACIÓN DE EULER-BERNOULLI

Una de las ecuaciones más utilizadas a la hora de modelizar la respuesta dinámica flexural de resonadores unidimensionales es la ecuación de Euler-Bernoulli⁸. Primero se describe la energía de deformación y las ecuaciones de equilibrio de resonadores unidimensionales. A continuación, se estudia la deflexión flexural pura de una estructura libre para llegar, finalmente, a la ecuación de Euler-Bernoulli.

1.2.1. ENERGÍA DE DEFORMACIÓN Y ECUACIONES DE EQUILIBRIO

El trabajo que realiza una fuerza para deformar un sólido se almacena en forma de energía potencial elástica. Volviendo a nuestro elemento diferencia de volumen (Figura 1.2) la tensión σ_{xx} genera una fuerza de valor $\sigma_{xx}dydz$ produciendo un alargamiento $\varepsilon_{xx}dx$. Como hemos visto, existe una relación lineal entre σ_{xx} y ε_{xx} y por tanto, el trabajo viene dado por $dW = \frac{1}{2}\sigma_{xx}\varepsilon_{xx}dV$. Es decir, la energía potencial elástica de deformación de un elemento de volumen se expresa como,

$$dU = \frac{1}{2}\sigma_{ij}\varepsilon_{ij}dV \quad (1.29)$$

La energía total es la suma del trabajo realizado por cada componente de la tensión por separado y, por lo tanto, la energía es conservativa. Es decir, estamos despreciando pérdidas de energía por disipación.

Para obtener las ecuaciones de equilibrio vamos a considerar una variación de la energía potencial elástica tal que,

$$\delta U = \frac{1}{2}\delta \int \sigma_{ij}\varepsilon_{ij}dV = \int \sigma_{ij}\delta\varepsilon_{ij}dV = 0 \quad (1.30)$$

que en función de los desplazamientos se puede escribir como,

$$\delta U = \int \sigma_{ij}\frac{\partial\delta u_i}{\partial x_j}dV = \int \frac{\partial}{\partial x_j}(\sigma_{ij}\delta u_i)dV - \int \frac{\partial\sigma_{ij}}{\partial x_j}\delta u_i dV \quad (1.31)$$

Al igual que en la ecuación 1.21 del momento hacemos uso del teorema de Gauss⁵,

$$\delta U = \int \sigma_{ij}\delta u_i dS_j - \int \frac{\partial\sigma_{ij}}{\partial x_j}\delta u_i dV \quad (1.32)$$

Pueden existir dos tipos de fuerzas actuando sobre el sistema: fuerzas volumétricas y fuerzas de superficie. El trabajo total vendrá dado por,

$$\delta W = \int \sigma_{ij}^{ext} \delta u_i dS_j + \int F_i \delta u_i dV \quad (1.33)$$

Igualando las ecuaciones 1.32 y 1.33 obtenemos,

$$\int (\sigma_{ij} - \sigma_{ij}^{ext}) \delta u_i dS_j - \int \left(\frac{\partial \sigma_{ij}}{\partial x_j} + F_i \right) \delta u_i dV \quad (1.34)$$

Donde F_i es la fuerza por unidad de volumen actuando en la dirección i . Mientras que la integral de superficie nos da las condiciones de contorno, la integral de volumen nos da las ecuaciones diferenciales de equilibrio:

$$\frac{\partial \sigma_{ij}}{\partial x_j} + F_i = 0 \quad (1.35)$$

Desarrollando obtenemos finalmente las ecuaciones diferenciales de equilibrio:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \sigma_{xx}}{\partial x} + \frac{\partial \sigma_{xy}}{\partial y} + \frac{\partial \sigma_{xz}}{\partial z} + F_x &= 0 \\ \frac{\partial \sigma_{yx}}{\partial x} + \frac{\partial \sigma_{yy}}{\partial y} + \frac{\partial \sigma_{yz}}{\partial z} + F_y &= 0 \\ \frac{\partial \sigma_{zx}}{\partial x} + \frac{\partial \sigma_{zy}}{\partial y} + \frac{\partial \sigma_{zz}}{\partial z} + F_z &= 0 \end{aligned} \quad (1.36)$$

1.2.2. DEFLEXIÓN EN PALANCAS

En este apartado se desarrolla la teoría que nos llevará a la ecuación de Euler-Bernoulli para estructuras tipo palancas y estructuras tipo puentes. Se denominan palancas a aquellas estructuras que tienen una dimensión característica mucho mayor que las otras dos y en las cuales uno de sus extremos está libre, mientras que las estructuras tipo puente tienen ambos extremos anclados. Cuando una estructura de este tipo sufre una deflexión, existirá una superficie de la misma en la cual la deformación será nula. Esta superficie se conoce como superficie neutra.

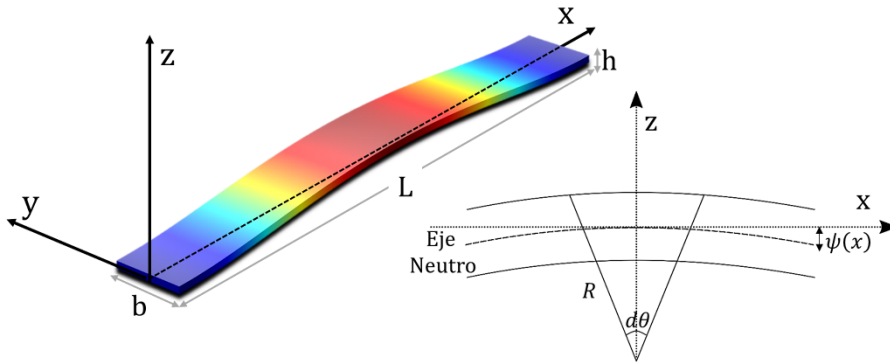


Figura 1.3. Deflexión de una estructura tipo puente de longitud L , anchura b y espesor h , así como una sección longitudinal de la estructura tipo puente, donde se puede apreciar el eje neutro.

En la figura 1.3 se representa una estructura tipo puente de longitud L , anchura b y espesor h , sufriendo una deflexión. Al tratarse de una estructura cuya longitud es mucho mayor que su anchura y considerando deflexiones flexurales puras, la coordenada transversal no juega ningún papel en el problema y, por tanto, la superficie neutra pasa a ser un eje neutro. En el caso de que el material sea isótropo y uniforme el eje neutro se encuentra en la mitad del espesor de la estructura. El desplazamiento en el plano que sufre este eje neutro es nulo, mientras que el desplazamiento fuera del plano (coordenada z) será el mismo para cualquier punto a lo largo del espesor y , por tanto, sólo dependerá de coordenada x , es decir:

$$u_x^0 = 0 \quad u_z = u_z^0 = \psi(x) \quad (1.37)$$

En condiciones de equilibrio la fuerza externa deberá compensarse con las fuerzas internas, es decir, $F_i d\mathbf{n} - \sigma_{ij} dn_j = 0$. Como las deflexiones son pequeñas tenemos que \mathbf{n} tendrá dirección z , y por tanto, a primer orden en z tenemos que: $\sigma_{xz} = 0$. Aplicando estas condiciones sobre las ecuaciones 1.12 y 1.28 tenemos,

$$u_{x,z} = -u_{z,x} \quad (1.38)$$

Y lo tanto,

$$u_x = -z \frac{\partial \psi(x)}{\partial x} \quad (1.39)$$

Obteniendo que la componente x de la deformación para pequeñas deformaciones se escribe como,

$$\varepsilon_{xx} = -z \frac{\partial^2 \psi(x)}{\partial x^2} \quad (1.40)$$

Por tanto, la componente x de la tensión viene dada por,

$$\sigma_{xx} = -zE \frac{\partial^2 \psi(x)}{\partial x^2} \quad (1.41)$$

1.2.3. EULER-BERNOULLI

A continuación, se obtiene la ecuación de Euler-Bernoulli a partir de las ecuaciones descritas en las secciones anteriores. Para ello realizaremos las siguientes aproximaciones:

- El material es isótropo, homogéneo y elástico.
- El sólido tendrá una dimensión característica mucho mayor que las otras dos.
- Se considera deflexión pura.
- Las deflexiones son mucho menores que su espesor y sin fuerzas de cizalla.

En condiciones de equilibrio, el momento total será igual al generado por las fuerzas internas, por lo tanto, usando las ecuaciones 1.23 y 1.41 podemos escribir,

$$M_y = - \iint z^2 E \frac{\partial^2 \psi(x)}{\partial x^2} dydz \quad (1.42)$$

ya que el resto de las componentes del momento son nulas. Si nos fijamos en la ecuación 1.42 vemos que el momento en la dirección y viene dado por el módulo de Young multiplicado por la segunda derivada del desplazamiento y por una integral de superficie la cual, por definición, es el segundo momento de área, $I_y = \iint z^2 dydz$, es decir:

$$M_y = -EI_y \frac{\partial^2 \psi(x)}{\partial x^2} \quad (1.43)$$

Considerando el equilibrio de fuerzas y momentos en una sección de la palanca, la fuerza total sobre la sección es,

$$\sum F = \frac{\partial F_z}{\partial x} dx \quad (1.44)$$

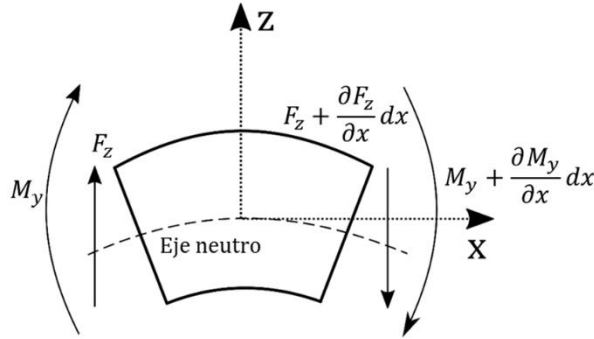


Figura 1.4. Esquema de los momentos y fuerzas que actúan sobre una sección de la palanca, donde se muestra el eje neutro.

En equilibrio, la suma de las fuerzas y momentos presentes en una sección de la palanca es igual a cero. Si nos fijamos en la figura 1.4 podemos escribir,

$$\sum M = M_y + F_z dx - \left(M_y + \frac{\partial M_y}{\partial x} dx \right) - \left(F_z + \frac{\partial F_z}{\partial x} dx \right) dx = 0 \quad (1.45)$$

Por lo tanto, se obtiene que la fuerza y el momento interno están relacionados de la siguiente manera:

$$F_z = -\frac{\partial M_y}{\partial x} \quad (1.46)$$

Aplicando la segunda ley de Newton⁴, la cual relaciona la suma de las fuerzas netas aplicadas sobre un cuerpo con la aceleración que adquiere por su masa, es decir, $\sum F = \rho S \frac{\partial^2 \psi(x,t)}{\partial t^2}$, donde ρ es la densidad del material y S el área, que para el caso de la palanca de la figura 1.3 viene dada por $S = bh$.

Usando las ecuaciones 1.43 y 1.46 llegamos finalmente a la ecuación de Euler-Bernoulli:

$$\rho S \frac{\partial^2 \Psi(x, t)}{\partial t^2} + \frac{\partial^2}{\partial x^2} \left(EI \frac{\partial^2 \Psi(x, t)}{\partial x^2} \right) = 0 \quad (1.47)$$

Las soluciones de la ecuación de Euler-Bernoulli depende de las condiciones de contorno y nos proporciona información acerca del comportamiento dinámico de estructuras que cumplan las condiciones numeradas al inicio de esta sección.

Otra manera de llegar a la ecuación de Euler-Bernoulli es mediante la lagrangiana del sistema. Supongamos una material con una densidad homogénea ρ . La energía cinética, T , por unidad de longitud vendrá dada por,

$$T = \frac{1}{2} \rho b h \left(\frac{\partial \Psi(x, t)}{\partial t} \right)^2 \quad (1.48)$$

y la energía potencial, U , por unidad de longitud,

$$U = \frac{1}{2} b D_b \left(\frac{\partial^2 \Psi(x, t)}{\partial x^2} \right)^2 \quad (1.49)$$

donde $D_b = \frac{1}{12} E h^3$ y se denomina *rigidez flexural* de la palanca. Recordemos que b es la anchura de la palanca mientras que h es el espesor.

Por tanto, la lagrangiana del sistema viene dada por,

$$\mathcal{L} = \frac{1}{2} \rho b h \left(\frac{\partial \Psi(x, t)}{\partial t} \right)^2 - \frac{1}{2} h D_b \left(\frac{\partial^2 \Psi(x, t)}{\partial x^2} \right)^2 \quad (1.50)$$

Aplicando las ecuaciones de Euler-Lagrange⁹ tenemos nuevamente la ecuación de Euler-Bernoulli, ya que el segundo momento de área para una palanca de anchura b y espesor h es, $I = \int_{-\frac{h}{2}}^{\frac{h}{2}} \int_{-\frac{b}{2}}^{\frac{b}{2}} z^2 dy dz = \frac{b}{12} h^3$.

1.2.4. SOLUCIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL DE LA ECUACIÓN DE EULER-BERNOULLI.

En este apartado se resuelve tanto la parte espacial como la parte temporal de la ecuación de Euler-Bernoulli. Para ello consideraremos que la sección a lo largo de la palanca es uniforme y por lo tanto podemos escribir la ecuación 1.47 como,

$$\rho S \frac{\partial^2 \Psi(x, t)}{\partial t^2} + EI \frac{\partial^4 \Psi(x, t)}{\partial x^4} = 0 \quad (1.51)$$

Para resolver la ecuación 1.51 aplicaremos el método de separación de variables cuya solución viene dada por,

$$\Psi(x, t) = \psi(x)e^{i\omega t} \quad (1.52)$$

Donde ω es la frecuencia angular de la estructura. Sustituyendo la ecuación 1.52 en la 1.51 tenemos,

$$\rho S \frac{\partial^2 \psi(x)e^{i\omega t}}{\partial t^2} = -EI \frac{\partial^4 \psi(x)e^{i\omega t}}{\partial x^4} \quad (1.53)$$

Es decir,

$$\rho S \psi(x) \frac{\partial^2 e^{i\omega t}}{\partial t^2} = -EI e^{i\omega t} \frac{\partial^4 \psi(x)}{\partial x^4} \quad (1.54)$$

Y por lo tanto podemos escribir,

$$\frac{-EI}{\rho S} \frac{\partial^4 \psi(x)}{\partial x^4} = \frac{\partial^2 e^{i\omega t}}{e^{i\omega t}} = -\omega^2 \quad (1.55)$$

Finalmente, tenemos la ecuación de la parte espacial viene dada por,

$$\frac{\partial^4 \psi(x)}{\partial x^4} - q^4 \psi(x) = 0 \quad (1.56)$$

Donde,

$$q^4 = \omega^2 \frac{\rho S}{EI} \quad (1.57)$$

La solución general para la ecuación 1.56 se puede escribir como,

$$\psi(x) = A_1 \sinh(qx) + A_2 \cosh(qx) + A_3 \sin(qx) + A_4 \cos(qx) \quad (1.58)$$

Las constantes A_1 , A_2 , A_3 y A_4 se determinan imponiendo las condiciones de contorno del problema.

Como caso particular se resolverá la ecuación 1.58 para una estructura tipo palanca, es decir, con un extremo fijo y otro libre, como el mostrado en la figura 1.5a, ya que será la estructura más utilizada a lo largo de esta tesis doctoral. También se mostrará el resultado para el caso de una estructura tipo puente, como el mostrado en la figura 1.5b, en la cual ambos extremos están anclados.

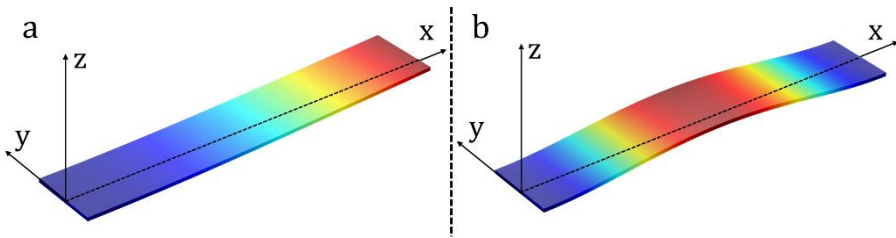


Figura 1.5. Forma de los modos flexurales fundamentales obtenidos mediante simulaciones por elementos finitos para: **a.** una estructura tipo palanca con un extremo fijo y el otro extremo libre y **b.** para una estructura tipo puente con ambos extremos fijos.

Las condiciones de contorno del problema para el caso de una palanca son que en el extremo fijo ($x = 0$) el desplazamiento y la pendiente son nulos, mientras que en el extremo libre ($x = L$) son nulas la curvatura y su derivada, es decir,

$$\left\{ \begin{array}{l} \psi(0) = 0 \\ \frac{\partial \psi(0)}{\partial x} = 0 \\ \frac{\partial^2 \psi(L)}{\partial x^2} = 0 \\ \frac{\partial^3 \psi(L)}{\partial x^3} = 0 \end{array} \right. \quad (1.59)$$

Aplicando la primera condición de contorno a la ecuación 1.58 se obtiene fácilmente que:

$$\psi(0) = A_2 + A_4 = 0 \rightarrow A_4 = -A_2 \quad (1.60)$$

Por lo tanto, la ecuación 1.58 queda de la forma,

$$\psi(x) = A_1 \sinh(qx) + A_2 [\cosh(qx) - \cos(qx)] + A_3 \sin(qx) \quad (1.61)$$

Aplicando ahora la segunda condición de contorno tenemos que,

$$\begin{aligned} \psi'(0) &= q[A_1 \cosh(0) + A_2 [\sinh(0) + \sin(0)] + A_3 \cos(0)] \\ &= q[A_1 + A_3] = 0 \rightarrow A_3 = -A_1 \end{aligned} \quad (1.62)$$

donde $\psi'(x) = \frac{\partial \psi(x)}{\partial x}$, es decir,

$$\psi(x) = A_1 [\sinh(qx) - \sin(qx)] + A_2 [\cosh(qx) - \cos(qx)] \quad (1.63)$$

Aplicando ahora la tercera condición de contorno,

$$\begin{aligned} \psi''(L) &= q^2 A_1 [\sinh(qL) + \sin(qL)] + A_2 [\cosh(qL) + \cos(qL)] = 0 \\ A_2 &= -A_1 \frac{\sinh(qL) + \sin(qL)}{\cosh(qL) + \cos(qL)} \end{aligned} \quad (1.64)$$

Por tanto, podemos escribir ecuación 1.63 como,

$$\begin{aligned} \psi(x) &= A_1 \left[\sinh(qx) - \sin(qx) \right. \\ &\quad \left. - \frac{\sinh(qL) + \sin(qL)}{\cosh(qL) + \cos(qL)} [\cosh(qx) - \cos(qx)] \right] \end{aligned} \quad (1.65)$$

Finalmente, aplicando la cuarta condición de contorno llegamos a la siguiente ecuación de auto-valores,

$$\cosh(q_n L) \cos(q_n L) = -1 \quad (1.66)$$

La ecuación de auto-valores no es resoluble analíticamente y se tiene que resolver numéricamente obteniendo para los primeros auto-valores $\beta_n = q_n L = 1.8751, 4.694, 7.8547, 10.9955, 14.137168, 17.2787, 20.4203, \dots$ como se puede comprobar de la figura 1.6.

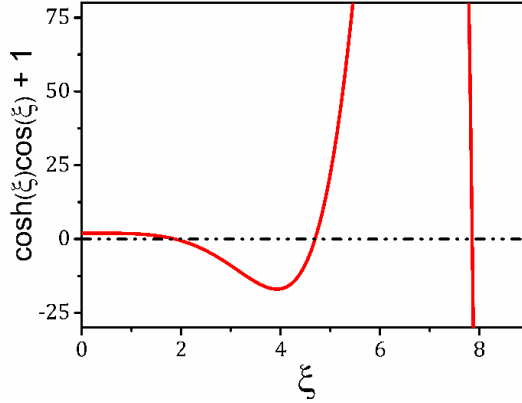


Figura 1.6. Solución gráfica de la ecuación de auto-valores para una estructura tipo palanca con un extremo fijo y otro libre. Los puntos de corte con el eje nos dan los auto-valores.

Por tanto, la ecuación 1.57 se convierte en una ecuación de auto-valores tal que la frecuencia angular natural de oscilación de la estructura viene dada por:

$$\omega_n^2 = \frac{\beta_n^4 EI}{L^4 \rho A} \quad (1.67)$$

Teniendo en cuenta que $f = \frac{\omega}{2\pi}$ se obtiene que la frecuencia de resonancia del modo n viene dada por,

$$f_n = \frac{\beta_n^2}{2\pi L^2} \sqrt{\frac{EI}{\rho A}} \quad (1.68)$$

mientras que para la parte espacial tenemos que,

$$\psi_n(x) = A_n \left[\sinh(q_n x) - \sin(q_n x) - \frac{\sinh(q_n L) + \sin(q_n L)}{\cosh(q_n L) + \cos(q_n L)} [\cosh(q_n x) - \cos(q_n x)] \right] \quad (1.69)$$

La ecuación 1.69, la cual describe la forma espacial de los modos de oscilación, se puede normalizar utilizando diferentes criterios. Uno de los criterios más utilizados es definir $\int_0^L \psi_n(x) \psi_m(x) dx = L \delta_{nm}$ siendo, de esta forma, los modos ortogonales entre sí. De esta manera los valores

A_n dependen del modo, siendo los primeros valores $A_1 = 0.7341$, $A_2 = 1.0284$, $A_3 = 1.000, \dots$ y $\psi_n(L) = -2(-1)^{n+1}$.

Una manera práctica y elegante de reescribir la ecuación 1.69 es definir el parámetro adimensional $\xi = \frac{x}{L}$, de tal manera que la posición está normalizada a la longitud de la palanca, y $\beta_n = q_n L$ de tal forma que,

$$\psi_n(\xi) = A_n \left[\sinh(\beta_n \xi) - \sin(\beta_n \xi) - \frac{\sinh(\beta_n) + \sin(\beta_n)}{\cosh(\beta_n) + \cos(\beta_n)} [\cosh(\beta_n \xi) - \cos(\beta_n \xi)] \right] \quad (1.70)$$

Otra forma de escribir la ecuación 1.70 es fijándose en que $A_n = \frac{\cos(\beta_n) + \cosh(\beta_n)}{\sin(\beta_n) + \sinh(\beta_n)}$ de tal manera que ahora $\psi_n(L) = -2(-1)^n$, y por lo tanto tenemos,

$$\psi_n(\xi) = \cosh(\beta_n \xi) - \cos(\beta_n \xi) - \frac{\cos(\beta_n) + \cosh(\beta_n)}{\sin(\beta_n) + \sinh(\beta_n)} [\sinh(\beta_n \xi) - \sin(\beta_n \xi)] \quad (1.71)$$

Procediendo de manera similar a la usada para el caso de la estructura tipo palanca, podemos obtener la solución para el caso de una estructura tipo puente. En este caso las condiciones de contorno vienen dadas por,

$$\left\{ \begin{array}{l} \psi(0) = 0 \\ \frac{\partial \psi(0)}{\partial x} = 0 \\ \psi(L) = 0 \\ \frac{\partial \psi(L)}{\partial x} = 0 \end{array} \right. \quad (1.72)$$

Lo cual nos lleva a la siguiente ecuación de auto-valores,

$$\cosh(q_n L) \cos(q_n L) = 1 \quad (1.73)$$

Los cuatro primeros auto-valores para el este caso son $\beta_n = q_n L = 4.7300$, 7.8532 , 10.9956 y 14.1372 . Para el caso de una estructura tipo

puente, la forma de los modos es simétrica con respecto a su centro y viene dada por la siguiente ecuación,

$$\psi_n(\xi) = \cosh(\beta_n \xi) - \cos(\beta_n \xi) + \frac{\cos(\beta_n) - \cosh(\beta_n)}{\sin(\beta_n) - \sinh(\beta_n)} [\sin(\beta_n \xi) - \sinh(\beta_n \xi)] \quad (1.74)$$

donde se ha utilizado la misma normalización que para el caso de la estructura tipo palanca.

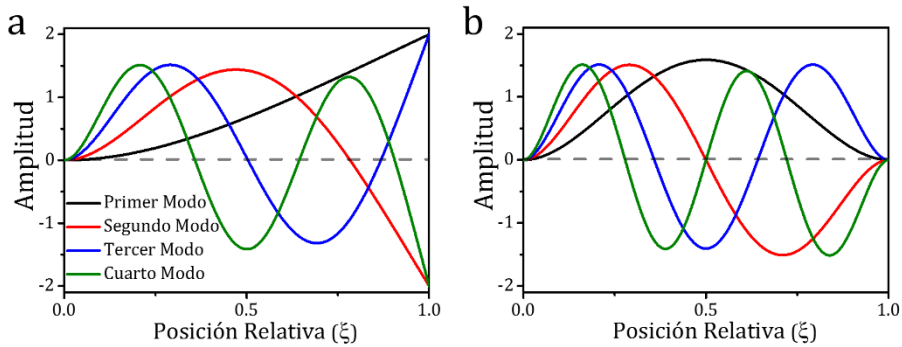


Figura 1.7. Forma de los cuatro primeros modos flexurales de vibración para: **a.** una estructura tipo palanca y **b.** para una estructura tipo puente. La posición está normalizada a la longitud del resonador.

La figura 1.7 muestra la forma de los cuatro primeros modos flexural de vibración para una estructura tipo palanca con un extremo libre y otro fijo (figura 1.7a) y para una estructura tipo puente con ambos extremos fijos (figura 1.7b). La posición está normalizada a la longitud del resonador.

La forma de los modos y las frecuencias obtenidas mediante la teoría de Euler-Bernoulli serán utilizadas a lo largo de esta tesis doctoral. Los resonadores utilizados cumplen los requisitos descritos al inicio de esta sección.

1.3. OSCILADOR ARMÓNICO

En esta sección se introduce el modelo del oscilador armónico, el cual nos servirá para estudiar el comportamiento dinámico de los resonadores. En el caso más simple, no existe disipación de la energía y

un oscilador armónico se puede modelizar mediante una masa puntual m y un muelle con constante elástica k como se muestra en la figura 1.8.

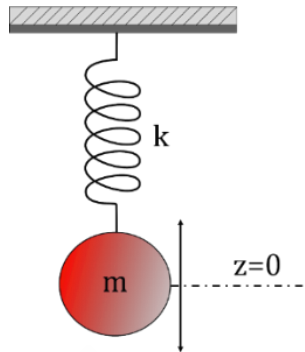


Figura 1.8. Modelo del oscilador armónico simple con una masa puntual m y un muelle ideal con constante elástica k .

La lagrangiana de este sistema viene dado por,

$$\mathcal{L} = \frac{1}{2} m \left(\frac{\partial z}{\partial t} \right)^2 - \frac{1}{2} k z^2 \quad (1.75)$$

Obteniéndose la ecuación del movimiento,

$$m \frac{\partial^2 z}{\partial t^2} = -kz \quad (1.76)$$

Y la frecuencia angular de resonancia del oscilador es,

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (1.77)$$

En la práctica, el movimiento de oscilación está sujeto a unas fuerzas de disipación^{10,11} que se oponen al movimiento de manera proporcional a la derivada temporal del desplazamiento. Para el caso de los resonadores utilizados a lo largo de esta tesis doctoral, los efectos disipativos son múltiples y aditivos¹². Estos pueden ser clasificados, dependiendo de su origen, en intrínsecos y extrínsecos. Los intrínsecos son debidos al propio material o defectos estructurales como, por ejemplo, pérdidas en la superficie y amortiguamiento termoelástico^{13,14}. Mientras que los efectos disipativos extrínsecos están relacionados con el acoplamiento del resonador al medio que los rodea, ya sea debido a su

anclaje a un sustrato¹⁵ o a las interacciones hidrodinámicas con el medio circundante. Por ejemplo, no es lo mismo tener el resonador en vacío, en aire o en líquido^{16,17} ya que la respuesta dinámica del resonador se verá alterada, no solamente debido a la disipación con el medio, sino también a efectos dispersivos que aumentan la masa efectiva del resonador debido al desplazamiento del medio. Estos efectos producen que la respuesta dinámica del resonador cambie añadiendo nuevos términos a la ecuación 1.76,

$$(m + m') \frac{\partial^2 z}{\partial t^2} + \gamma \frac{\partial z}{\partial t} + kz = 0 \quad (1.78)$$

Donde m' es la masa añadida por el fluido y γ es el término disipativo, incluyendo tantos los efectos intrínsecos como extrínsecos. En la mayoría de los casos los resonadores se encuentran en vacío y por lo tanto $m' = 0$.

En este punto ya estamos en condiciones de definir el factor de calidad, Q , como la relación que existe entre la energía almacenada y la energía disipada por ciclo de oscilación. La energía almacenada es igual al valor máximo de la energía cinética, mientras que la energía disipada viene dada por el término disipativo. Estas energías se pueden calcular para un periodo determinado obteniéndose, finalmente, que el factor de calidad viene dado por,

$$Q = \frac{m\omega_0}{\gamma} \quad (1.79)$$

Un alto Q indica una baja disipación de energía y viceversa. Si el resonador se encuentra sometido a una fuerza externa armónica la ecuación 1.76 se reescribe de la siguiente manera,

$$m \frac{\partial^2 z}{\partial t^2} + \gamma \frac{\partial z}{\partial t} + kz = F_0 e^{i\omega t} \quad (1.80)$$

La amplitud de oscilación en el espacio de Fourier¹⁸ viene dada por,

$$A(\omega) = \frac{F_0/m}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \left(\frac{\omega_0\omega}{Q}\right)^2}} \quad (1.81)$$

En la figura 1.9 se muestran diferentes respuestas dinámicas de oscilación variando el factor de calidad del resonador, es decir, se representa la amplitud normalizada de oscilación del resonador $A(f)$, frente a la frecuencia de oscilación f . Donde simplemente se ha cambiado la frecuencia angular ω por $f = \frac{\omega}{2\pi}$.

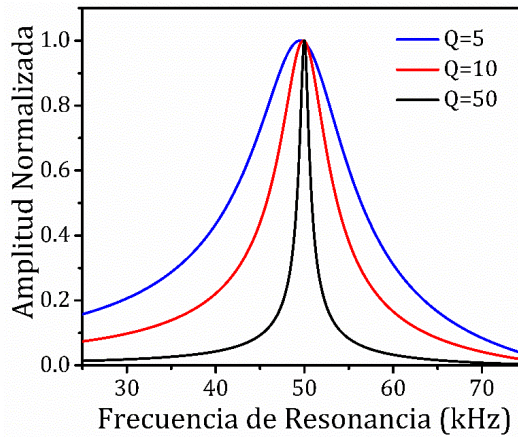


Figura 1.9. Respuesta en frecuencia de resonancia obtenida utilizando la ecuación 1.81, fijando la frecuencia de resonancia a 50 kHz y variando el factor de calidad ($Q = 5, 10$ y 50).

Como se puede ver en la figura 1.9, la respuesta en frecuencia no es del todo simétrica. Esto es debido al ruido¹⁹ $1/f$ intrínseco a la ecuación 1.81. El factor de calidad también se puede calcular a partir de la relación entre la frecuencia y la altura a media anchura²⁰, FWHM (del inglés “*Full Width at Half Maximum*”) como,

$$Q = \sqrt{3} \frac{\omega_0}{FWHM} \quad (1.82)$$

La ecuación 1.81 será utilizada a lo largo de este trabajo de tesis doctoral para ajustar las resonancias experimentales y obtener los valores del factor de calidad y las frecuencias de oscilación.

REFERENCIAS

- 1 Landau, L. D. & Lifshitz, E. M. *Teoría de la elasticidad*. Vol. 7 (Reverté, 1969).
- 2 Timoshenko, S. P. & Goodyear, J. Elasticity theory. *GTTI (State Technical and Theoretical Literature)* (1975).
- 3 Einstein, A. The foundation of the generalised theory of relativity. *On a Heuristic Point of View about the Creation and Conversion of Light* 1 *On the Electrodynamics of Moving Bodies* 10 *The Development of Our Views on the Composition and Essence of Radiation* 11 *The Field Equations of Gravitation* 19 *The Foundation of the Generalised Theory of Relativity* **22**, 22 (1916).
- 4 Newton, I. (Univ of California Press, 1999).
- 5 Gauss, C. F. in *Werke* 119-193 (Springer, 1877).
- 6 Levi-Civita, T. *The absolute differential calculus (calculus of tensors)*. (Courier Corporation, 1926).
- 7 Hooke, R. (Micrographia, 1961).
- 8 Timoshenko, S. P. & Woinowsky-Krieger, S. *Theory of plates and shells*. (McGraw-hill, 1959).
- 9 Lagrange, J. L. *Mécanique analytique*. Vol. 1 (Mallet-Bachelier, 1853).
- 10 Imboden, M. & Mohanty, P. Dissipation in nanoelectromechanical systems. *Physics Reports* **534**, 89-146, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.physrep.2013.09.003 (2014).
- 11 Schmid, S., Jensen, K. D., Nielsen, K. H. & Boisen, A. Damping mechanisms in high-Q micro and nanomechanical string resonators. *Physical Review B* **84**, 165307 (2011).
- 12 Yasumura, K. Y. *et al.* Quality factors in micron- and submicron-thick cantilevers. *Journal of Microelectromechanical Systems* **9**, 117-125, doi:10.1109/84.825786 (2000).
- 13 Chandorkar, S. A. *et al.* Multimode thermoelastic dissipation. *Journal of Applied Physics* **105**, 043505, doi:doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.3072682 (2009).
- 14 Yu, Y. J., Tian, X.-G. & Liu, J. Size-dependent damping of a nanobeam using nonlocal thermoelasticity: extension of Zener, Lifshitz, and Roukes' damping model. *Acta Mechanica*, 1-16, doi:10.1007/s00707-016-1769-0 (2016).

- 15 Hosaka, H., Itao, K. & Kuroda, S. Damping characteristics of beam-shaped micro-oscillators. *Sensors and Actuators A: Physical* **49**, 87-95, doi:http://dx.doi.org/10.1016/0924-4247(95)01003-J (1995).
- 16 Sader, J. E. Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope. *Journal of Applied Physics* **84**, 64-76, doi:doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.368002 (1998).
- 17 Basak, S., Raman, A. & Garimella, S. V. Hydrodynamic loading of microcantilevers vibrating in viscous fluids. *Journal of Applied Physics* **99**, -, doi:doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.2202232 (2006).
- 18 Bracewell, R. The fourier transform and iis applications. *New York* **5** (1965).
- 19 Sansa, M. *et al.* Frequency fluctuations in silicon nanoresonators. *Nat Nano* **11**, 552-558, doi:10.1038/nnano.2016.19. <http://www.nature.com/nnano/journal/v11/n6/abs/nnano.2016.19.html#supplementary-information> (2016).
- 20 Tamayo, J. Study of the noise of micromechanical oscillators under quality factor enhancement via driving force control. *Journal of Applied Physics* **97**, 044903, doi:doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.1847729 (2005).



CAPÍTULO 2

2. Nanohilos de Silicio Como Sensores de Masa

2.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describirá el efecto que tiene sobre las propiedades dinámicas de resonadores nanomecánicos basados en nanohilos de silicio (*SiNWs*) la disminución de su sección transversal. Para la implementación de un espectrómetro de masa y rigidez es necesario estudiar qué resonadores se comportan mejor como sensores. Entre los múltiples candidatos, los *SiNWs* tienen la ventaja de poseer una baja masa y alta frecuencia de resonancia.

Se empezará introduciendo los *SiNWs*, así como una breve descripción sobre su fabricación. Seguidamente se detallará cómo se debe modificar la ecuación de Euler-Bernoulli para tener en cuenta el grado de conicidad que presentan estos resonadores, comparando los

resultados con simulaciones por elementos finitos. A continuación, se explicará el sistema experimental utilizado para la medida de las frecuencias de resonancia de estos resonadores unidimensionales nanomecánicos. Finalmente, se realizará un estudio de la sensibilidad de masa, así como de la mínima masa detectable con estos nanohilos de silicio y como el grado de conicidad mejora la sensibilidad con respecto a los nanohilos uniformes.

2.2. NANOHILOS DE SILICIO

Recientemente, los nanoresonadores unidimensionales, como los nanohilos de silicio¹⁻³ o de otros materiales^{4,5}, o los nanotubos de carbono⁶⁻⁸, se han convertido en dispositivos utilizados en diversas aplicaciones, desde sensores biológicos¹⁰ hasta componentes electrónicos¹³, entre otros. Gracias a su baja masa, altas frecuencias de resonancia y altos factores de calidad son excelentes candidatos para ser utilizados como sensores de masa⁹⁻¹² y rigidez¹ en un sistema de espectrometría nanomecánica. Entre otras aplicaciones, los nanohilos de silicio también son utilizados como transistores¹³⁻¹⁵, células solares¹⁶, materiales termoelectricos¹⁷⁻¹⁹, así como para el estudio de fenómenos cuánticos²⁰⁻²³.

2.2.1. FABRICACIÓN DE LOS NANOHILOS DE SILICIO

Los *SiNWs* utilizados en este trabajo de tesis doctoral han sido fabricados en el Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM, CSIC) en el grupo del doctor Álvaro San Paulo^{24,25}. La figura 2.1 resume los pasos seguidos para su fabricación.

Primero se crece térmicamente una capa de óxido de silicio de 160 nm sobre una oblea de silicio sobre aislante, SOI (del inglés “*Silicon On Insulator*”). A continuación, mediante litografía óptica y ataque iónico reactivo, RIE (del inglés “*Reactive Ion Etching*”) se fabrican unas microtrincheras con las paredes orientadas en la dirección cristalográfica $\langle 111 \rangle$ de las cuales crecerán los *SiNWs*.

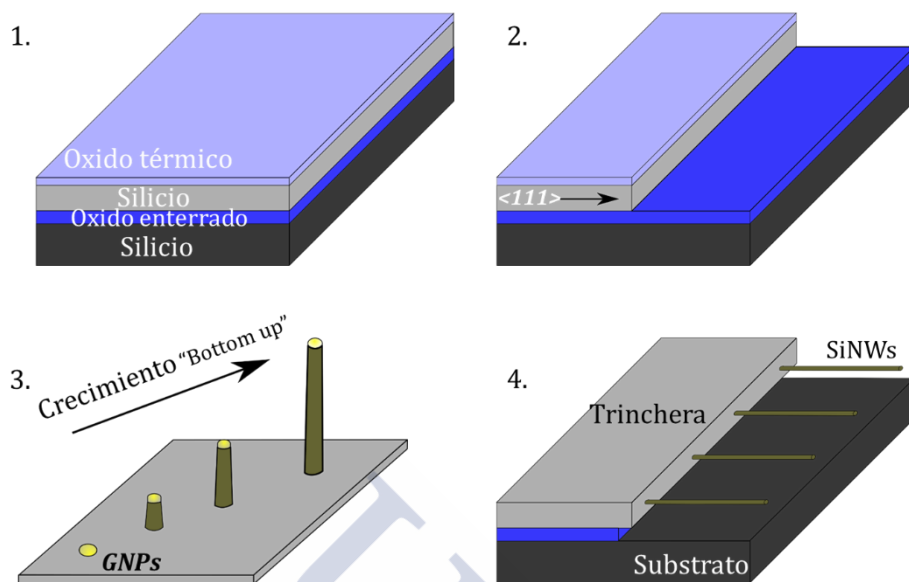


Figura 2.1. Descripción del proceso de fabricación de los nanohilos de silicio cónicos. **1.** Crecimiento de óxido térmico sobre una oblea de SOI. **2.** Fabricación de las trincheras mediante litografía y RIE. **3.** Proceso de crecimiento mediante VLS de los *SiNWs*. **4.** Dispositivo final donde se puede apreciar la trinchera, el substrato y los *SiNWs*.

Para ello, se introduce la muestra con las microtrincheras prefabricadas en una disolución de nanopartículas de oro, *GNPs* (del inglés, “*Gold Nano-Particles*”) con un diámetro de entre 80 – 150 nm. Esta dispersión en el diámetro nos proporcionará diferentes tamaños de nanohilos. Las técnicas de fabricación más utilizadas para obtener estructuras en la nanoescala se pueden clasificar en: las técnicas “*top-down*”, donde se parte de un material y se le da forma, y las técnicas “*bottom-up*”, donde las nanoestructuras crecen mediante procesos químicos. Los resonadores utilizados en este trabajo se han crecido mediante una técnica “*bottom-up*”^{27,28} conocida como VLS²⁶ (del inglés “*Vapor-Liquid-Solid*”). Los *SiNWs* crecen a presión atmosférica en un reactor a 800 °C con el 10% de H₂/Ar como gas de dilución y de arrastre. Se utilizan flujos de 270 y 45 s.c.c.m (cm³/min). Para mantener la presión de vapor constante se utiliza SiCl₄ en fase líquido burbujeante a 0°C. Finalmente, la capa de óxido es atacada mediante un ataque húmedo de HF. La distancia entre los *SiNWs* y el sustrato es controlable a partir del tiempo de ataque. Además, el grado de conicidad también puede ser controlado mediante un ajuste apropiado de la ratio molar de SiCl₄/H₂.

Por lo tanto, mediante un buen control de las condiciones de crecimiento se pueden conseguir *SiNWs* extremadamente largos y uniformes o con un grado de conicidad controlado.

2.2.2. ECUACIÓN DE EULER-BERNOULLI PARA NANOHILOS CON SECCIÓN NO UNIFORME

Como vimos en el *capítulo 1* la ecuación que describe el comportamiento espacial y temporal de resonadores que tienen una dimensión característica mucho mayor que las otras es la ecuación de Euler-Bernoulli. Como en este caso tenemos dispositivos en los cuales la sección no es uniforme, es decir, el radio del nanohilo depende de x , tenemos que reescribir la ecuación 1.45 de la siguiente manera²⁹,

$$-\rho\omega_n^2 S(\xi)\psi_n(\xi) + \frac{\partial^2}{\partial \xi^2} \left(\frac{EI(\xi)}{L^4} \frac{\partial^2 \psi_n(\xi)}{\partial \xi^2} \right) = 0 \quad (2.1)$$

Donde se ha normalizado la coordenada x a la longitud del nanohilo de tal manera que $\xi = x/L$ y se ha separado la parte temporal de la espacial, tal y como se ha visto en el *capítulo 1*, obteniendo finalmente $\Psi_n(\xi, t) = \psi_n(\xi)e^{i\omega_n t}$. La sección, así como el segundo momento de área, ahora dependen de la coordenada longitudinal adimensional, ξ .

Para un cilindro uniforme la sección y el segundo momento de área vienen dados por,

$$\begin{aligned} S_{cil} &= \pi R^2 \\ I_{cil} &= \frac{\pi}{4} R^4 \end{aligned} \quad (2.2)$$

Si consideramos que el radio del nanohilo varía de manera lineal con la longitud podemos escribir el radio del *SiNW* como,

$$R(\xi) = R_0(1 - \alpha\xi) \quad (2.3)$$

Donde R_0 es el radio en la base del nanohilo (en el anclaje). Definimos $\alpha = \frac{R_0 - R_f}{R_0}$ como el *grado de conicidad* del nanohilo, de tal manera que $R(0) = R_0$ y $R(1) = R_f$, siendo R_f el radio en el extremo libre.

Para obtener una solución analítica de la ecuación de Euler-Bernoulli se proponen los siguientes cambios de variables³⁰:

$$\begin{aligned} S(\xi) &= S_0(1 - \alpha\xi)^m \\ I(\xi) &= I_0(1 - \alpha\xi)^{m+2} \end{aligned} \quad (2.4)$$

Usando la ecuación 2.4 en la ecuación 2.1 y teniendo en cuenta que para el caso de los *SiNWs* cónicos $m = 2$, tenemos que,

$$-(1 - \alpha\xi)^2 \psi_n(\xi) \beta_0^4 + \frac{\partial^2}{\partial \xi^2} \left((1 - \alpha\xi)^4 \frac{\partial^2 \psi_n(\xi)}{\partial \xi^2} \right) = 0 \quad (2.5)$$

desarrollando,

$$\beta_n^4 \psi_n(\xi) + 12\alpha^2 \frac{\partial^2 \psi_n(\xi)}{\partial \xi^2} + (1 - \alpha\xi) \left(-8\alpha \frac{\partial^3 \psi_n(\xi)}{\partial \xi^3} + (1 - \alpha\xi) \frac{\partial^4 \psi_n(\xi)}{\partial \xi^4} \right) = 0 \quad (2.6)$$

Donde $\beta_n^4 = \omega_n^2 \frac{\rho S_0 L^4}{EI_0}$. Por lo tanto, la frecuencia de resonancia viene dada por,

$$f_n = \frac{\beta_n^2}{2\pi L^2} \sqrt{\frac{EI_0}{\rho S_0}} \quad (2.7)$$

La frecuencia de resonancia tiene la misma forma que para el caso de un nanohilo con sección uniforme, lo que varía son los autovalores β_n que se obtienen a partir de imponer las condiciones de contorno a la ecuación espacial.

La solución de la parte espacial dada por la ecuación 2.6 se puede expresar como una combinación de funciones de Bessel³¹ de la siguiente manera,

$$\psi_n(\xi) = \frac{4}{\alpha^2 \zeta^2} [A_n K_2(\beta_n \zeta) + B_n J_2(\beta_n \zeta) + C_n Y_2(\beta_n \zeta) + D_n I_2(\beta_n \zeta)] \quad (2.8)$$

Donde K_2 es la función de Bessel modificada de segunda especie y segundo orden, J_2 es la función de Bessel de primera especie y segundo orden, Y_2 es la función de Bessel modificada de segunda especie y segundo orden y I_2 es la función de Bessel modificada de primera especie y segundo orden, y donde:

$$\zeta = \frac{2(1 - \alpha\xi)^{1/2}}{\alpha} \quad (2.9)$$

Las constantes A_n , B_n , C_n y D_n se obtienen a partir de imponer las condiciones de contorno del problema. Como se trata de *SiNWs* en los que tenemos un extremo anclado y el otro libre las condiciones de contorno son las mismas que las descritas en la ecuación 1.59. Aplicando estas condiciones a la ecuación 2.8 se obtiene el siguiente sistema de ecuaciones²⁹:

$$\begin{aligned} & A_n K_2 \left(\frac{2\beta_n}{\alpha} \right) + B_n J_2 \left(\frac{2\beta_n}{\alpha} \right) + C_n Y_2 \left(\frac{2\beta_n}{\alpha} \right) + D_n I_2 \left(\frac{2\beta_n}{\alpha} \right) = 0 \\ & -A_n K_3 \left(\frac{2\beta_n}{\alpha} \right) + B_n J_3 \left(\frac{2\beta_n}{\alpha} \right) - C_n Y_3 \left(\frac{2\beta_n}{\alpha} \right) - D_n I_3 \left(\frac{2\beta_n}{\alpha} \right) = 0 \\ & A_n \left(\sqrt{1 - \alpha} (\beta_n^2 \alpha_1 + 24) K_0(\beta_n \alpha_1) + \frac{4\alpha (\beta_n^2 \alpha_1 + 6) K_1(\beta_n \alpha_2)}{\beta_n} \right) \\ & + B_n \left(\sqrt{1 - \alpha} (\beta_n^2 \alpha_1 - 24) J_0(\beta_n \alpha_2) + \frac{4\alpha (\beta_n^2 \alpha_1 - 6) J_1(\beta_n \alpha_2)}{\beta_n} \right) \\ & + C_n \left(\sqrt{1 - \alpha} (\beta_n^2 \alpha_1 - 24) Y_0(\beta_n \alpha_2) - \frac{4\alpha (\beta_n^2 \alpha_1 - 6) Y_1(\beta_n \alpha_2)}{\beta_n} \right) \\ & + D_n \left(\sqrt{1 - \alpha} (\beta_n^2 \alpha_1 + 24) I_0(\beta_n \alpha_2) + \frac{4\alpha (\beta_n^2 \alpha_1 + 6) Y_1(\beta_n \alpha_2)}{\beta_n} \right) = 0 \\ & A_n ((\beta_n \alpha_1 (\beta_n^2 \alpha_1 + 72) + 384) K_1(\beta_n \alpha_2) + 12\beta_n \alpha_2 (\beta_n^2 \alpha_1 + 16) K_0(\beta_n \alpha_2)) \\ & + B_n (12\beta_n \alpha_2 (\beta_n^2 \alpha_1 - 16) J_0(\beta_n \alpha_2) - (\beta_n^2 \alpha_1 (\beta_n^2 \alpha_1 - 72) + 384) J_1(\beta_n \alpha_2)) \\ & + C_n ((\beta_n \alpha_1 (\beta_n^2 \alpha_1 - 72) + 384) Y_1(\beta_n \alpha_2) + 12\beta_n \alpha_2 (\beta_n^2 \alpha_1 - 16) K_0(\beta_n \alpha_2)) \\ & + B_n (12\beta_n \alpha_2 (\beta_n^2 \alpha_1 + 16) I_0(\beta_n \alpha_2) - (-\beta_n^2 \alpha_1 (\beta_n^2 \alpha_1 + 72) - 384) I_1(\beta_n \alpha_2)) \\ & = 0 \end{aligned} \quad (2.10)$$

Donde,

$$\begin{cases} \alpha_1 = \frac{4(1 - \alpha)}{\alpha^2} \\ \alpha_2 = \frac{2\sqrt{1 - \alpha}}{\alpha} \end{cases} \quad (2.11)$$

El sistema de ecuaciones dado por 2.10 es homogéneo y por lo tanto para obtener una solución no trivial el determinante de la matriz debe ser cero. A partir de este determinante se obtiene la ecuación de

auto-valores. El sistema de ecuaciones se resuelve mediante el software de cálculo matemático *Wolfram MathematicaTM*. Cada β_n obtenido resolviendo la ecuación de auto-valores depende del parámetro α , es decir, la frecuencia de oscilación, así como la forma del modo dependerá, lógicamente, del grado de conicidad del *SiNW*.

La dependencia de β_n con el grado de conicidad α no tiene solución analítica conocida y debe ser resuelta numéricamente. La figura 2.2 muestra la dependencia de los dos primeros modos de vibración. Mediante un ajuste polinómico se obtiene una dependencia aproximada para $\beta_1(\alpha)$ y $\beta_2(\alpha)$.

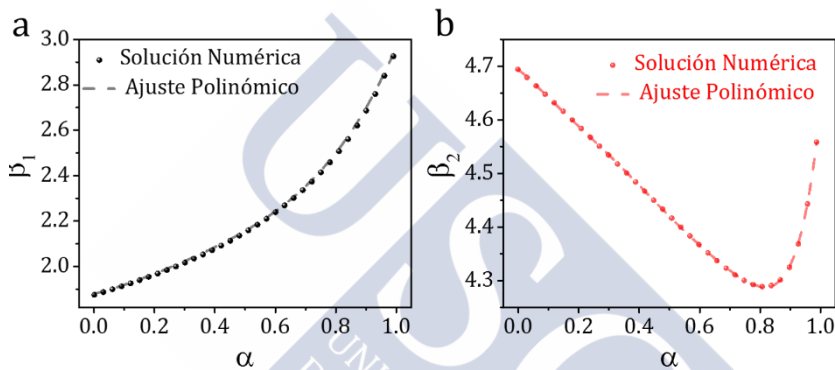


Figura 2.2. Solución numérica (puntos) y ajuste polinómico (línea discontinua) para: **a.** los auto-valores del primer modo, $\beta_1(\alpha)$ y **b.** del segundo modo, $\beta_2(\alpha)$ en función de la conicidad, α .

Los dos polinomios obtenidos en el ajuste mostrado en la figura 2.2 viene dados por²⁹,

$$\begin{cases} \beta_1(\alpha) = 1.150\alpha^4 - 1.115\alpha^3 + 0.697\alpha^2 + 0.336\alpha + 1.875 \\ \beta_2(\alpha) = 21.337\alpha^7 - 59.437\alpha^6 + 66.091\alpha^5 - 36.654\alpha^4 \\ \quad + 10.501\alpha^3 - 1.512\alpha^2 - 0.440\alpha + 4.694 \end{cases} \quad (2.12)$$

El ajuste para el primer modo da un $R^2 = 0.999999$ mientras que para el segundo modo $R^2 = 1$, lo cual garantiza un buen ajuste para ambos casos. Como es de esperar, si el nanohilo es uniforme, siendo por tanto $\alpha = 0$, obtenemos el mismo resultado dado por la ecuación de auto-valores 1.66. Una propiedad interesante es que la relación entre los cuadrados de estas dos funciones dan una dependencia lineal para valores de $0 < \alpha < 0.9$, es decir, la relación entre las frecuencias propias de

oscilación del segundo y primer modo flexural se puede aproximar por la siguiente ecuación (figura 2.3),

$$\frac{f_2}{f_1} \approx 6.267 - 4.103\alpha \quad (2.13)$$

Por lo tanto, se puede conocer el grado de conicidad que presentan los *SiNWs* simplemente midiendo las frecuencias del primer y segundo modo y aplicando la ecuación 2.13, lo cual proporciona un nuevo y sencillo método para la caracterización de este tipo de resonadores sin la necesidad de realizar medidas en un microscopio de barrido electrónico, SEM (del inglés, “*Scanning Electron Microscopy*”). Además, esta ecuación no depende ni de la longitud ni del material de los resonadores.

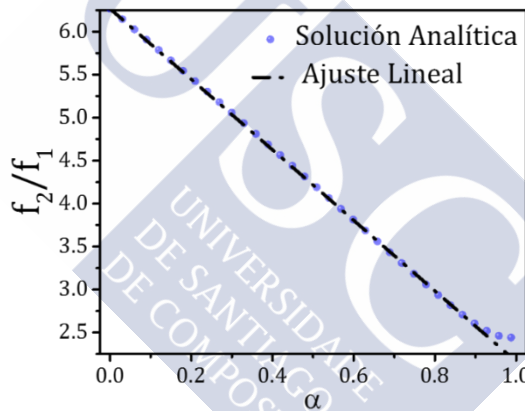


Figura 2.3. Solución numérica (puntos) y ajuste lineal (línea discontinua) obtenido para la relación entre la frecuencia del segundo modo y la del primer modo en función del grado de conicidad.

Para obtener la solución de la parte espacial, es decir, la forma de los modos, es necesario conocer A_n , B_n , C_n y D_n . El sistema de ecuaciones 2.10 es indeterminado, por tanto los coeficientes B_n , C_n y D_n serán proporcionales a A_n y el nuevo sistema de ecuaciones se reduce a tres ecuaciones. Sin embargo, el sistema de ecuaciones será no-homogéneo. Resolviendo este sistema de ecuaciones²⁹ obtenemos los valores B_n , C_n y D_n y la expresión para la forma de los modos en función de α .

2.2.3. SIMULACIÓN POR ELEMENTOS FINITOS

Para confirmar los resultados obtenidos en la sección anterior se realizaron simulaciones mediante el método de elementos finitos, FEM (del inglés “*Finite Element Method*”) utilizando el software comercial *Comsol Multiphysics*TM.

Para realizar las simulaciones se ha utilizado el módulo de “*Solid Mechanics*” y un estudio “*Eigenfrequency*”. La geometría consiste en un cilindro donde uno de sus extremos está anclado y con radio fijo, mientras que el otro extremo se encuentra libre. La longitud se fija a $L = 10 \mu\text{m}$. El material seleccionado en la librería de *Comsol* es “*Poly-Si*” con una densidad $\rho = 2320 \text{ kg/m}^3$ y un módulo de Young $E = 160 \text{ GPa}$. El mallado utilizado es de tipo tetraédrico con un número de elementos alrededor de $80k$ y $500k$ grados de libertad. Dejando fijo el radio del extremo anclado y reduciendo, de manera progresiva, el radio del extremo libre del *SiNW*, se obtiene la forma de los modos para diferentes grados de conicidad. Como se puede ver en figura 2.4, la forma del modo depende claramente de α .

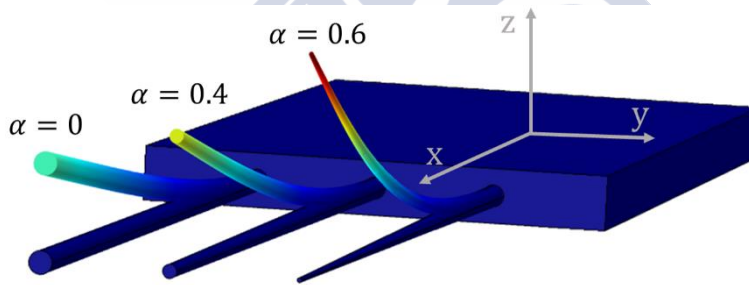


Figura 2.4. Simulación FEM mostrando el primer modo de oscilación para tres nanohilos con diferente grado de conicidad, $\alpha = 0$, $\alpha = 0.4$ y $\alpha = 0.6$.

Una manera de estudiar estos dispositivos como sensores de masa y rigidez es mediante la caracterización, no solo de la forma del modo, sino también de la curvatura^{1,32}, ya que, como se verá en detalle en el capítulo 5 de este trabajo de tesis doctoral, el cambio en frecuencia debido a la masa de un adsorbato es proporcional a la forma del modo al cuadrado, mientras que el cambio en frecuencia debido a su rigidez lo es a la curvatura al cuadrado.

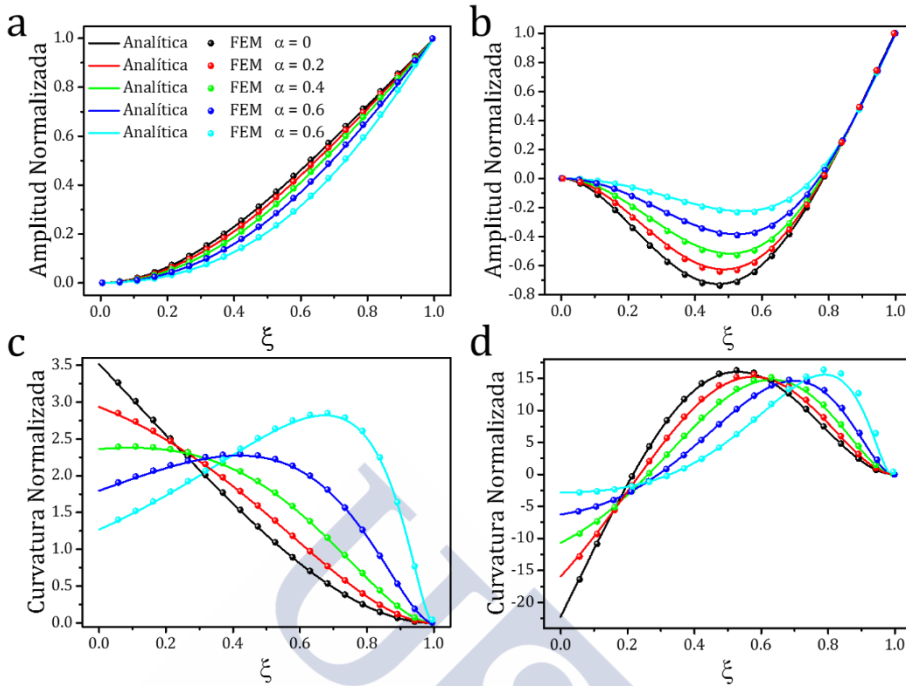


Figura 2.5. Forma del modo para: **a.** primer modo y **b.** segundo modo en función del grado de conicidad. Curvatura para: **c.** primer modo y **d.** segundo modo en función del grado de la conicidad. Los puntos representan simulaciones y la línea la solución analítica. La forma del modo está normalizada al máximo desplazamiento para cada α .

En las figuras 2.5a y 2.5b se representan la forma del primer segundo modo flexural, respectivamente, mientras que en las figuras 2.5c y 2.5d se representan las curvaturas correspondientes, obtenidas mediante simulaciones FEM (puntos) y mediante la ecuación analítica 2.8 (línea) en función del grado de conicidad, α . Tanto la forma del modo como la curvatura concuerdan perfectamente. La amplitud de la forma de los modos de vibración se encuentra más localizada hacia el extremo libre conforme aumenta la conicidad. Por otro lado, la curvatura del primer modo se reduce significativamente en el extremo fijo y el máximo se desplaza a posiciones intermedias conforme aumente la conicidad. La zona de máxima curvatura del segundo modo, situada en el centro, se desplaza hacia el extremo libre.

2.3. EXPERIMENTO Y RESULTADOS

En este apartado se describe el sistema experimental utilizado para la medida de las frecuencias de resonancia de los *SiNWs*. Las frecuencias de resonancia obtenidas experimentalmente se comparan con la teoría analítica. Se demuestra que, a partir de la medida de las dos primeras frecuencias flexurales de oscilación se puede deducir el grado de conicidad y finalmente se muestra la sensibilidad en masa mediante un sencillo cálculo de la mínima masa detectable en función del grado de conicidad, mostrando la importancia de utilizar los resultados analíticos obtenidos en la sección anterior.

2.3.1. SISTEMA EXPERIMENTAL

Las frecuencias naturales de vibración de los *SiNWs* se han medido con el sistema óptico interferométrico^{1,33} (Apéndice A) mostrado en la figura 2.6.

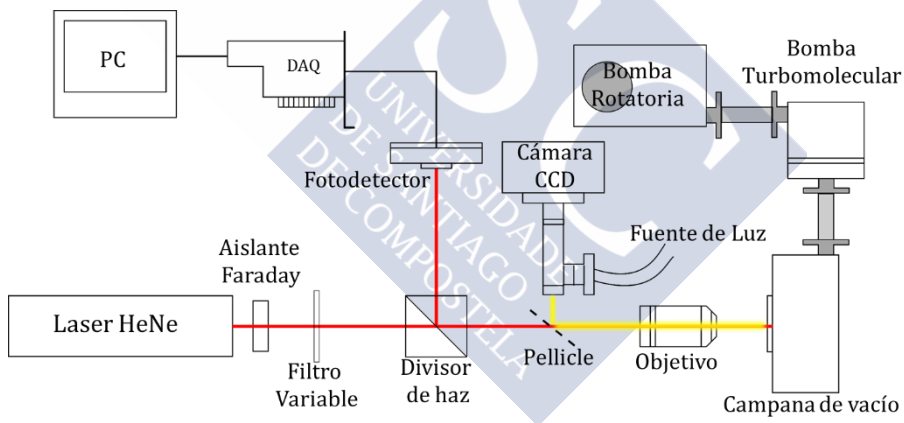


Figura 2.6. Sistema experimental interferométrico utilizado para la medida de las frecuencias de resonancia de los *SiNWs*. Un láser de HeNe es enfocado mediante un objetivo en los *SiNWs* que se encuentra en una campana a alto vacío. El haz reflejado es enviado a un fotodetector por medio de un divisor de haz. La señal del fotodetector es enviada a una tarjeta de adquisición de datos para ser finalmente tratada en un ordenador (PC).

Un láser de Helio-Neón (*HeNe*, $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, $P = 20 \text{ mW}$, Thorlabs Inc.) es enviado a través de un aislante Faraday (*Newport*) para evitar inestabilidades en el láser debido a reflejos que puedan volver a introducirse en la cavidad óptica. La potencia del haz láser se controla

mediante un filtro neutro variable entre 10 y 500 μW a la entrada de la campana de vacío. El haz es enfocado en los nanohilos por medio de un objetivo 50x, con una distancia de trabajo de 12 mm (*Mitutoyo, NA 0.55*), consiguiendo un tamaño de spot de aproximadamente $\sim 1 \mu m$. El haz reflejado por el sustrato es enviado a un fotodetector (PDA36A-EC, Thorlabs Inc.) por medio de un divisor de haz. El haz incidente y reflejado producen una interferencia Fabry-Perot, la cual es modulada por la vibración del resonador^{33,34}. Debido a las dimensiones nanométricas de la sección transversal de los *SiNWs*, inferiores a media longitud de onda del haz incidente, la reflexión producida por el resonador es despreciable. No obstante, la onda estacionaria, producida por la interferencia entre el haz incidente y reflejado, interacciona con el campo evanescente del modo óptico confinado en el nanohilo, y los desplazamientos del nanohilo modifican la intensidad recogida en el fotodetector. Las amplitudes de oscilación termomecánicas de los *SiNWs* son del orden de Angstroms lo cual pone de manifiesto la enorme sensibilidad de este método de transducción óptico³⁵. Mediante una tarjeta de adquisición de datos (Osciloscopio/Digitalizador de 12 Bits, 200 MS/s, PCI-5124 de *National Instruments*) y un programa implementado en LabVIEW (*National Instruments*) se obtienen las frecuencias de resonancia realizando la transformada de Fourier a la señal procedente del fotodetector. Los *SiNWs* se encuentran en una campana de vacío (10^{-5} mbar) para minimizar la disipación de energía debido al medio que los rodea³⁶⁻³⁸. Para ello se utiliza una bomba turbomolecular (*Turbo-V 81-M, Agilent Technologies*) y una bomba rotatoria (*Hanning E2, E7B4V3-7-351, Leybold Trivac*). Para visualizar el correcto posicionamiento del láser sobre los *SiNWs* se utiliza una fuente de luz blanca y una cámara con dispositivo de carga acoplada, CCD (del inglés “*Charge-Coupled Device*”, *Lumera Infinity*). La posición de los *SiNWs* se controla por medio de un nanoposicionador de tres ejes (Attocube).

El sistema experimental mostrado en la figura 2.6 se ha utilizado para realizar estudios sobre la importancia de la polarización del haz laser para la medida del desplazamiento de los *SiNWs*. Aunque estos experimentos no forman parte de la presente tesis doctoral y no se

explicará con detalle los resultados obtenidos, a continuación, se resumirá los aspectos más importantes.

Para la caracterización dinámica en función de la polarización se introduce en el sistema interferométrico un polarizador lineal³³, el cual nos permite controlar con que polarización se miden los *SiNWs*. Uno de los aspectos más importantes, además de la polarización del haz incidente, es la distancia entre el *SiNWs* y el sustrato, así como el radio de los mismos, lo cual provoca que el acoplamiento opto-mecánico³⁹⁻⁴¹ entre el resonador y el láser se maximice o minimice. Esto se traduce en que, dependiendo de la polarización del haz, el radio del resonador y la distancia entre el sustrato y el resonador, la vibración de los *SiNWs* puede estar localizada en un máximo de sensibilidad, mejorando enormemente la detección del mismo, o en un mínimo, con lo cual se volvería invisible³⁴. Como la sensibilidad depende del radio de los resonadores y estos son cónicos, un mismo *SiNW* puede ser medido con mucha sensibilidad en una posición longitudinal del mismo con una polarización determinada, mientras que puede ser invisible en otra posición diferente con la misma polarización. Este fenómeno físico también permite “enfriar” o “calentar” los resonadores, es decir, hacer que vibren muy poco o que vibren mucho⁴². Los trabajos de optomecánica con *SiNWs* se han desarrollado a lo largo de esta tesis doctoral colaborando con los Dr. Eduardo Gil-Santos y Dr. Daniel Ramos en el grupo del Dr. Francisco Javier Tamayo (*Bionanomechanic Lab, IMM-CSIC*).

2.3.2. RESULTADOS

El sistema experimental descrito anteriormente se ha utilizado para la medida del ruido termomecánico entorno a las dos primeras frecuencias de resonancia de los *SiNWs*. La figura 2.7 muestra el espectro térmico de los dos primeros modos flexurales de vibración de un *SiNW*.

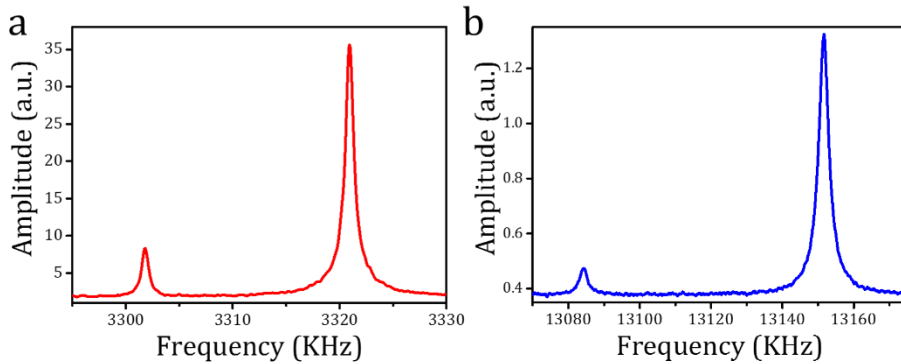


Figura 2.7. Espectro termomecánico para **a.** el primer y **b.** el segundo modo flexural de vibración de un nanohilo de silicio cónico.

Debido a la ruptura de la degeneración de los modos aparecen dos resonancias en las cuales el resonador vibra en planos ortogonales¹. Este fenómeno fue estudiado y caracterizado por el Dr. Eduardo Gil-Santos durante su tesis doctoral. El primer modo flexural presenta dos resonancias, una en $f_{1s} = 3.30 \text{ MHz}$ y la otra en $f_{1f} = 3.32 \text{ MHz}$. Mientras que para el segundo modo flexural la resonancias se encuentran en $f_{2s} = 13.08 \text{ MHz}$ y $f_{2f} = 13.18 \text{ MHz}$. Los subíndices 1, 2, *s* y *f* hacen referencia al primer modo, segundo modo, oscilación lenta del modo o de más baja frecuencia (“*slow*”) y oscilación rápida o de mayor frecuencia (“*fast*”), respectivamente. La separación entre degenerados es muy similar en ambos modos y para el estudio de la conicidad solo usaremos por convenio la frecuencia de oscilación de mayor amplitud.

Para corroborar la ecuación 2.13 se realizaron una serie de medidas del ruido termomecánico de distintos nanohilos y se caracterizaron los mismo por SEM. La figura 2.8 es una imagen de SEM del mismo nanohilo del espectro termomecánico de la figura 2.7.

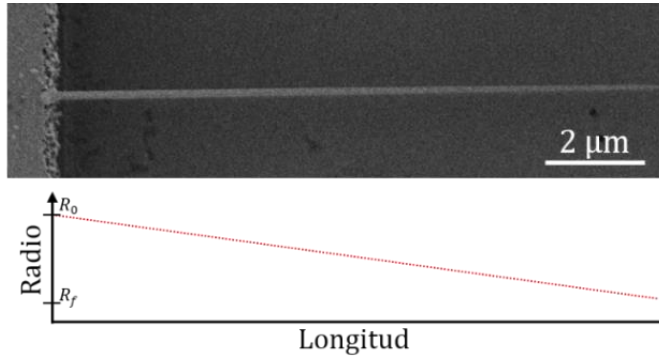


Figura 2.8. Imagen de SEM de un nanohilo de silicio en el que se aprecia claramente el grado de conicidad ($R_0 = 46.30 \text{ nm}$, $R_f = 19.85 \text{ nm}$).

Se caracterizaron diez *SiNWs* diferentes mediante SEM y se midieron sus frecuencias de resonancia. Los datos se encuentran resumidos en la tabla 2.1

SiNWs	L (μm)	R_0 (nm)	R_f (nm)	α	$f_{1\text{exp}}$ (MHz)	$f_{2\text{exp}}$ (MHz)
1	7.49	46.3	19.85	0.571	3.32	13.15
2	6.75	47.10	20.65	0.562	3.38	13.27
3	18.20	136.65	118.00	0.136	1.05	5.80
4	17.21	94.25	71.45	0.242	0.79	4.24
5	16.37	68.3	49.75	0.272	0.70	3.38
6	6.53	46.58	19.67	0.578	3.38	13.27
7	7.59	48.8	19.85	0.593	3.13	12.11
8	7.67	48.67	16.57	0.660	2.89	11.18
9	19.40	149.05	131.50	0.118	1.02	5.73
10	8.36	51.75	17.60	0.660	2.75	10.59

Tabla 2.1. Datos de diez *SiNWs* caracterizados mediante SEM donde se muestra su radio inicial y final y su grado de conicidad, así como las frecuencias del primer y segundo modo.

Como se puede observar en la tabla 2.1 el radio de los nanohilos utilizados en este trabajo de tesis doctoral van desde los 15 nm hasta 150 nm y sus frecuencias de resonancia entre 700 kHz y 13 MHz para el primer y segundo modo respectivamente, mientras que el factor de calidad ronda los $10k$. La longitud varía desde las $6 \mu\text{m}$ hasta los $20 \mu\text{m}$.

Las medidas obtenidas de los radios y frecuencias de resonancia se han utilizado para corroborar las ecuaciones 2.7 y 2.13 como se puede comprobar en las figuras 2.9a y 2.9b.

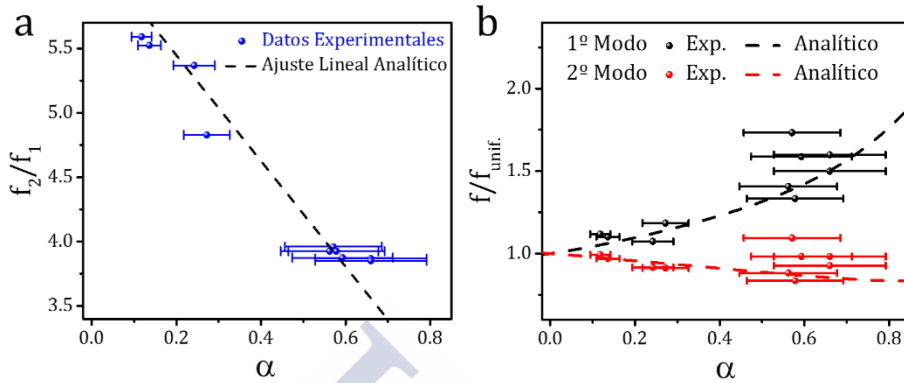


Figura 2.9. a. Relación entre las frecuencias de resonancia del segundo y primer modo de nanohilos cónicos frente a su grado de conicidad. **b.** Frecuencia de resonancia normalizada a la del nanohilo uniforme equivalente con radio R_0 para el primer modo (negro) y segundo modo (rojo). Datos experimentales (puntos) y solución analítica (línea discontinua)

Para un nanohilo uniforme, es decir, que el radio sea constante a lo largo de su longitud, la relación entre las frecuencias del segundo y primer modo es 6.267 que es el valor al que tiende la figura 2.9a para $\alpha = 0$. En la figura 2.9b se representan las frecuencias de resonancia normalizadas a la frecuencia del nanohilo uniforme equivalente con radio constante igual al radio en la base del nanohilo frente a su grado de conicidad. Para el cálculo de la frecuencia uniforme se ha usado la ecuación 2.7. Se puede ver que los datos experimentales concuerdan, en gran medida, con el modelo analítico. Las barras de error son debidas a la incertidumbre en la medida de los radios.

2.3.3. SENSIBILIDAD Y MÍNIMA MASA DETECTABLE

En este apartado se analiza cómo afecta el grado de conicidad a la sensibilidad en masa, así como a la mínima masa detectable que son dos parámetros interesantes para caracterizar los nanohilos de silicio para su uso como sensores de masa. Definimos la sensibilidad, \mathfrak{R} , del resonador frente a un estímulo externo como la variación de la frecuencia de resonancia debido a este. En el caso de adsorción de

partículas en el resonador la variación de la frecuencia de resonancia vendrá dada por la suma de los efectos de masa y rigidez, es decir:

$$\mathfrak{R} = \frac{\partial f_n}{\partial m_n} + \frac{\partial f_n}{\partial k_n} \quad (2.14)$$

Donde m_n , k_n y f_n son la masa efectiva, rigidez efectiva y frecuencia del modo n , tal que:

$$\begin{cases} m_n = \int_0^1 \rho S(\xi) \psi_n(\xi)^2 d\xi \\ k_n = \int_0^1 E I(\xi) \left(\frac{\partial^2 \psi_n(\xi)}{\partial \xi^2} \right)^2 d\xi \end{cases} \quad (2.15)$$

Donde se ha usado la normalización descrita en el *capítulo 1*. Por lo tanto, la sensibilidad en masa será proporcional a la forma del modo al cuadrado mientras que la sensibilidad en rigidez lo será a la curvatura del modo al cuadrado.

Se ha analizado en caso particular del efecto de la conicidad de los nanohilos en la sensibilidad en masa. La mínima masa detectable del sistema viene dada por:

$$\delta M = -\frac{2m_n}{f_n} \delta f = \tilde{\mathfrak{R}}_n^{-1} \delta f \quad (2.16)$$

Donde $\tilde{\mathfrak{R}}$ es la responsividad en masa del sistema y δf es el mínimo cambio detectable en frecuencia. Por lo tanto, la mínima masa detectable de un *SiNW* cónico difiere de la de un *SiNW* uniforme debido a los cambios en las frecuencias y a las formas de los modos, es decir, debido a los cambios temporal y espacial de la resolución de la ecuación de Euler-Bernoulli de los *SiNWs* cónicos. Por un lado, el grado de conicidad cambia la masa inercial con respecto al *SiNW* uniforme debido a la disminución del volumen, y por otro lado modifica la forma de los modos de oscilación lo cual se traduce en una reducción adicional de la masa efectiva del sistema.

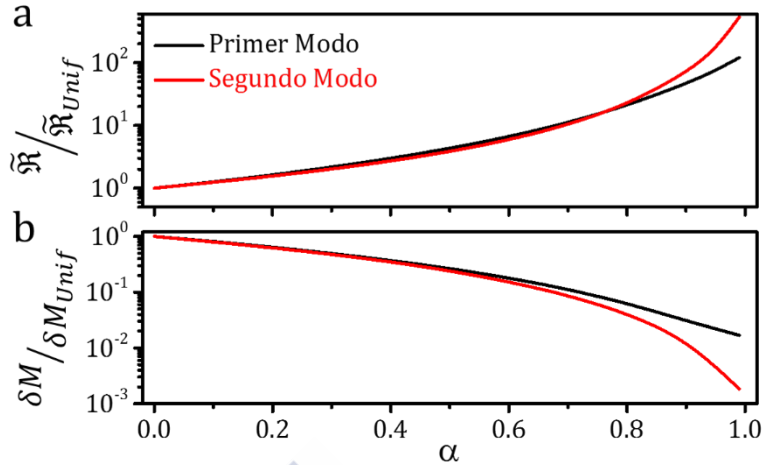


Figura 2.10. a. Responsividad de un *SiNW* cónico normalizado a uno uniforme frente al grado de conicidad para el primer modo (línea negra) y segundo modo (línea roja). **b.** Mínima masa detectable de un *SiNW* cónico normalizado al *SiWN* uniforme frente a su grado de conicidad para el primer modo (línea negra) y segundo modo (línea roja).

La figura 2.10a muestra la responsividad del sistema para los dos primeros modos flexurales de oscilación normalizada a la del *SiNW* uniforme con la misma longitud y radio R_0 . Como se puede observar la responsividad se incrementa por un factor superior a 20 para $\alpha > 0.8$.

Finalmente, se ha estimado la mínima masa detectable considerando que el mínimo cambio en frecuencia está limitado por el ruido de las fluctuaciones termomecánicas, es decir:

$$\delta M = m_n \sqrt{\frac{E_{th} 2BW}{E_c \pi f_n Q_n}} \quad (2.17)$$

Donde B es el ancho de banda, BW (del inglés, “*BandWidth*”), Q_n es el factor de calidad del modo n , $E_{th} = k_B T$ es la energía térmica y E_c es la energía oscilación. La figura 10b muestra la mínima masa detectable de un *SiNW* cónico de nuevo normalizado a un *SiNW* uniforme con la misma longitud y radio R_0 . La temperatura, BW , factor de calidad y energía de oscilación se consideran iguales para ambos casos. El aumento de la sensibilidad debido al grado de conicidad no es simplemente debido a una disminución en la masa del *SiNW* ya que para el caso particular de $\alpha = 1$ la masa inercial se reduce 1/3 sin embargo la mínima masa detectable es al menos tres órdenes de magnitud menor.

Esto es debido a que conforme aumenta el grado de conicidad la amplitud de oscilación se concentra hacia el extremo libre del resonador lo cual se traduce en una disminución de la masa efectiva del modo.

2.4. CONCLUSIONES

El estudio realizado con nanohilos de silicio con sección no uniforme nos ha llevado al desarrollo de una nueva expresión analítica para describir, tanto espacial como temporalmente, estas nanoestructuras en función de su grado de conicidad. Las medidas experimentales realizadas en un sistema interferométrico Fabry-Perrot se han utilizado para corroborar las ecuaciones obtenidas al resolver la ecuación de Euler-Bernoulli para nanohilos con sección no uniforme. Estos resultados permiten obtener el grado de conicidad de este tipo de estructuras midiendo los dos primeros modos de oscilación sin necesidad de realizar ningún tipo de inspección óptica. Estas ecuaciones pueden ser utilizadas para calcular con mayor precisión la masa y rigidez de adsorbatos en el caso de utilizar estos dispositivos como sensores de masa y rigidez. Finalmente, se ha estimado la mínima masa detectable, comparándola con la de un resonador uniforme, siendo al menos dos órdenes de magnitud mejor para el primer modo flexural de oscilación y tres órdenes de magnitud para el segundo modo debido fundamentalmente a la localización de la vibración hacia el extremo libre. Además, el máximo de la curvatura del primer y segundo modo se desplazan hacia el extremo libre lo que permitiría medir masa y rigidez en una mayor área del resonador. Estos resonadores muestran excelentes características para ser utilizados como sensores en espectroscopia de masa y rigidez, teniendo como única desventaja su baja sección eficaz de captura, lo que podría solventarse en un futuro con el uso de múltiples resonadores o el guiado de las partículas.



REFERENCIAS

- 1 Gil-Santos, E. *et al.* Nanomechanical mass sensing and stiffness spectrometry based on two-dimensional vibrations of resonant nanowires. *Nature nanotechnology* **5**, 641-645, doi:10.1038/nnano.2010.151 (2010).
- 2 Feng, X. L., He, R., Yang, P. & Roukes, M. L. Very High Frequency Silicon Nanowire Electromechanical Resonators. *Nano letters* **7**, 1953-1959, doi:10.1021/nl0706695 (2007).
- 3 Namdari, P., Daraee, H. & Eatemadi, A. Recent Advances in Silicon Nanowire Biosensors: Synthesis Methods, Properties, and Applications. *Nanoscale Research Letters* **11**, 406, doi:10.1186/s11671-016-1618-z (2016).
- 4 Ditlbacher, H. *et al.* Silver Nanowires as Surface Plasmon Resonators. *Physical Review Letters* **95**, 257403 (2005).
- 5 Tanner, S. M., Gray, J. M., Rogers, C., Bertness, K. A. & Sanford, N. A. High-Q GaN nanowire resonators and oscillators. *Applied Physics Letters* **91**, 203117 (2007).
- 6 Wu, D. H., Chien, W. T., Chen, C. S. & Chen, H. H. Resonant frequency analysis of fixed-free single-walled carbon nanotube-based mass sensor. *Sensors and Actuators A: Physical* **126**, 117-121, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.sna.2005.10.005 (2006).
- 7 Sazonova, V. *et al.* A tunable carbon nanotube electromechanical oscillator. *Nature* **431**, 284-287 (2004).
- 8 Yasuda, M., Takei, K., Arie, T. & Akita, S. Oscillation control of carbon nanotube mechanical resonator by electrostatic interaction induced retardation. *Scientific reports* **6**, 22600, doi:10.1038/srep22600. <http://www.nature.com/articles/srep22600#supplementary-information> (2016).
- 9 Yang, Y. T., Callegari, C., Feng, X. L., Ekinci, K. L. & Roukes, M. L. Zeptogram-Scale Nanomechanical Mass Sensing. *Nano letters* **6**, 583-586, doi:10.1021/nl052134m (2006).
- 10 Hanay, M. S. *et al.* Single-protein nanomechanical mass spectrometry in real time. *Nature nanotechnology* **7**, 602-608, doi:10.1038/nnano.2012.119 (2012).
- 11 Hanay, M. S. *et al.* Inertial imaging with nanomechanical systems. *Nat Nano* **10**, 339-344, doi:10.1038/nnano.2015.32. <http://www.nature.com/nnano/journal/v10/n4/abs/nnano.2015.32.html#supplementary-information> (2015).

- 12 Sage, E. *et al.* Neutral particle mass spectrometry with nanomechanical systems. *Nature communications* **6**, doi:10.1038/ncomms7482 (2015).
- 13 Cui, Y., Zhong, Z., Wang, D., Wang, W. U. & Lieber, C. M. High Performance Silicon Nanowire Field Effect Transistors. *Nano letters* **3**, 149-152, doi:10.1021/nl0258751 (2003).
- 14 Weber, W. M. *et al.* Silicon-Nanowire Transistors with Intruded Nickel-Silicide Contacts. *Nano letters* **6**, 2660-2666, doi:10.1021/nl0613858 (2006).
- 15 Cui, Y. & Lieber, C. M. Functional Nanoscale Electronic Devices Assembled Using Silicon Nanowire Building Blocks. *Science* **291**, 851-853, doi:10.1126/science.291.5505.851 (2001).
- 16 Tsakalagos, L. *et al.* Silicon nanowire solar cells. *Applied Physics Letters* **91**, 233117, doi:doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.2821113 (2007).
- 17 Hochbaum, A. I. *et al.* Enhanced thermoelectric performance of rough silicon nanowires. *Nature* **451**, 163-167, doi:http://www.nature.com/nature/journal/v451/n7175/suppinfo/nature06381_S1.html (2008).
- 18 Boukai, A. I. *et al.* Silicon nanowires as efficient thermoelectric materials. *Nature* **451**, 168-171, doi:http://www.nature.com/nature/journal/v451/n7175/suppinfo/nature06458_S1.html (2008).
- 19 Heath, J. in *Solar Energy: New Materials and Nanostructured Devices for High Efficiency*. SWB1 (Optical Society of America).
- 20 Minot, E. D. *et al.* Single Quantum Dot Nanowire LEDs. *Nano letters* **7**, 367-371, doi:10.1021/nl062483w (2007).
- 21 Hu, Y. *et al.* A Ge//Si heterostructure nanowire-based double quantum dot with integrated charge sensor. *Nat Nano* **2**, 622-625, doi:http://www.nature.com/nnano/journal/v2/n10/suppinfo/nnano.2007.302_S1.html (2007).
- 22 Zwanenburg, F. A., van Rijmenam, C. E. W. M., Fang, Y., Lieber, C. M. & Kouwenhoven, L. P. Spin States of the First Four Holes in a Silicon Nanowire Quantum Dot. *Nano letters* **9**, 1071-1079, doi:10.1021/nl803440s (2009).
- 23 Naik, A. *et al.* Cooling a nanomechanical resonator with quantum back-action. *Nature* **443**, 193-196, doi:http://www.nature.com/nature/journal/v443/n7108/suppinfo/nature05027_S1.html (2006).

- 24 San Paulo, Á. *et al.* Suspended Mechanical Structures Based on Elastic Silicon Nanowire Arrays. *Nano letters* **7**, 1100-1104, doi:10.1021/nl062877n (2007).
- 25 Fernández-Regúlez, M. *et al.* Horizontally patterned Si nanowire growth for nanomechanical devices. *Nanotechnology* **24**, 095303 (2013).
- 26 Wu, Y. *et al.* Controlled Growth and Structures of Molecular-Scale Silicon Nanowires. *Nano letters* **4**, 433-436, doi:10.1021/nl035162i (2004).
- 27 Li, M. *et al.* Bottom-up assembly of large-area nanowire resonator arrays. *Nat Nano* **3**, 88-92, doi:http://www.nature.com/nnano/journal/v3/n2/supinfo/nnano.2008.26_S1.html (2008).
- 28 Hochbaum, A. I., Fan, R., He, R. & Yang, P. Controlled Growth of Si Nanowire Arrays for Device Integration. *Nano letters* **5**, 457-460, doi:10.1021/nl047990x (2005).
- 29 Malvar, O. *et al.* Tapered silicon nanowires for enhanced nanomechanical sensing. *Applied Physics Letters* **103**, 033101, doi:10.1063/1.4813819 (2013).
- 30 Taha, M. H. & Abohadima, S. Mathematical model for vibrations of non-uniform flexural beams. *Engineering Mechanics* **15**, 3-11 (2008).
- 31 McLachlan, N. W. Bessel functions for engineers. (1934).
- 32 Ramos, D., Tamayo, J., Mertens, J., Calleja, M. & Zaballos, A. Origin of the response of nanomechanical resonators to bacteria adsorption. *Journal of Applied Physics* **100**, 106105, doi:10.1063/1.2370507 (2006).
- 33 Gil-Santos, E. *et al.* Optical back-action in silicon nanowire resonators: bolometric versus radiation pressure effects. *New Journal of Physics* **15**, 035001, doi:10.1088/1367-2630/15/3/035001 (2013).
- 34 Ramos, D. *et al.* Silicon nanowires: where mechanics and optics meet at the nanoscale. *Scientific reports* **3**, 3445, doi:10.1038/srep03445 (2013).
- 35 Sanii, B. & Ashby, P. D. High Sensitivity Deflection Detection of Nanowires. *Physical Review Letters* **104**, 147203 (2010).
- 36 Sader, J. E. Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope. *Journal of Applied Physics* **84**, 64, doi:10.1063/1.368002 (1998).
- 37 Van Eysden, C. A. & Sader, J. E. Frequency response of cantilever beams immersed in compressible fluids with applications to the atomic

- force microscope. *Journal of Applied Physics* **106**, 094904, doi:10.1063/1.3254191 (2009).
- 38 Zhang, C., Xu, G. & Jiang, Q. Analysis of the air-damping effect on a micromachined beam resonator. *Mathematics and mechanics of solids* **8**, 315-325 (2003).
- 39 Gil Santos, E. *et al.* High-frequency nano-optomechanical disk resonators in liquids. *Nat Nano* **10**, 810-816, doi:10.1038/nnano.2015.160. <http://www.nature.com/nnano/journal/v10/n9/abs/nnano.2015.160.html#supplementary-information> (2015).
- 40 Meenehan, S. M. *et al.* Silicon optomechanical crystal resonator at millikelvin temperatures. *Physical Review A* **90**, 011803 (2014).
- 41 Kippenberg, T. J. & Vahala, K. J. Cavity Optomechanics: Back-Action at the Mesoscale. *Science* **321**, 1172-1176, doi:10.1126/science.1156032 (2008).
- 42 Ramos, D. *et al.* Optomechanics with silicon nanowires by harnessing confined electromagnetic modes. *Nano letters* **12**, 932-937, doi:10.1021/nl204002u (2012).



CAPÍTULO 3

3. Microcapilares Resonantes de Sílice

3.1. INTRODUCCIÓN

Tras haber estudiado el comportamiento de los *SiNWs*, uno de los resonadores nanomecánicos más pequeños que se han propuesto como sensores, en este capítulo nos centraremos en la aplicación de microcapilares resonantes de sílice fundido como sensores de densidad de líquidos. Estos resonadores, aun siendo más grandes y con menor sensibilidad, están disponibles comercialmente, son más baratos y fáciles de implementar. En este trabajo se estudiarán sus propiedades mecánicas para ser utilizados como sensores de densidad de líquidos en tiempo real y a presión atmosférica. Estos dispositivos podrían utilizarse en un

trabajo futuro para medir, además de la densidad, la viscosidad, masa y rigidez de entidades biológicas *in situ*.

3.2. MICROCAPILARES DE SÍLICE

Los microcapilares de sílice fundido están disponibles comercialmente en diferentes tamaños y son ampliamente utilizado en diversos campos como la cromatografía de gases¹, electroforesis capilar, CE² (del inglés “*Capillary Electrophoresis*”) cromatografía líquida de alta eficacia, μ HPLC³ (del inglés “*High-Performance Liquid Chromatography*”) análisis de plasma de sangre^{4,5} y reacciones biológicas y químicas⁶⁻⁸. Esto es debido a que la medida de la densidad y viscosidad de líquidos tiene gran importancia en la industria farmacéutica, química, petrolífera y alimentación, entre otras. Entre los instrumentos comerciales para medir la densidad de líquidos basado en resonadores están los macrotubos oscilantes en forma de U⁹ (figura 3.1a), en los cuales se mide la densidad de los líquidos que fluyen por su interior midiendo su frecuencia de resonancia (entre 40 – 400 Hz), usando volúmenes de muestra alrededor de los mililitros y con un límite de detección $\sim 10 \mu\text{g/mL}$. Sin embargo, para una gran variedad de aplicaciones, como el análisis de sangre utilizando sistemas de *point-of-care* (POC), seguimiento de procesos biológicos y reacciones químicas, existe la necesidad de reducir la cantidad de muestreo al orden de μL , así como mejorar su límite de detección. Actualmente existen dos técnicas basadas en resonadores micrométricos para la medida de la densidad y viscosidad de líquidos¹⁰: resonadores mecánicos en la escala micrométrica como las micropalancas^{5-8,11-14} (figura 3.1b) y resonadores suspendidos con microcanales¹⁵⁻¹⁸ (figura 3.1c), SMRs (del inglés “*Suspended Microchannel Resonators*”). Los primeros se basan en la medida de la interacción hidrodinámica entre el líquido y el resonador por medio del cambio en la frecuencia y en el factor de calidad¹⁹⁻²¹. Por otro lado, los SMRs se basan en la miniaturización de los macrotubos U. Normalmente, estos sensores tienen forma de palanca con un microcanal embebido en su interior. Como el líquido fluye por el interior del resonador este puede ser introducido en alto vacío, de tal manera que se consigue aumentar la resolución en la frecuencia debido a que se

minimiza la disipación de energía con el medio ²² mejorando, de esta manera, el factor de calidad.

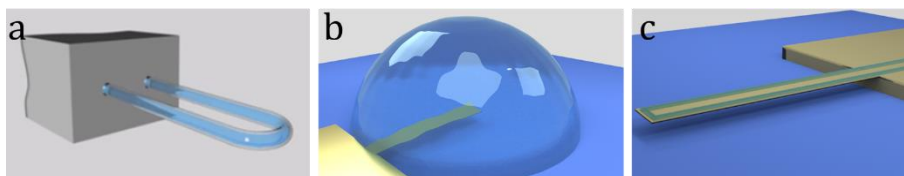


Figura 3.1. Tipos de densímetros basados en resonadores mecánicos. **a.** Macrotubo oscilante en forma de U por el cual fluye el líquido y la densidad se calcula a partir de los cambios en su frecuencia de resonancia. **b.** Micropalanca sumergida en el líquido el cual cambia el factor de calidad y la frecuencia de oscilación debido a las interacciones hidrodinámicas con el medio. **c.** Micropalanca con microcanales embebidos por los cuales fluye el líquido, produciendo cambios en su frecuencia de resonancia.

Los SMRs representan el estado del arte de sensores de densidad^{16,17} los cuales consiguen medir volúmenes de 5 – 10 pL con límites de detección de 4 – 10 $\mu g/mL$. Sin embargo, la tecnología necesaria para su fabricación es complicada y no accesible en la mayoría de laboratorios. En este trabajo de tesis doctoral se han propuesto los microcapilares de sílice fundido como alternativa a los sensores existentes en la literatura para la medida de la densidad de líquidos. La frecuencia fundamental de resonancia del microcapilar lleno de líquido ha sido medida para mezclas binarias obteniendo un límite de detección en aire de 50 $\mu g/mL$, el cual es solo cinco veces mayor que el obtenido con los SMRs en vacío²³. Además, los sensores basados en microcapilares puede ser fácilmente implementado²³, siendo posible su integración con sistemas $\mu HPLC$ y CE, así como en citometría.

3.2.1. ECUACIÓN DE EULER-BERNOULLI PARA MICROCAPILARES

Las medidas de la frecuencia de resonancia de los microcapilares se han realizado usando los resonadores con ambos extremos anclados, es decir, como estructuras tipo puente. Los microcapilares comerciales tienen, por lo general, un pequeño recubrimiento de poliamida que protege el capilar. El recubrimiento de poliamida puede ser retirado física o químicamente. La figura 3.2 muestra una imagen de microscopio de un capilar, como el usado en este trabajo, al cual se le ha retirado la poliamida aplicando calor. Para ello se quema el recubrimiento hasta que queda completamente negro y con cuidado se limpia la superficie

utilizando papel de sala blanca y etanol. Otro método sería mediante ablación láser con un láser excímero o de CO₂ o bien mediante ataque químico con ácido sulfúrico, soluciones cáusticas²⁴, etc. Para la realización del sensor de densidad mostrado en este capítulo no se ha retirado el recubrimiento ya que le aporta robustez y puede ser fácilmente manipulado sin dañarse. Sin embargo, retirándolo se conseguiría reducir su tamaño y, por tanto, aumentar su sensibilidad, así como la posibilidad de observar las partículas que fluyen por su interior.

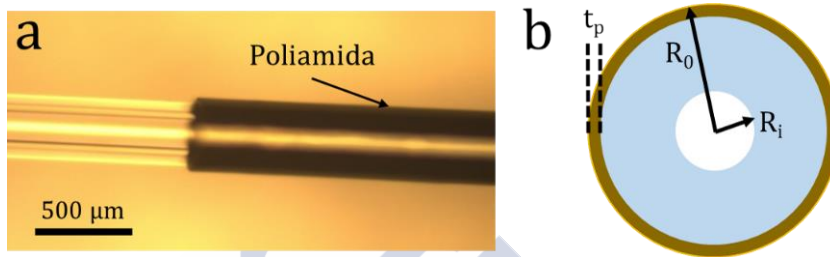


Figura 3.2. a. Fotografía de un microcapilar de sílice fundido de 375 μm de diámetro exterior y 150 μm de diámetro interior y con un espesor de la poliamida de 22 μm . b. Dibujo esquemático de las dimensiones donde t_p es el espesor del recubrimiento de poliamida, R_0 el radio exterior y R_i el radio interior. La fotografía muestra el capilar con y sin el recubrimiento de poliamida.

La ecuación 1.74 del *capítulo 1* representa la forma de los modos para el sensor de densidad implementado mediante un microcapilar con ambos extremos anclados. La figura 3.3 muestra la forma del primer modo analítica (línea) y mediante simulaciones FEM (puntos). Las simulaciones se han realizado con el software comercial *Comsol Multiphysics*TM utilizando el modelo “*solid mechanics*”. Se ha utilizado un mado tetraédrico con aproximadamente 40k elementos y 200k grados de libertad.

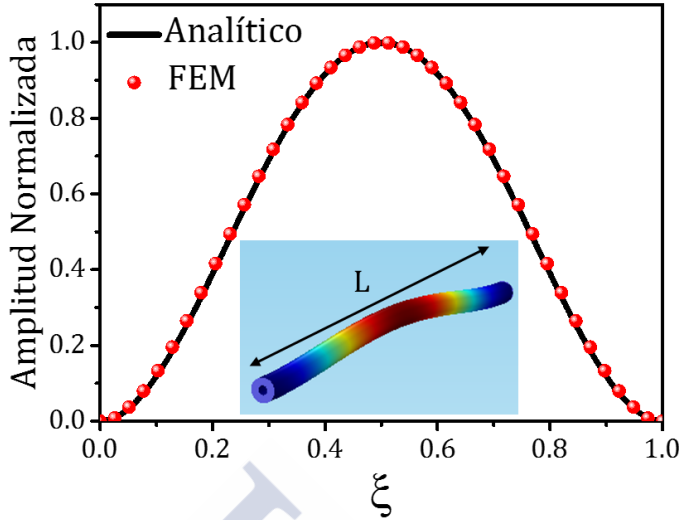


Figura 3.3. Forma del primer modo fundamental de oscilación obtenido mediante la ecuación analítica (línea) y FEM (puntos) del microcapilar, normalizada a la máxima amplitud. El recuadro muestra la forma del modo obtenida mediante simulaciones.

La frecuencia de resonancia dada por la ecuación 1.68 debe ser modificada teniendo en cuenta el espesor de la poliamida, y el tamaño de los radios interior y exterior del capilar. Con estas condiciones, la frecuencia fundamental de resonancia del microcapilar se puede reescribir de la siguiente manera²³:

$$f = \frac{4.730^2}{4\pi L^2} \sqrt{\frac{E_c(R_0^4 - R_i^4)}{\rho_c(R_0^2 - R_i^2) + \rho_l R_i^2}} \quad (3.1)$$

Donde L es la longitud del capilar, R_0 y R_i , el radio exterior e interior del capilar, respectivamente. E_c , ρ_c son el módulo de Young y la densidad del capilar y ρ_l la densidad del líquido. Tanto la densidad como el módulo de Young del capilar se puede aproximar por la suma ponderada de los materiales que forman el capilar, en este caso, el sílice fundido y la poliamida. De tal forma que el módulo de Young del microcapilar se expresa como $E_c = xE_{SiO_2} + (1-x)E_p$ y su densidad como $\rho_c = x\rho_{SiO_2} + (1-x)\rho_p$, siendo $x \in [0,1]$ el porcentaje de sílice, $E_{SiO_2} = 77 \text{ GPa}$ y $E_p = 3.2 \text{ GPa}$ el módulo de Young del sílice y de la poliamida, y siendo $\rho_{SiO_2} = 2230 \text{ Kg/m}^3$ y $\rho_p = 1430 \text{ Kg/m}^3$ la densidad del sílice y la poliamida, respectivamente.

3.2.2. DETECCIÓN ÓPTICA

La medida de los microcapilares resonantes se ha realizado mediante el método de transmisión²⁵, es decir, un láser es enfocado en el microcapilar y el haz transmitido es recogido por un fotodetector (*Apéndice A*). Para estudiar la sensibilidad al desplazamiento del resonador mediante el método de transmisión del haz láser, se realizaron simulaciones FEM con el software comercial *Comsol MultiphysicsTM*. De esta forma se obtiene la posición óptima a la cual se tiene que enfocar el haz láser para ser más sensibles al desplazamiento del resonador. Estas simulaciones han sido realizadas por el Dr. Daniel Ramos. Se ha utilizado el módulo “*Electromagnetic Waves*” realizando un estudio en 2D de la sección transversal del capilar. El material utilizado en la librería para el material del resonador es “*Corning 7940 –fused silica*”. El mallado utilizado es de tipo tetraédrico con un número de elementos alrededor 1.3M y 10M grados libertad. La simulación consiste en hacer incidir un haz Gaussiano y barrer transversalmente el haz por la sección del microcapilar. A continuación, se integra la señal transmitida para diferentes posiciones transversales del campo lejano teniendo en cuenta una apertura numérica de 0.28, ya que es la apertura numérica del objetivo utilizado en este trabajo. Mediante este estudio se identifican dos regiones óptimas para la medida de la vibración de los microcapilares: una cerca del eje (posición 2 en la figura 3.4) y la otra cerca del centro del microcapilar (posición 5 en la figura 3.4). El máximo que aparece en el punto 3 puede ser debido a la poliamida, la cual no se ha considerado a la hora de realizar las simulaciones FEM.

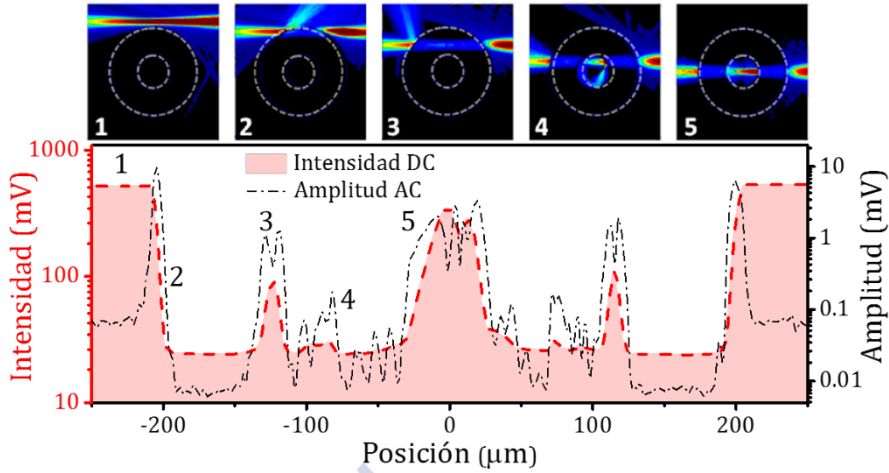


Figura 3.4. Calibración del método de transducción óptica para la medida del desplazamiento del microcapilar. La gráfica muestra las componentes DC y AC de la señal del fotodetector a la frecuencia de resonancia del microcapilar en función de la posición transversal del láser. La parte superior muestra la simulación FEM de la distribución del campo electromagnético resultante de la interacción del láser y el microcapilar para diferentes posiciones.

La gráfica de la figura 3.4 fue realizada mediante un micro-posicionador motorizado (NanoMAX TS 341, Thorlabs Inc.). Para cada posición, aproximadamente cada $2 \mu\text{m}$, se obtiene la componente AC y DC de la frecuencia de resonancia del microcapilar utilizando un lock-in (HF2LI, Zúrich Instruments). El microcapilar es excitado mediante una cerámica piezoeléctrica, como se explicará con más detalle en la siguiente sección.

A partir de ahora, las medidas experimentales del sensor de densidad, han sido realizadas con el láser enfocado cerca del extremo del microcapilar, es decir en la posición 2 ya que se tiene un máximo de sensibilidad de la señal. En esta configuración la responsividad, definida como el cambio relativo de la potencia óptica detectada con respecto a la posición del microcapilar²³, es de $0.132 \mu\text{m}^{-1}$ y el desplazamiento en ruido $\approx 10 \text{ nm}/\sqrt{\text{Hz}}$.

3.3. EXPERIMENTOS Y RESULTADOS

En este apartado se describen los experimentos realizados y los resultados obtenidos en la medida de la densidad de líquidos. Primero se

describirá el sistema experimental utilizado para las medidas de las densidades de las mezclas binarias desde 0.5% hasta 10% en volumen, de etanol en agua Milli-Q®, glicerol en agua Milli-Q® y detergente Tritón-X100 en etanol. A continuación, se mostrarán los resultados obtenidos con el sensor de densidad de líquidos en aire.

3.3.1. SISTEMA EXPERIMENTAL

La figura 3.5 muestra el sistema experimental utilizado para las medidas de la densidad de mezclas binarias.

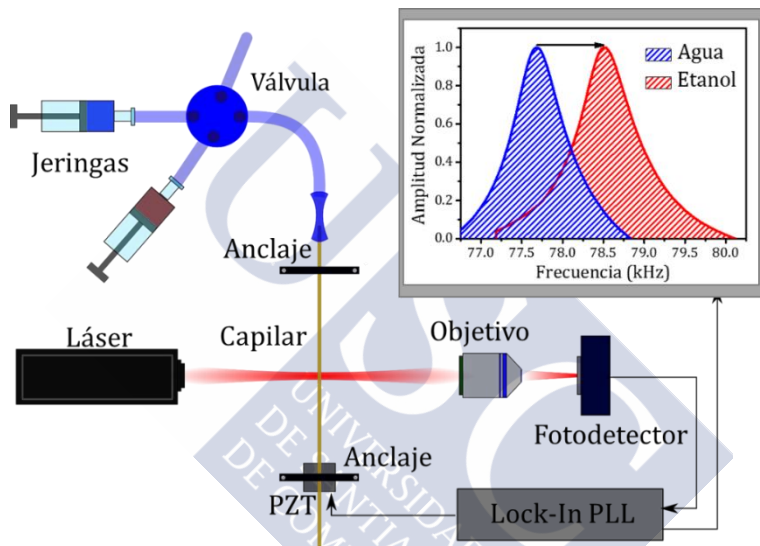


Figura 3.5. Sistema experimental utilizado para la medida de la densidad de líquidos. Un láser es enfocado en el microcapilar y el haz transmitido es recogido por un fotodetector. La frecuencia de resonancia del capilar se sigue mediante un amplificador lock-in con lazo de seguimiento de fase (PLL) y el capilar se excita mediante una cerámica piezoeléctrica (PZT). La gráfica del recuadro superior muestra dos resonancias. El capilar lleno con agua (azul) tiene una menor frecuencia de resonancia que con etanol (rojo) ya que el etanol es menos denso que el agua.

El microcapilar utilizado en este trabajo tiene un radio interior de $75 \mu\text{m}$ y exterior es $187 \mu\text{m}$ con $22 \mu\text{m}$ de recubrimiento de poliamida. El resonador es anclado mecánicamente por ambos extremos obteniendo una longitud de 4.5 mm lo cual proporciona una frecuencia natural de oscilación de $\sim 78 \text{ kHz}$. En uno de los extremos se encuentra una cerámica piezoeléctrica, PZT (del inglés “*Lead Zirconate Titanate*”) utilizada para excitar el microcapilar a su frecuencia fundamental. Un

láser de diodo (3 mW, 639 nm, Schäfer-Kirchhoff GmbH) es enfocado en el medio de la parte suspendida del capilar y cerca del perímetro ya que es el lugar de mayor sensibilidad, como se ha estudiado previamente. Mediante un objetivo 10x (Mitutoyo, NA 0.28) el haz transmitido es enfocado en un fotodetector (PDA36A-EC, Thorlabs Inc.). La señal recogida por el fotodetector es enviada a un amplificador lock-in con un lazo de seguimiento de fase, PLL (del inglés, “Phase-Locked Loop”), (HF2LI, Zurich Instruments) y el microcapilar es excitado por medio de una cerámica piezoeléctrico a su frecuencia fundamental usando el PLL. Por el capilar se hace circular un líquido de referencia y mediante una válvula se hace pasar el líquido de interés. El flujo del líquido es controlado mediante una bomba de jeringa (neMESYS, Cetoni GmbH) equipada con una válvula de inyección de baja presión. El flujo se mantiene durante todas las medidas en 0.5 $\mu\text{L/s}$. En la figura 3.5 el líquido de referencia es agua y cuando se activa la válvula el líquido que se introduce es etanol. En la gráfica se puede ver como la frecuencia fundamental de resonancia del capilar ($f_{\text{H}_2\text{O}} = 77.7 \text{ kHz}$) con agua ($\rho_{\text{H}_2\text{O}} = 998 \text{ Kg/m}^3$) aumenta ($f_{\text{Etanol}} = 78.54 \text{ kHz}$) cuando se hace pasar etanol debido a que la densidad del etanol ($\rho_{\text{Etanol}} = 789 \text{ Kg/m}^3$) es menor. El factor de calidad es alrededor de 130 y está dominado por la interacción hidrodinámica entre el capilar y el aire²⁰. La frecuencia fundamental de resonancia está relacionada con la densidad del líquido que fluye por su interior. Por lo tanto, utilizaremos esta relación para implementar el sensor de densidad basado en microcapilares de sílice fundido.

3.3.2. RESULTADOS

Los experimentos se han realizados con el láser enfocado cerca del perímetro del microcapilar donde el voltaje en el fotodetector presenta un máximo como se ha visto anteriormente (posición 2 en la figura 3.4). Los microcapilares resonantes se han utilizado para medir la densidad de mezclas binarias de etanol-agua Milli-Q®, glicerol-agua Milli-Q®, variando la concentración desde 0.5% hasta el 10% en volumen y detergente Tritón-X100-etanol variando la concentración desde 2% hasta 10% en volumen. Las medidas se han realizado a temperatura ambiente. La tabla 3.1 resume las densidades de los líquidos utilizados para realizar las mezclas binarias.

	ρ (Kg/m ³)
Agua	998
Etanol	789
Glicerol	1261
Triton-X100	1070

Tabla 3.1. Densidades a temperatura ambiente de los líquidos utilizados para realizar las mezclas binarias.

Las mezclas binarias fueron realizadas por la Dra. Carmen Martínez Domínguez y la Dra. Priscila Monteiro Kosaka, siendo el volumen utilizado para cada medida 300 μL . Los experimentos se realizaron como sigue: primero se introduce el líquido de referencia y se sigue la frecuencia de resonancia del microcapilar por medio del PLL. La frecuencia de muestreo seleccionado en el PLL fue de 7.02 muestras por segundo, es decir, se adquiere un dato cada ~ 0.142 s. Seguidamente se activa la válvula para que se introduzca la mezcla binaria a analizar. Finalmente se vuelve a introducir el líquido de referencia.

La figura 3.6a muestra una serie de medidas en tiempo real del cambio relativo en la frecuencia de resonancia para mezclas binarias de etanol-agua. El cambio relativo en la frecuencia de resonancia se define como:

$$\Delta f = \frac{f_{mix} - f_{ref}}{f_{ref}} \quad (3.2)$$

Donde f_{ref} es la frecuencia del capilar con el líquido de referencia y f_{mix} es la frecuencia de resonancia con la mezcla binaria. Como la densidad del etanol es menor que la del agua, la frecuencia de resonancia aumenta a medida que aumenta la concentración de etanol.

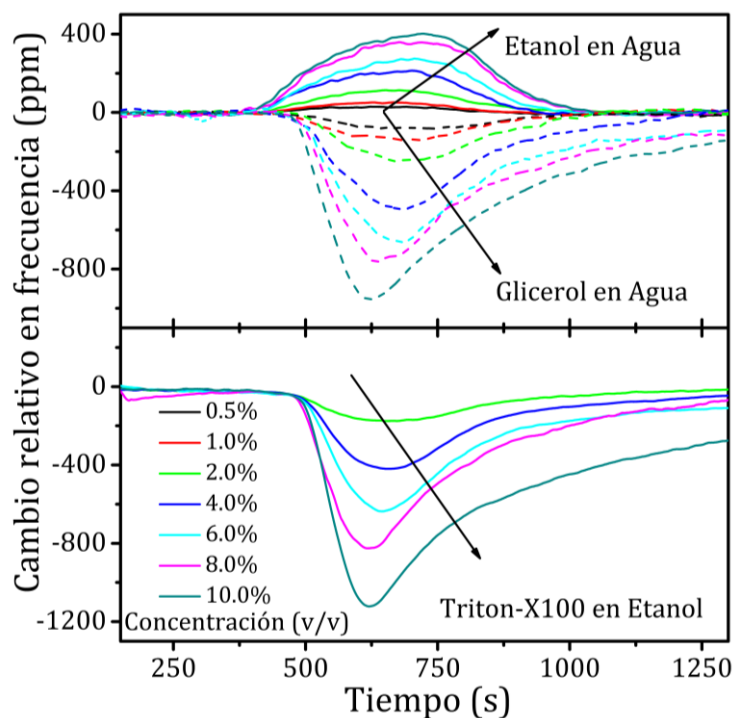


Figura 3.6. Serie de medidas en tiempo real del cambio relativo en frecuencia para: **a.** mezclas binarias de etanol-agua Milli-Q®, **b.** glicerol-agua Milli-Q® y **c.** Triton-X100-etanol. La leyenda indica la proporción en volumen de etanol, glicerol y Triton-X100 en el líquido de referencia.

La figura 3.6b muestra las medidas obtenidas para las mezclas binarias de glicerol-agua. En este caso, como el glicerol es más denso que el agua, la frecuencia de resonancia disminuye a medida que aumenta la concentración de glicerol. De la misma manera se ha realizado la medida utilizando como líquido de referencia etanol para mezclas binaria de Triton-X100 en etanol (figura 3.6c). Al igual que para el caso del glicerol-agua, la frecuencia de resonancia decrece a medida que aumenta la concentración de Triton-X100 en etanol ya que la densidad del Triton-X100 es mayor que la del etanol. En el momento en que la mezcla alcanza la región suspendida del microcapilar la frecuencia de resonancia empieza a cambiar hasta alcanzar un cambio máximo que corresponde a la mayor concentración de la mezcla en el interior del capilar. Después la frecuencia de resonancia regresa a su valor original. El proceso tarda aproximadamente 10 *min* lo cual corresponde con el

volumen utilizado de $300 \mu\text{L}$ dividido entre la velocidad del flujo ($0.5 \mu\text{L/s}$). La ausencia de un intervalo plano en el cambio máximo de las medidas se atribuye a un proceso de difusión en el circuito que conecta las jeringas con el capilar. Las diferentes pendientes en la entrada y salida de la mezcla pueden ser consecuencia de la viscosidad, la tensión superficial y la interacción entre el líquido y las paredes del capilar. En un trabajo futuro se podría correlacionar las diferentes pendientes con propiedades reológicas de los líquidos.

3.3.3. RESPONSIVIDAD

La responsividad de este dispositivo ha sido caracterizada representando gráficamente el máximo cambio de la frecuencia relativa frente a la variación de densidad. La figura 3.7 muestra los puntos que han sido obtenidos de tres mezclas diferentes: etanol-agua, glicerol-agua y Tritón X100-etanol. Los datos de la tres mezclas se ajustan linealmente a una recta cuya pendiente nos da la responsividad del dispositivo²³ (R) definido como el valor absoluto de la relación entre el máximo cambio relativo en la frecuencia de resonancia y la variación en densidad en unidades de mL/g .

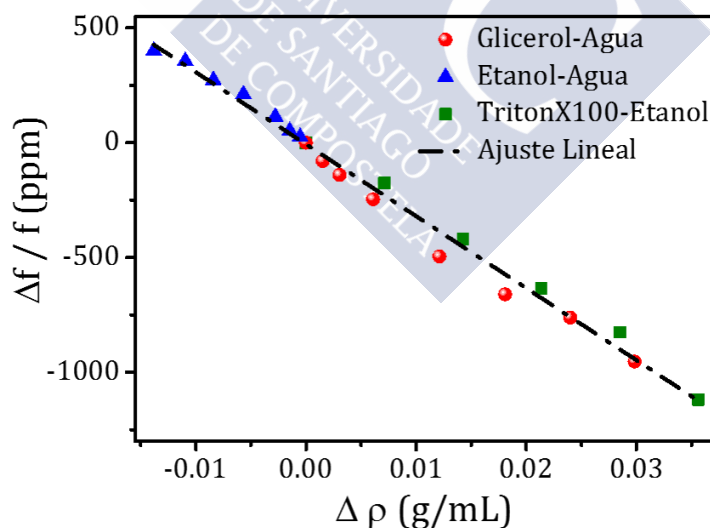


Figura 3.7. Variación máxima del cambio relativo en frecuencia frente a la variación de densidad (símbolos). Los datos se han obtenido a partir de tres mezclas binarias: etanol en agua, glicerol en agua y Triton-X100 en etanol, en diferentes concentraciones desde 0.5% a 10%. La línea discontinua muestra el ajuste lineal cuya pendiente nos proporciona la responsividad del dispositivo.

El valor experimental obtenido de la figura 3.7 es $R = 0.0314 \text{ mL/g}$. El valor teórico de la responsividad se obtiene de manera aproximada utilizando las ecuaciones 3.1 y 3.2 y viene dado por:

$$R \equiv \left| \frac{\partial(\Delta f)}{\partial \Delta \rho_l} \right| \approx -\frac{1}{2} \frac{1}{\rho_g \left[\left(\frac{R_0}{R_i} \right)^2 - 1 \right] + \frac{2\rho_p t_p R_0}{R_i^2} + \rho_l} \quad (3.3)$$

Donde ρ_g y ρ_p son la densidad del sílice y de la poliamida, respectivamente. El valor teórico de la responsividad para el microcapilar utilizado en este trabajo es de 0.0334 mL/g , el cual es un 6% mayor que el valor experimental. Esta diferencia se atribuye a problemas de difusión en el circuito y a cambios en la temperatura.

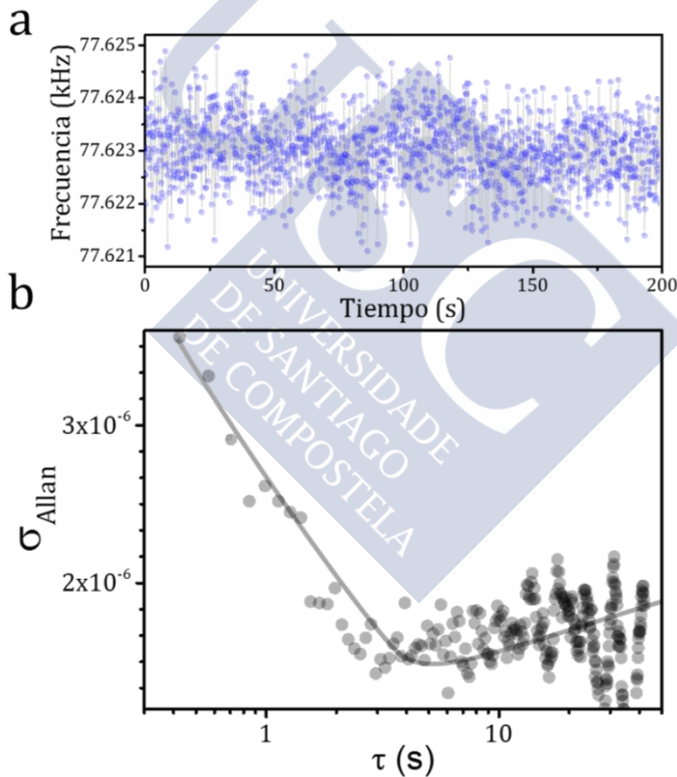


Figura 3.8. a. Estabilidad de la frecuencia del primer modo flexural de vibración del microcapilar utilizado en este trabajo medido con el lock-in con PLL frente al tiempo ($f_0 = 77.623 \text{ kHz}$). b. Varianza de Allan de la frecuencia de resonancia relativa frente al tiempo de integración.

Con el fin de determinar el límite de detección en la variación de la densidad se ha caracterizado la estabilidad en la frecuencia de resonancia (figura 3.8a) mediante la varianza de Allan^{26,27} definida como la mitad de la media de los cuadrados de la diferencia entre dos lecturas consecutivas de la desviación en la frecuencia en un intervalo de tiempo τ , es decir²⁸:

$$\sigma_{Allan}^2(\tau) = \frac{1}{2(M-1)} \sum_{m=1}^M (\overline{y[m+1]} - \overline{y[m]})^2 \quad (3.4)$$

Donde $\overline{y[m]}$ representa la media del cambio relativo en frecuencia para un tiempo de integración τ . Se calcula la varianza de Allan para diferentes tiempos de integración $\tau = qT$, $q = 1 \dots n$, donde T es el tiempo de muestreo utilizado en el lock-in PLL para este dispositivo. Se alcanza una estabilidad en frecuencia de 1.6×10^{-6} para tiempos promedios de 3 s lo cual dividido por la responsividad del dispositivo nos da un límite de detección de $\approx 50 \mu\text{g/mL}$. La responsividad puede ser aumentada disminuyendo el espesor de las paredes del microcapilar, como se puede comprobar en la ecuación 3.3. Como ejemplo, si el espesor de las paredes se reduce a $15 \mu\text{m}$, es decir $(R_0 - R_i)/R_i \sim 0.2$ se consigue aumentar la responsividad del sistema 5 veces, lo cual pone de manifiesto el potencial de este sensor y abre la puerta a nuevos avances en la miniaturización de estos dispositivos.

3.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se han estudiado los microcapilares suspendidos de sílice para ser utilizados como sensores de densidad. Una de las ventajas de estos dispositivos es que están disponibles comercialmente en diferentes formas y tamaños y son ampliamente utilizados en diversos campos. En este trabajo se han utilizado los microcapilares como resonadores huecos anclados a ambos extremos, es decir, como estructuras tipo puentes. Para la medida de la frecuencia de resonancia del capilar se utiliza un método óptico de transmisión. Este método se basa en la detección, mediante un fotodetector, de la dispersión de un haz láser enfocado cerca del perímetro en la mitad de la región suspendida del microcapilar, ya que es la zona de mayor sensibilidad al

desplazamiento del resonador como se ha demostrado con simulaciones FEM y medidas experimentales. Para detectar la vibración del microcapilar se implementó un sistema experimental utilizando una cerámica piezoeléctrica, un láser de diodo y un fotodetector. La sensibilidad del dispositivo se puede incrementar notablemente disminuyendo el tamaño del capilar, tanto en su longitud como en el grosor de sus paredes. Los resultados de este trabajo abren la puerta a un sistema de análisis basado en microcapilares mediante la miniaturización para analizar propiedades reológicas de fluidos.





REFERENCIAS

- 1 van Ruth, S. M. Methods for gas chromatography-olfactometry: a review. *Biomolecular Engineering* **17**, 121-128, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1389-0344(01)00070-3 (2001).
- 2 Deshmane, S. L., Mukerjee, R., Fan, S. & Sawaya, B. E. High-Performance Capillary Electrophoresis for Determining HIV-1 Tat Protein in Neurons. *PLOS ONE* **6**, e16148, doi:10.1371/journal.pone.0016148 (2011).
- 3 McCalley, D. V. The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: Some possible approaches for improved separations. *Journal of Chromatography A* **1217**, 858-880, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.068 (2010).
- 4 Fedosov, D. A., Noguchi, H. & Gompper, G. Multiscale modeling of blood flow: from single cells to blood rheology. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* **13**, 239-258, doi:10.1007/s10237-013-0497-9 (2014).
- 5 Cakmak, O., Ermek, E., Urey, H., Yaralioglu, G. G. & Kilinc, N. in *2013 IEEE SENSORS*. 1-4.
- 6 Ahmed, N., Nino, D. F. & Moy, V. T. Measurement of solution viscosity by atomic force microscopy. *Review of Scientific Instruments* **72**, 2731-2734, doi:10.1063/1.1368856 (2001).
- 7 Bircher, B. A. *et al.* Real-Time Viscosity and Mass Density Sensors Requiring Microliter Sample Volume Based on Nanomechanical Resonators. *Analytical Chemistry* **85**, 8676-8683, doi:10.1021/ac4014918 (2013).
- 8 Rust, P., Cereghetti, D. & Dual, J. A micro-liter viscosity and density sensor for the rheological characterization of DNA solutions in the kilo-hertz range. *Lab on a chip* **13**, 4794-4799, doi:10.1039/C3LC50857A (2013).
- 9 Eves, C., Wang, X. & Walker, S. G. Bayesian Information for Sensors. *Quality and Reliability Engineering International* **31**, 1717-1724, doi:10.1002/qre.1704 (2015).
- 10 Calleja, M., Kosaka, P. M., San Paulo, A. & Tamayo, J. Challenges for nanomechanical sensors in biological detection. *Nanoscale* **4**, 4925-4938, doi:10.1039/C2NR31102J (2012).
- 11 Smith, P. D., Young, R. C. D. & Chatwin, C. R. A MEMS viscometer for unadulterated human blood. *Measurement* **43**, 144-151, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.measurement.2009.08.011 (2010).

- 12 Linden, J., Thyssen, A. & Oesterschulze, E. Suspended plate microresonators with high quality factor for the operation in liquids. *Applied Physics Letters* **104**, -, doi:doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.4875910 (2014).
- 13 Ramos, D., Mertens, J., Calleja, M. & Tamayo, J. Photothermal self-excitation of nanomechanical resonators in liquids. *Applied Physics Letters* **92**, -, doi:doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.2917718 (2008).
- 14 Tamayo, J., Alvarez, M. & Lechuga, L. M. Digital tuning of the quality factor of micromechanical resonant biological detectors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **89**, 33-39, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4005(02)00424-0 (2003).
- 15 Etayash, H., Khan, M., Kaur, K. & Thundat, T. Microfluidic cantilever detects bacteria and measures their susceptibility to antibiotics in small confined volumes. *Nature communications* **7**, 12947 (2016).
- 16 Son, S., Grover, W. H., Burg, T. P. & Manalis, S. R. Suspended Microchannel Resonators for Ultralow Volume Universal Detection. *Analytical Chemistry* **80**, 4757-4760, doi:10.1021/ac800307a (2008).
- 17 Khan, M. F. *et al.* Online measurement of mass density and viscosity of pL fluid samples with suspended microchannel resonator. *Sensors and Actuators B: Chemical* **185**, 456-461, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.04.095 (2013).
- 18 Agache, V., Blanco-Gomez, G., Baleras, F. & Caillat, P. An embedded microchannel in a MEMS plate resonator for ultrasensitive mass sensing in liquid. *Lab on a chip* **11**, 2598-2603, doi:10.1039/C1LC20011A (2011).
- 19 Green, C. P. & Sader, J. E. Torsional frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope. *Journal of Applied Physics* **92**, 6262-6274, doi:doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.1512318 (2002).
- 20 Sader, J. E. Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope. *Journal of Applied Physics* **84**, 64-76, doi:doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.368002 (1998).
- 21 Ekinici, K. L., Karabacak, D. M. & Yakhot, V. Universality in Oscillating Flows. *Physical Review Letters* **101**, 264501 (2008).
- 22 Burg, T. P. *et al.* Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature* **446**, 1066-1069, doi:http://www.nature.com/nature/journal/v446/n7139/supinfo/nature05741_S1.html (2007).

- 23 Malvar, O. *et al.* Highly Sensitive Measurement of Liquid Density in Air Using Suspended Microcapillary Resonators. *Sensors* **15**, 7650-7657 (2015).
- 24 Polyimide Removal from Silica Fibers or Tubes.
- 25 Sanii, B. & Ashby, P. D. High Sensitivity Deflection Detection of Nanowires. *Physical Review Letters* **104**, 147203 (2010).
- 26 Allan, D. W. & Barnes, J. A. in *Thirty Fifth Annual Frequency Control Symposium. 1981.* 470-475 (IEEE).
- 27 El-Sheimy, N., Hou, H. & Niu, X. Analysis and modeling of inertial sensors using Allan variance. *IEEE Transactions on instrumentation and measurement* **57**, 140-149 (2008).
- 28 Hanay, M. S. *et al.* Single-protein nanomechanical mass spectrometry in real time. *Nature nanotechnology* **7**, 602-608, doi:10.1038/nnano.2012.119 (2012).





CAPÍTULO 4

4. Espectrómetro de Masa y Rigidez Nanomecánico: Sistema experimental

4.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se explica con detalle el espectrómetro de masa y rigidez basado en resonadores micro- y nanomecánicos implementado a lo largo del presente trabajo de tesis doctoral, el cual ha sido el pilar central de este trabajo. El sistema utiliza la conocida técnica de ionización mediante electrospray^{1,2} para nebulizar las partículas de interés y, por medio de una etapa de transferencia, guiarlas hacia el resonador, el cual actúa como elemento sensor. Comenzaremos explicando los fundamentos básicos de la técnica de ionización mediante electrospray. A continuación, se detalla cada uno de los elementos que

forman el espectrómetro de masa y rigidez, así como su evolución desde un primer prototipo hasta el sistema final utilizado para las medidas experimentales.

4.2. TÉCNICA DE IONIZACIÓN MEDIANTE ELECTROSPRAY

La técnica de ionización mediante electrospray, ESI (del inglés “*ElectroSpray Ionization*”) permite transferir a fase gas en forma de iones los solutos presentes en una solución¹. Estos iones pueden ser detectados posteriormente mediante espectrometría de masa, MS (del inglés, “*Mass Spectrometry*”). Se pueden utilizar diferentes tipos de analitos como nanopartículas de oro², polímeros³, ácidos nucleicos⁴, proteínas⁵, bacterias⁶, virus⁷, etc. La principal ventaja de esta técnica es que los analitos pueden estar presentes en forma de iones o en estado neutro. Cuando se trata de compuestos iónicos la técnica ESI permite ionizarlos mediante la asociación con uno o más iones presentes en la solución. La ESI-MS es una técnica con numerosas aplicaciones en biomedicina, bioquímica, farmacología, etc.

La combinación de ambas técnicas, ESI y MS, ha supuesto una gran revolución en el campo de la espectrometría. Prueba de ello es que en el año 2002 el químico y profesor universitario estadounidense John Fenn (profesor en la Universidad de Princeton y catedrático en la Universidad de Yale) compartió un cuarto del Premio Nobel en espectrometría de masas por sus trabajos con el ESI-MS con Koichi Tanaka (por el desarrollo del MALDI) y Kurt Wüthrich (por sus trabajos en espectroscopia NMR, del inglés “*Nuclear Magnetic Resonance*”) reconociendo la importancia de la técnica ESI. Citando a Fenn en la lectura del Nobel⁸: “*Hace unos años la idea de hacer proteínas y polímeros volar por medio de ESI parecía tan improbable como hacer que un elefante volara, pero hoy es una técnica estándar de la espectrometría de masas*”. La técnica del electrospray comenzó en los años 1960 cuando el químico norteamericano Malcolm Dole y colaboradores se interesaron en la determinación de la masa de macromoléculas mediante la espectrometría de masa. Lograron introducir un polímero de poliestireno (51000 Da) en fase gas como

especies cargadas⁹. La idea surgió mientras trabajaba como consultor¹⁰ en una compañía que se dedicaba a la pintura de coches y se interesó por el método que usaban para pintar los coches mediante pequeñas gotas conocida como electrospray. Su trabajo llegó a manos del Profesor Seymour Lipsky (Yale Medical School) que también trabajaba en espectrometría de masas. El trabajo inspiró a Fenn que era un experto en el campo del haz molecular mediante sistemas de “*nozzle-skimmer*” y comenzó una minuciosa investigación en la espectrometría de masas basada en la técnica del electrospray¹¹⁻¹³. El desarrollo de la técnica de ESI-MS es debida fundamentalmente a estas dos personas, Malcolm Dole y John Fenn.

La ESI es una técnica de ionización débil capaz de ionizar especies químicas intactas y macromoléculas por medio de múltiples cargas. La energía residual retenida por el analito es muy pequeña y, por tanto, no produce fragmentación. Además, también se conservan las interacciones no covalentes muy débiles en fase gas¹⁴. La técnica ESI es una poderosa herramienta para la producción de iones biológicos macromoleculares como proteínas y ácidos nucleicos. Su uso se está extendiendo en campos tan importantes como la proteómica, que es actualmente una de las áreas en investigación química que crece con mayor rapidez¹⁵.

En este trabajo de tesis doctoral se va un paso más allá en cuanto al tamaño de las entidades a analizar y se utiliza la técnica de ESI para nebulizar tanto partículas inorgánicas, como son las nanopartículas de oro, así como entidades biológicas macromoleculares, como bacterias⁶ *Escherichia coli*. Gracias a esta técnica es posible transferir estas “macropartículas” desde una disolución hasta nuestro transductor nanomecánico, que se encuentra en bajo vacío, sin dañarlas. A continuación, se detalla el proceso de nebulización mediante ESI.

4.2.1. CONO DE TAYLOR.

Como se puede ver en la figura 4.1 el ESI consta de una botella contenedora que alberga la disolución junto con las partículas a estudiar, un capilar afilado, que va desde el recipiente hasta la entrada del espectrómetro, un hilo conductor para aplicar alto voltaje, HV (del

inglés, “*High Voltage*”), que en nuestro caso es un hilo de cobre bañado en plata, y un tubo para aplicar presión al recipiente, P_c , y hacer fluir la disolución hasta la punta del capilar afilado. En nuestro espectrómetro el capilar afilado es de PEEK (Polietereetercetona, del inglés “*PolyEther Ether Ketone*”) que es un polímero termoplástico semicristalino muy resistente al uso y de poco desgaste, así como resistente a la mayoría de los solventes comunes. En nuestro montaje experimental, el diámetro exterior del capilar de PEEK es de $\sim 1.5\text{ mm}$, con un diámetro interior que puede ser de $25\ \mu\text{m}$, $50\ \mu\text{m}$ o $62\ \mu\text{m}$ dependiendo de la aplicación. La salida de este capilar se encuentra situada entre $10 - 30\text{ mm}$ del contraelectrodo, es decir, de la entrada al espectrómetro, el cual actúa como toma de tierra.

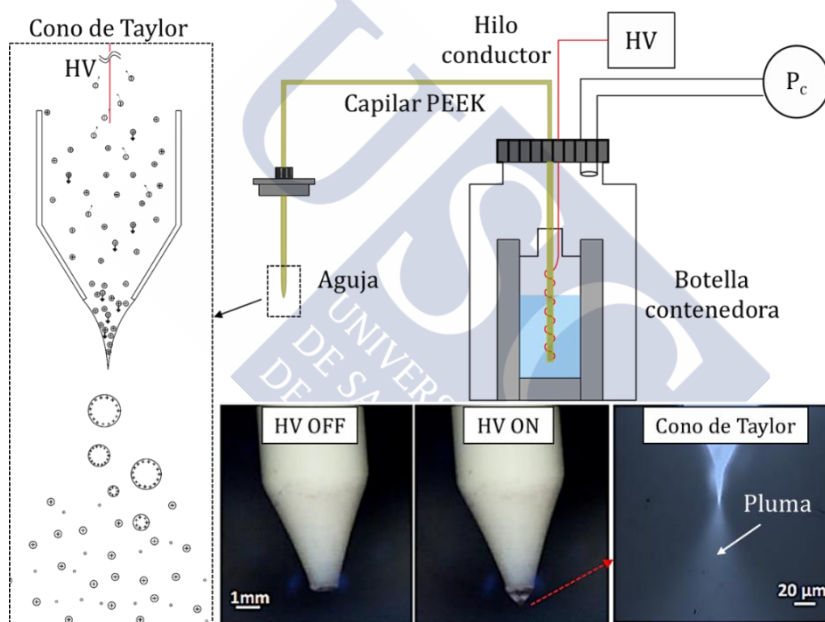


Figura 4.1. Sistema de Ionización mediante Electrospray. La disolución, con las partículas de interés, se encuentra en una botella contenedora cerrada herméticamente. Cuando se aplica una presión P_c a la botella, la disolución fluye por el capilar PEEK hacia el extremo afilado. Al aplicar un alto voltaje (HV ON, $3 - 5\text{ kV}$) se genera el cono de Taylor produciendo una pluma de microgotas cargadas, como se aprecia en la microfotografía inferior derecha.

Cuando se aplica un potencial a una solución, que sea lo suficientemente conductora, los iones positivos y negativos se moverán bajo la influencia de este campo eléctrico, creando una concentración de iones positivos cerca de la superficie del menisco y negativos lejos. Esto

creará una distorsión del menisco originando el cono de Taylor^{18,19} el cual estará dirigido hacia el contraelectrodo como se puede ver en la figura 4.1. Para generar el conocido cono de Taylor^{9,11-13} y producir la nebulización de las partículas se siguen los siguientes pasos:

- a. Se llena la botella contenedora con la disolución y las partículas de interés y se cierra herméticamente.
- b. Se aplica una presión P_c a la botella contenedora haciendo que la disolución fluya por el capilar PEEK hacia la parte afilada.
- c. Cuando aparece una gota en la punta afilada del capilar se aplica un HV 3–5 kV generando el cono de Taylor y la nebulización de las partículas.

Cuando un analito es transferido desde la solución a iones en fase gas por medio del ESI se produce una serie de procesos: a) la producción de gotas cargadas en la parte afilada del capilar del electrospray a partir del cono de Taylor, por donde se nebuliza la solución mediante una pequeña presión y un alto voltaje, b) la disminución y desintegración de las gotas cargadas debido a la evaporación del solvente, resultando en gotas cada vez más pequeñas capaces de producir iones en fase gas y, por último c) la formación de iones en fase gas a partir de las diminutas gotas cargadas.

El campo eléctrico generado en la punta del ESI, E_{ESI} , es muy elevado, del orden de $E_{ESI} = 10^6$ V/m. Una relación aproximada para calcular el valor del campo eléctrico generado entre la punta del ESI y el contraelectrodo viene dado por^{16,17},

$$E_{ESI} = \frac{2V}{r_c \ln\left(\frac{4d}{r_c}\right)} \quad (4.1)$$

donde V es el potencial aplicado, r_c es el radio exterior del capilar y d es la distancia entre la punta del capilar y el contraelectrodo. Un caso típico en este trabajo es $V = 4000$ V, $d = 10$ mm y $r_c = 1$ mm obteniendo un campo eléctrico $E_{ESI} = 2.17 \cdot 10^6$ V/m. El voltaje aplicado puede ser positivo o negativo^{11,12}. Con el fin de aumentar la reproducibilidad de los experimentos, en este trabajo de tesis doctoral se ha usado siempre un voltaje positivo para producir la nebulización de las partículas. El campo

eléctrico requerido E_{on} en el extremo del capilar necesario para la formación del cono de Taylor y la producción de gotas cargadas se puede aproximar por la siguiente ecuación¹,

$$E_{on} \approx \left(\frac{2\gamma \cos \theta}{\varepsilon_0 r_c} \right)^{1/2} \quad (4.2)$$

Y el potencial necesario,

$$V_{on} \approx \left(\frac{r_c \gamma \cos \theta}{2\varepsilon_0} \right)^{1/2} \ln \left(\frac{4d}{r_c} \right) \quad (4.3)$$

Donde $\varepsilon_0 = 8.854 \cdot 10^{-12} \text{ F/m}$ es la permitividad del vacío, γ es la tensión superficial del solvente y θ el ángulo de semiapertura del cono de Taylor^{1,18,19} ($\theta = 49.3$). Como ejemplo, la tensión superficial del agua es 0.073 N/m , obteniendo que el voltaje necesario para la formación del cono de Taylor es $V_{on} \sim 6 \text{ kV}$. Como se puede observar en la ecuación 4.3 uno de los parámetros que determinan el voltaje necesario para generar el cono de Taylor es el valor de la tensión superficial del líquido, por lo tanto, disminuyendo la tensión superficial se consigue generar el cono de Taylor con un voltaje menor. En los experimentos llevados a cabo en este trabajo de tesis doctoral usaremos un tensoactivo tipo polisorbato (Tween[®] 20), que es un tipo de detergente y emulsionante o 2-Propanol, para realizar las disoluciones, como veremos en el siguiente capítulo.

La tensión originada por los iones positivos se ve contrarrestada por la tensión superficial del líquido. Si el campo eléctrico es lo suficientemente alto aparece un fino hilo en el extremo del cono, cuya superficie está cargada con un exceso de iones positivos (ver figura 4.1, microfotografía del cono de Taylor). Este hilo se rompe en pequeñas gotas monodispersas produciendo una pluma de microgotas cargadas. Durante el proceso se produce la evaporación del solvente reduciéndose el tamaño de la gota, pero conservando la carga lo cual hace que aumente el campo eléctrico. A un tamaño dado la fuerza de repulsión entre las cargas superficiales de la gota se vuelve igual a la fuerza de la tensión superficial del líquido alcanzando el límite de Rayleigh²⁰,

$$q_{Ry} = 8\pi(\varepsilon_0 \gamma R_{Ry}^3)^{1/2} \quad (4.4)$$

Donde q_{Ry} , R_{Ry} son la carga y el radio de gota en el límite de Rayleigh. El radio sigue disminuyendo debido a la evaporación lo que produce la fisión de la gota en “gotas hijas”, también conocido como explosión coulombiana²¹ generando gotas más pequeñas. Existen dos mecanismos propuestos para explicar la formación de iones en fase gas²²⁻²⁵: el modelo de carga residual, CRM (del inglés “*Charge Residue Model*”) propuesto por Dole⁹ y el modelo de evaporación de iones, IEM (del inglés “*Ion Evaporation Model*”) propuesto por Iribarne y Thomson^{26,27}. Este proceso se repite hasta que el solvente es totalmente evaporado y, finalmente, se obtienen las partículas de interés en fase gas, las cuales son dirigidas hacia el elemento sensor del espectrómetro que en nuestro caso es un resonador nanomecánico tipo palanca, como se verá más adelante.

4.3. ESPECTRÓMETRO DE MASA Y RIGIDEZ

El espectrómetro de masa y rigidez desarrollado a lo largo de la presente tesis doctoral consta de tres etapas claramente diferenciadas que se explican con detalle a continuación. Sin embargo, inicialmente, el sistema estaba formado por dos etapas: la primera etapa se encontraba a presión atmosférica y era el lugar en el cual se nebulizaban las partículas, mientras que la segunda etapa se encontraba a 10 *mbar* y era donde estaba el resonador nanomecánico. Todas las diferentes etapas están fabricadas en aluminio. La etapa de detección, en la cual se encuentra el sensor, tiene dos ventanas para poder realizar la medida del resonador mediante la técnica de deflexión del haz, que se explica con detalle en el Apéndice A.

La figura 4.2 muestra el primer prototipo diseñado por el Dr. Eduardo Gil-Santos en el Instituto de Microelectrónica de Madrid, IMM-CSIC. En la imagen se puede observar el capilar de PEEK en la parte superior conectada a la botella contenedora y a la entrada del espectrómetro. En la campana inferior se puede ver las conexiones necesarias para realizar el vacío mediante una bomba rotatoria (Trivac E2, Oerlikon Leybold) conectada a un lateral de la campana, y el sensor de presión. Una cámara CCD (del inglés “*Charge-Coupled Device*”) es utilizada para asegurar la correcta formación del cono de Taylor. Este

primer prototipo tenía una serie de inconvenientes que se han ido solventando a lo largo de este trabajo de tesis doctoral.

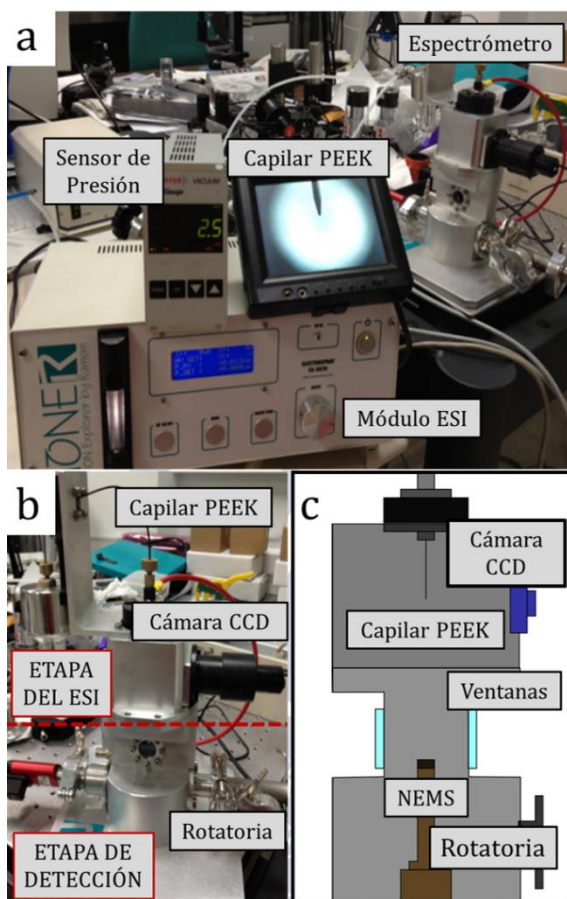


Figura 4.2. a. Fotografía general del primer prototipo del espectrómetro de masa y rigidez, donde se puede apreciar el sensor de presión, una pantalla para verificar la correcta formación del cono de Taylor mediante una cámara CCD y el módulo ESI para aplicar presión y voltaje a la solución. b. Fotografía donde se aprecian las dos etapas que conforman el espectrómetro c. Dibujo esquemático. El sistema contaba con dos campanas de vacío: la superior donde nebulizaban las partículas, etapa del ESI, y la inferior que albergaba el resonador, etapa de detección.

Uno de los problemas que presentaba era debido a la proximidad entre la fuente del electrospray y el sensor, lo cual producía que el solvente llegara sin estar completamente evaporado. Otro era la no uniformidad del flujo de partículas generadas por el espectrómetro debido a la fuerza de arrastre que sufrían las partículas, ya que la bomba de vacío estaba situada en uno de los laterales de la campana. Esto hacía

que la mayor parte de los adsorbatos no se depositara sobre el sensor, ya que seguía el flujo del aire hacia el lateral. La altura total de este primer prototipo era de 250 mm, donde 150 mm son de la etapa de detección y 100 mm de la etapa del ESI.

La imagen 4.3a muestra una fotografía en campo oscuro²⁸ con un objetivo 50x (LU Plan Fluor, AN: 0.8, Nikon) donde se aprecian nanopartículas de oro (pequeños puntos rojos) nebulizadas con el primer prototipo con restos de solvente, mientras que la figura 4.3b muestra restos de solvente y suciedad. Para realizar estos experimentos se utilizaron muestra de silicio (10 mm × 10 mm) previamente sonicadas en una disolución de piranha (3:1 de H₂O₂/H₂SO₄), aclaradas abundantemente con agua Milli-Q® y finalmente secadas bajo un flujo de N₂, comprobando bajo microscopio la correcta limpieza de las muestras antes de ser nebulizadas con el ESI.

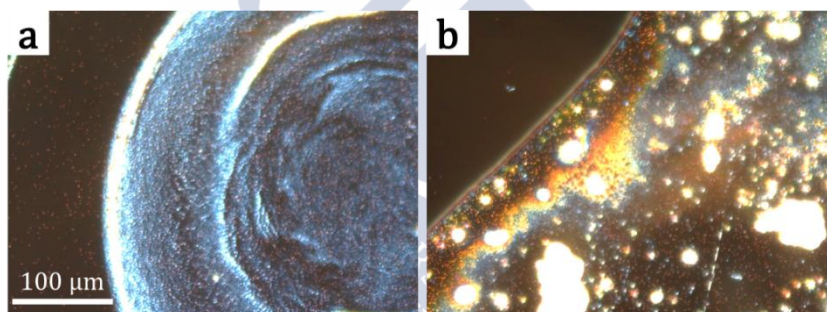


Figura 4.3. Fotografías de microscopio óptico en campo oscuro (50x) de una muestra de silicio nebulizada con el primer prototipo, donde se aprecian los restos de solvente y suciedad. **a.** Resto con forma de gota depositada con el espectrómetro donde se aprecia los restos de solvente y **b.** los restos de suciedad. Los pequeños puntos rojos corresponden a *GNPs* de 100 nm.

La disolución utilizada para estos primeros experimentos fue de 50:50 etanol/disolución de nanopartículas de oro de 100 nm de diámetro en *buffer* de citrato (Sigma-Aldrich). Para generar el cono de Taylor se aplicó una presión a la botella de $P \sim (0.050 - 0.1) \text{ mbar}$ y un alto voltaje de $V \sim 4 \text{ kV}$. Estos primeros resultados marcaron el camino para la implementación de un sistema más eficiente.

Para solucionar el problema de los restos de solvente y suciedad se introduce una nueva etapa de transferencia entre la campana del ESI y la del sensor, en la que se encuentra un capilar caliente que se encarga

de la completa evaporación del solvente y ayuda al guiado de las partículas. Por otro lado, para mejorar el flujo de partículas, se modifica la campana del sensor conectando la rotatoria por debajo del resonador y consiguiendo, de esta manera, generar un flujo uniforme y en eje. A continuación, se introduce de manera general el prototipo final del espectrómetro de masa y rigidez y, seguidamente, se describe, con mayor detalle, cada una de las partes del espectrómetro por separado.

La figura 4.4 muestra la versión mejorada del espectrómetro de masa y rigidez, el cual consta de tres etapas de vacío claramente diferenciadas⁶. La primera etapa, al igual que en el primer prototipo, se encuentra a presión atmosférica y es donde tiene lugar la nebulización de las partículas por medio de la técnica del electrospray^{1,11,29}.

De nuevo, la etapa del ESI está formada por una botella contenedora, un capilar PEEK, un módulo controlador ESI (ES3020, Ioner) y una cámara CCD (Dino Lite) que se utiliza para la visualización de la correcta formación del cono de Taylor. La segunda campana de vacío, la etapa de transferencia, se encuentra a una presión de 10 *mbar*, que se consiguen mediante una bomba de membrana (MV 2 NT Vario). En ella se encuentra un capilar caliente^{1,13,22} (Triplemass BV) que ayuda a la completa evaporación del solvente y a la transferencia de las partículas, ya que evita que las partículas se adhieran a su superficie debido a la energía adicional que proporciona el aumento de la temperatura. Y, por último, la etapa de detección, la cual alberga el sensor, que en nuestro caso es un resonador nanomecánico tipo palanca^{6,30}, como se detalla a continuación.

La etapa de detección se encuentra a una presión 0.1 *mbar* que se consigue mediante una bomba rotatoria (Oerlikon Leybold, Trivac E2). Esta etapa ha sido modificada añadiendo un módulo en la parte inferior con un orificio en el eje de simetría que contiene al sensor para, de esta manera, conseguir un flujo uniforme.

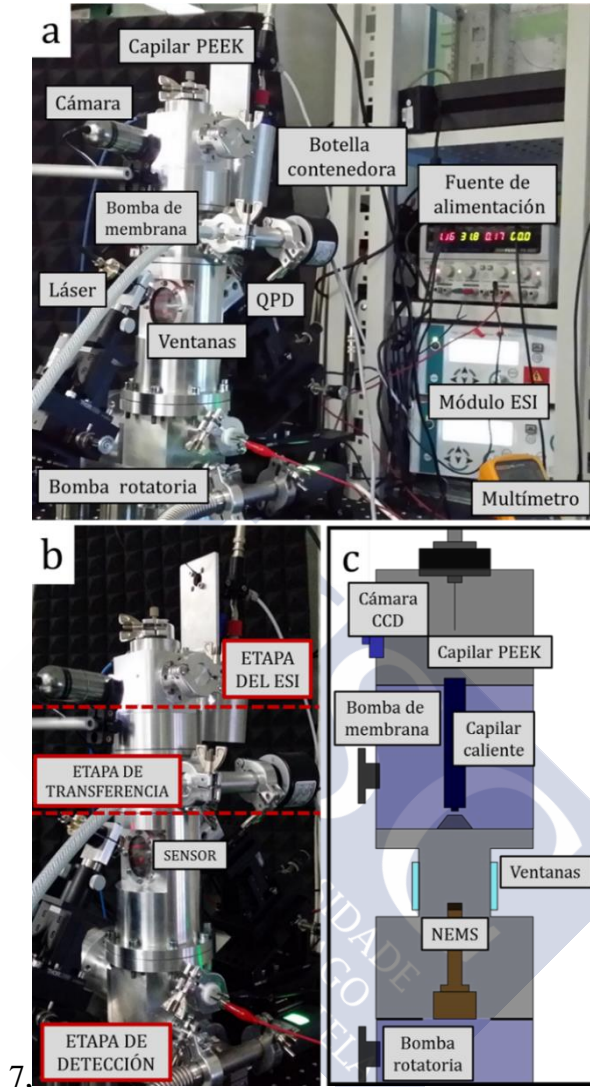


Figura 4.4. a. Fotografía general del espectrómetro. b. Fotografía del espectrómetro donde se detallan las tres campanas de vacío diferencial: etapa del ESI, etapa de transferencia y etapa de detección. c. Dibujo esquemático donde se distingue el capilar afilado PEEK, la cámara CCD, el capilar caliente, la posición del sensor (NEMS), las ventanas y las salidas de las bombas de membrana y rotatoria. Las modificaciones respecto al primer prototipo se encuentran marcadas en color azul.

A su vez, se han aumentado el tamaño de las ventanas para facilitar el alineamiento del método de transducción óptico utilizado. Su interior ha sido diseñado para albergar unos nanoposicionadores y así poder implementar un sistema de escaneo en 2D, con el que será posible la medida de matrices de resonadores y facilitar el correcto

posicionamiento del elemento sensor. La altura total del espectrómetro de masas y rigidez es de 500 mm, donde 290 mm se corresponden con la etapa de detección, 110 mm con la etapa de transferencia y 100 mm con la etapa del ESI, las cuales se describen con detalle a continuación.

4.3.1. ETAPA DEL ELECTROSPRAY

La etapa del ESI, como su propio nombre indica, contiene el módulo del electrospray. Esta etapa se encuentra a presión atmosférica y es donde tiene lugar la nebulización las partículas de interés. La imagen 4.5 muestra una fotografía de esta etapa.

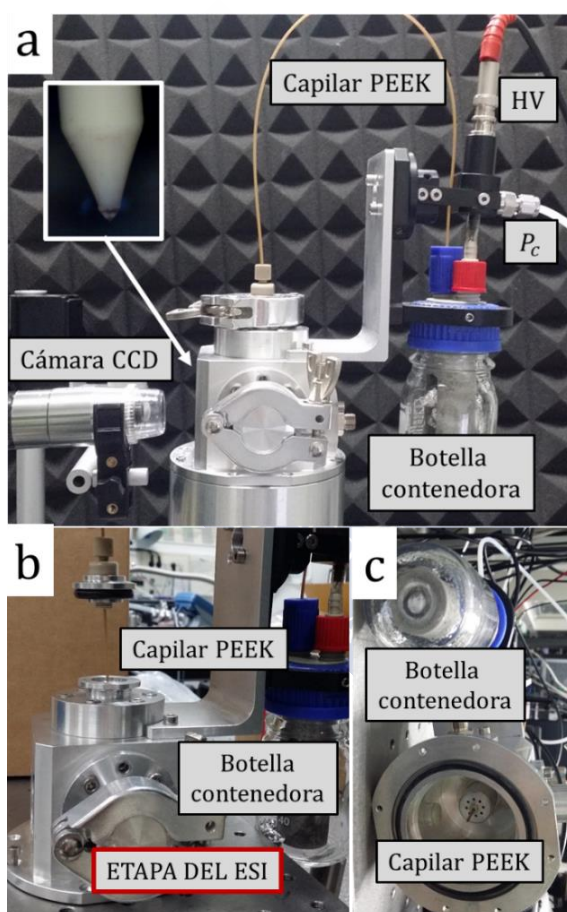


Figura 4.5. a. Fotografía general de la etapa del ESI donde se distingue el capilar PEEK, la conexión HV y P_c , así como la botella contenedora y la cámara CCD para visualizar la correcta formación del cono de Taylor. b. Fotografía de la campana ESI donde se aprecia cómo se conecta el capilar PEEK por la parte superior de la campana. c. Fotografía desde abajo donde se puede ver la punta del capilar afilado.

La etapa del ESI mide 100 mm de altura y tiene un diámetro externo de aproximadamente 100 mm. La botella contenedora (Schott, Duran Group) es de 100 mL y en su interior alberga un vial (Eppendorf) de 1.5 – 2 mL con la disolución de interés. Un hilo de cobre bañado en plata se introduce en el vial, enroscado en el capilar PEEK (ver figura 4.1), y se conecta mediante un conector BNC (del inglés “*Bayonet Neil-Concelman*”) de HV al módulo ESI (Electrospray ES-3020, Ioner). Mediante un tubo conectado a la botella se aplica una presión P_c a través del módulo ESI, como se puede ver en la figura 4.5. El capilar PEEK (SGE, Analytical Science) utilizado en este sistema va desde la botella hasta la entrada del espectrómetro de manera continua. Su longitud es de 500 mm y su diámetro interno es de 25 μm , 50 μm o 62 μm dependiendo de la aplicación. El diámetro exterior es de 1/16”, es decir, 1.58 mm aproximadamente, mientras que el diámetro exterior de la parte afilada del capilar donde se genera el cono de Taylor es de 0.4 mm, aproximadamente. La distancia entre la punta afilada del capilar PEEK y la entrada al espectrómetro, es decir, a la etapa de transferencia es de 10 – 30 mm. Cuando se aplica una presión a la botella contenedora el líquido fluye hacia la parte afilada del capilar. En el momento en el que aparece una gota de la disolución en la parte afilada, se aplica un HV y se genera el cono de Taylor. Mediante la cámara CCD se comprueba la formación y estabilidad del cono de Taylor. Las partículas nebulizadas pasan a la etapa de transferencia, donde se encuentra el capilar caliente.

4.3.2. ETAPA DE TRANSFERENCIA

A diferencia del primer prototipo, el espectrómetro implementado incluye una etapa de transmisión en la que se aloja un capilar caliente^{13,22,31,32}. El capilar caliente tiene una resistencia térmica, la cual se calienta en función de la intensidad aplicada, y un sensor de temperatura RTD (del inglés, “*Resistance Temperatura Detector*”), es decir, un sensor de tipo resistivo basado en la variación de la resistencia con la temperatura. El capilar caliente ha sido calibrado para poder controlar su temperatura a partir de la medida del valor de su resistencia. Para ello se usó un termómetro comercial (Termopar tipo K, TC Direct) y se midió la resistencia RTD con un multímetro (Fluke, 83V).

La gráfica 4.6a muestra el ajuste lineal realizado para la calibración, mientras que la figura 4.6b muestra como una fotografía del capilar caliente en donde se pueden ver las inserciones o “*insets*”. Las inserciones son tubos de metal que se introducen en el interior del capilar caliente. Además, son fácilmente reemplazables y pueden ser limpiadas con diferentes disolventes. Los diámetros interiores disponibles de las inserciones son de $400\ \mu\text{m}$ y $500\ \mu\text{m}$ y tienen una longitud total de $110\ \text{mm}$. El ajuste lineal obtenido en la gráfica de la figura 4.6a nos proporciona la temperatura a la que se encuentra el capilar en función del valor de la resistencia, la cual se monitoriza constantemente con un multímetro. La temperatura del capilar caliente en los experimentos realizados a lo largo de este trabajo está comprendida entre $170\ ^\circ\text{C}$ - $200\ ^\circ\text{C}$.

El ajuste lineal del capilar caliente viene dado por:

$$T\ (^{\circ}\text{C}) = (1.627 \pm 0.04)R - (152.9 \pm 4.5) \quad (4.5)$$

donde T es la temperatura a la que se encuentra el capilar caliente en grados Celsius y R el valor de la resistencia en ohmios medido con el multímetro.

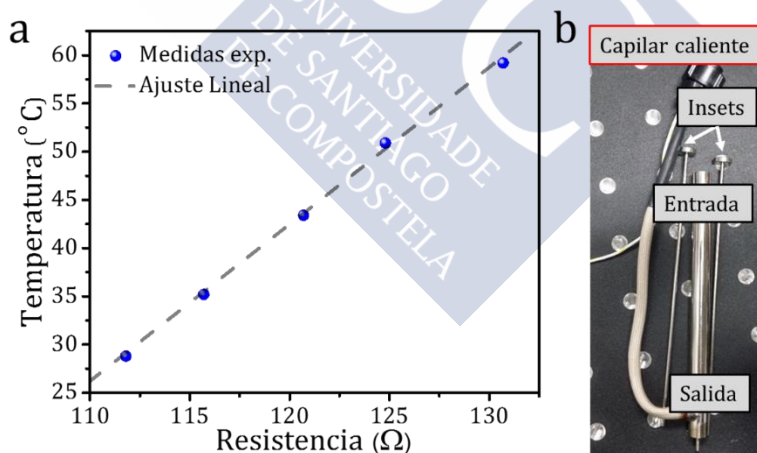


Figura 4.6. a. Calibración del capilar caliente. La gráfica muestra las medidas experimentales, así como el ajuste lineal. b. Fotografía del capilar caliente con las inserciones o “*insets*”, donde se detalla la entrada del capilar caliente, es decir, donde nebuliza las partículas y la salida hacia la etapa de detección.

El capilar caliente se conecta por medio de un pasa-muros (ver figura 4.7) a una fuente de alimentación (ISO-Tech, IPS 4303).

Dependiendo de la intensidad aplicada se consigue controlar la temperatura. El valor de la resistencia se mantiene en torno a $(190 - 220) \Omega$, mientras que el valor del voltaje e intensidad de la fuente de alimentación entorno a $(15 - 20) V$ y $(1 - 1.5) A$, respectivamente.

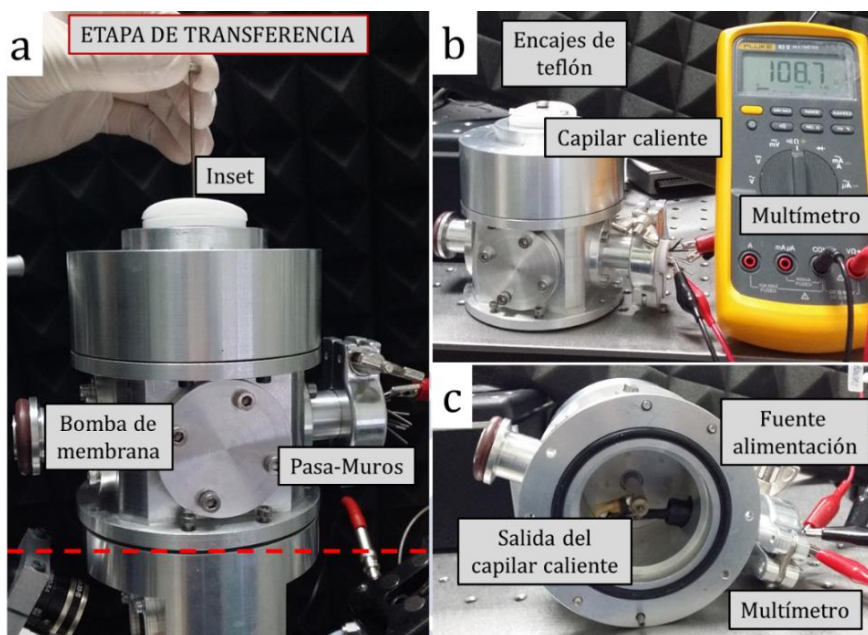


Figura 4.7. a. Fotografía general de la etapa de transferencia, donde se distingue la inserción, la salida de la bomba de membrana y el pasamuros para las conexiones eléctricas del capilar caliente. b. Fotografía lateral donde se aprecia el conector de teflón utilizado para sujetar el capilar caliente y mantenerlo en eje y el multímetro para medir la resistencia de la RTD. c. Fotografía desde abajo donde se aprecia la salida de la inserción del capilar caliente hacia la campana de detección, así como las conexiones eléctricas.

La figura 4.7a muestra una fotografía general de la etapa de transferencia. El capilar caliente se encuentra ajustado por medio de unos encajes de teflón, los cuales ayudan a aislar térmica y eléctricamente el capilar caliente del resto del sistema y lo mantiene alineado en el eje de simetría del sistema. La función del capilar caliente es ayudar a la completa evaporación del solvente, así como evitar que las partículas se queden adheridas en su interior gracias a la agitación térmica. Las partículas nebulizadas en la etapa del ESI son guiadas por medio de un gradiente de presión en el interior del capilar y pasan a la siguiente etapa del espectrómetro, es decir, a la etapa de detección, por medio de un “*skimmer*”. En la figura 4.7b se distingue el pasa-muros y las conexiones

utilizadas para medir y controlar el capilar caliente. La figura 4.7c muestra una fotografía tomada desde debajo de la campana de transferencia donde se aprecian las conexiones de la fuente de alimentación y del multímetro, así como la salida del capilar caliente hacia la siguiente etapa del espectrómetro de masa y rigidez, es decir, hacia la etapa de detección cuyo funcionamiento se detalla a continuación.

4.3.3. ETAPA DE DETECCIÓN

La etapa de detección consta de dos partes diferenciadas. La primera contiene al sensor y las ventanas y la segunda las conexiones eléctricas y de vacío. Como ya se ha mencionado, la etapa de transferencia y la de detección están conectadas mediante un “*skimmer*”^{1,9} que ayuda al guiado de las partículas hacia la última etapa del sistema. El “*skimmer*”, que tiene forma de cono truncado, consta de un orificio de entrada de 8 mm y una altura de 10 mm, y un orificio de salida de 100 μm . Está situado en el eje del capilar caliente a una distancia de 10 mm. La figura 4.8a muestra una fotografía general de la campana del sensor donde se puede apreciar el “*skimmer*”, las ventanas, las conexiones eléctricas y de vacío, así como el láser y el fotodetector utilizados para medir la frecuencia de resonancia de los resonadores mediante la técnica de deflexión del haz (*Apéndice A*). La altura total es de 290 mm, de los cuales 160 mm corresponde a la parte superior donde se aloja el sensor y 130 mm a la inferior donde se realizan las conexiones eléctricas y de vacío. El resonador se encuentra situado sobre un soporte de teflón y encima de una cerámica piezoeléctrica (*Apéndice A*), que se utiliza para excitar el resonador a sus frecuencias de resonancia³⁰ (figura 4.8b). La etapa de detección consta de unos nanoposicionadores de tres dimensiones, XYZ (ANPx101, ANPz101, ANC350, Attocube) que permite controlar el correcto posicionamiento del resonador. Bajo el sensor, y en su mismo eje, se encuentra un orificio de 30 mm de diámetro (figura 4.8c), al cual está conectado a la bomba rotatorio, generando un flujo uniforme y en eje de las partículas procedentes de la etapa de transmisión.

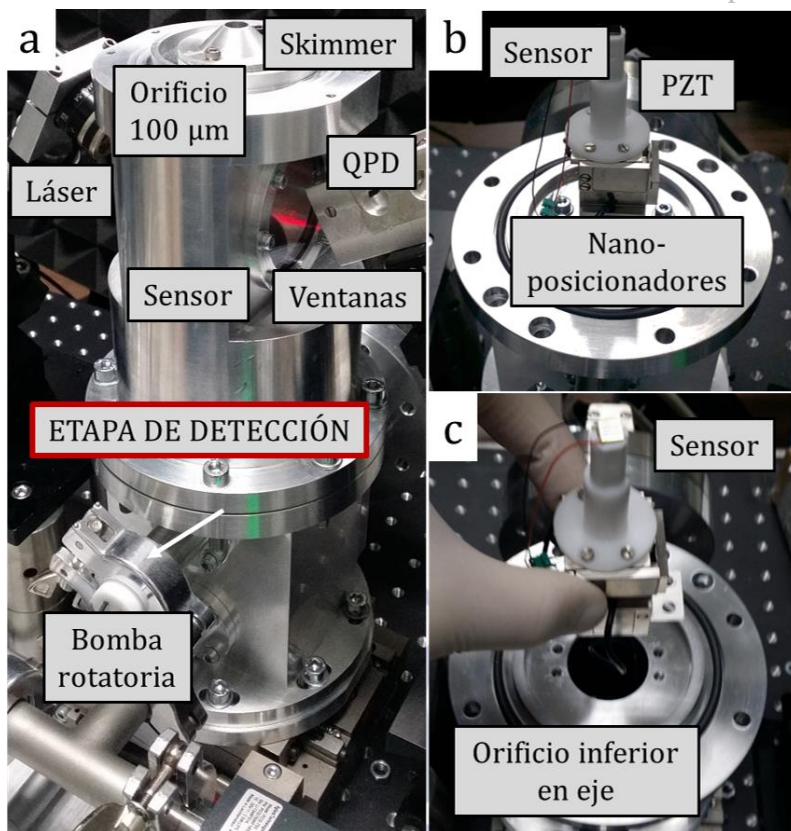


Figura 4.8. a. Fotografía general de la etapa de detección donde se distingue el “skimmer” a la entrada de la campana, el láser y el fotodetector (QPD) empleados para la medida de las frecuencias de resonancia mediante la técnica de deflexión del haz, las ventanas y las conexiones eléctricas y de vacío. b. Fotografía donde se muestra el interior de la campana con los nanoposicionadores, el sensor y una cerámica piezoeléctrica (PZT). c. Fotografía donde se aprecia el sensor y el orificio en eje.

Las ventanas tienen un recubrimiento interior de óxido de estaño de indio, ITO (del inglés “*Indium Tin Oxide*”) proporcionando a la vez conductividad eléctrica y excelente transmisión óptica en el espectro visible. La conductividad eléctrica evita interacciones con partículas cargadas conectando toda la campana a tierra. Además, las ventanas tienen que ser transparentes en el espectro visible ya que, para la medida de los resonadores, como ya se ha mencionado, se utiliza un método de transducción óptico conocido como técnica de deflexión del haz (*Apéndice A*), donde se utiliza un láser que emite en 632 nm.

4.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha descrito detalladamente el espectrómetro de masa y rigidez basado en resonadores nanomecánicos que se ha desarrollado a lo largo de este trabajo de tesis doctoral, desde un primer prototipo hasta el espectrómetro definitivo.

La espectrometría de masa convencional mide la relación carga-masa de partículas desde 100 *Da* hasta 100 *kDa* con alta precisión. Sin embargo, su rendimiento está limitado a especies pequeñas y se ve fuertemente degradada cuando se quieren caracterizar especies más grandes como macromoléculas biológicas. Para solventar este problema se han propuesto los resonadores nanomecánicos como excelentes candidatos para la medida de la masa de partículas sin necesidad de caracterizar su relación carga-masa y con un alto rango dinámico. Aunque existen otras técnicas de ionización, como la técnica MALDI, la técnica de ionización mediante electrospray (ESI) es el método más utilizado para ionizar las especies y enviarlas al detector del espectrómetro.

En este capítulo se ha detallado el funcionamiento de la técnica de ionización mediante electrospray, el cual ha sido el método de nebulización utilizado en este trabajo para enviar las partículas al resonador nanomecánico. Se ha comenzado describiendo un primer prototipo del espectrómetro nanomecánico, el cual presentaba una serie de inconvenientes que se han solventado y, finalmente se detalla el prototipo definitivo del espectrómetro de masa y rigidez, que consta de tres etapas claramente diferenciadas. La primera parte del espectrómetro es la etapa del electrospray, la cual se encarga de la nebulización de las partículas de interés por medio de la técnica ESI. A continuación, la etapa de transferencia, que contiene un capilar caliente, el cual se encarga de la completa evaporación del solvente, así como a la transmisión eficiente de los analitos a la última etapa, es decir, la etapa de detección. Esta etapa contiene el elemento sensor, en nuestro caso un resonador nanomecánico tipo palanca, así como una cerámica piezoeléctrica utilizada para excitar el resonador, unas ventanas y unos nanoposicionadores para su correcto posicionamiento.

REFERENCIAS

- 1 Cole, R. B. *Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications*. (John Wiley & Sons, 2011).
- 2 Naik, A. K., Hanay, M. S., Hiebert, W. K., Feng, X. L. & Roukes, M. L. Towards single-molecule nanomechanical mass spectrometry. *Nature nanotechnology* **4**, 445-450, doi:10.1038/nnano.2009.152 (2009).
- 3 Murgasova, R. & Hercules, D. M. Polymer characterization by combining liquid chromatography with MALDI and ESI mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **373**, 481-489, doi:10.1007/s00216-002-1332-9 (2002).
- 4 Nordhoff, E., Kirpekar, F. & Roepstorff, P. Mass spectrometry of nucleic acids. *Mass spectrometry reviews* **15**, 67-138 (1996).
- 5 Hanay, M. S. *et al.* Single-protein nanomechanical mass spectrometry in real time. *Nature nanotechnology* **7**, 602-608, doi:10.1038/nnano.2012.119 (2012).
- 6 Malvar, O. *et al.* Mass and stiffness spectrometry of nanoparticles and whole intact bacteria by multimode nanomechanical resonators. *Nature communications* **7**, 13452 (2016).
- 7 Bothner, B. & Siuzdak, G. Electrospray Ionization of a Whole Virus: Analyzing Mass, Structure, and Viability. *ChemBioChem* **5**, 258-260, doi:10.1002/cbic.200300754 (2004).
- 8 Fenn, J. B. Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition* **42**, 3871-3894 (2003).
- 9 Dole, M. Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics* **49**, 2240, doi:10.1063/1.1670391 (1968).
- 10 Dole, M. *My Life in the Golden Age of America*. (Vantage Pr, 1989).
- 11 Yamashita, M. & Fenn, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry* **88**, 4451-4459, doi:10.1021/j150664a002 (1984).
- 12 Yamashita, M. & Fenn, J. B. Negative ion production with the electrospray ion source. *The Journal of Physical Chemistry* **88**, 4671-4675, doi:10.1021/j150664a046 (1984).
- 13 Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M. & Fenn, J. B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Analytical Chemistry* **57**, 675-679, doi:10.1021/ac00280a023 (1985).

- 14 Przybylski, M. & Glocker, M. O. Electrospray Mass Spectrometry of Biomacromolecular Complexes with Noncovalent Interactions—New Analytical Perspectives for Supramolecular Chemistry and Molecular Recognition Processes. *Angewandte Chemie International Edition in English* **35**, 806-826, doi:10.1002/anie.199608061 (1996).
- 15 Domon, B. & Aebersold, R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science* **312**, 212-217, doi:10.1126/science.1124619 (2006).
- 16 Loeb, L. B., Kip, A. F., Hudson, G. G. & Bennett, W. H. Pulses in Negative Point-to-Plane Corona. *Physical Review* **60**, 714-722 (1941).
- 17 Hendricks, J. C. D. & Pfeifer, R. J. Parametric studies of electrohydrodynamic spraying. *AIAA Journal* **6**, 496-502, doi:10.2514/3.4525 (1968).
- 18 Taylor, G. I. & McEwan, A. D. The stability of a horizontal fluid interface in a vertical electric field. *Journal of Fluid Mechanics* **22**, 1-15, doi:doi:10.1017/S0022112065000538 (1965).
- 19 Taylor, G. Disintegration of Water Drops in an Electric Field. *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **280**, 383-397, doi:10.1098/rspa.1964.0151 (1964).
- 20 Rayleigh, L. XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **14**, 184-186 (1882).
- 21 Mason, P. E. *et al.* Coulomb explosion during the early stages of the reaction of alkali metals with water. *Nat Chem* **7**, 250-254, doi:10.1038/nchem.2161
<http://www.nature.com/nchem/journal/v7/n3/abs/nchem.2161.html#supplementary-information> (2015).
- 22 Kebarle, P. & Verkerk, U. H. Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrometry Reviews* **28**, 898-917, doi:10.1002/mas.20247 (2009).
- 23 Znamenskiy, V., Marginean, I. & Vertes, A. Solvated Ion Evaporation from Charged Water Nanodroplets. *The Journal of Physical Chemistry A* **107**, 7406-7412, doi:10.1021/jp034561z (2003).
- 24 Whitehouse, C. M., Dreyer, R., Yamashita, M. & Fenn, J. Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71 (1989).
- 25 Kebarle, P. & Peschke, M. On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Analytica Chimica Acta* **406**, 11-35, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00598-X (2000).

- 26 Iribarne, J. & Thomson, B. On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics* **64**, 2287-2294 (1976).
- 27 Thomson, B. & Iribarne, J. Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *The Journal of Chemical Physics* **71**, 4451-4463 (1979).
- 28 Pini, V. *et al.* Spatially multiplexed dark-field microspectrophotometry for nanoplasmonics. *Scientific reports* **6**, 22836, doi:10.1038/srep22836 (2016).
- 29 Banerjee, S. & Mazumdar, S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International journal of analytical chemistry* **2012**, 282574, doi:10.1155/2012/282574 (2012).
- 30 Tamayo, J., Kosaka, P. M., Ruz, J. J., San Paulo, A. & Calleja, M. Biosensors based on nanomechanical systems. *Chemical Society Reviews* **42**, 1287-1311, doi:10.1039/C2CS35293A (2013).
- 31 Fenn, J., Mann, M., Meng, C., Wong, S. & Whitehouse, C. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71, doi:10.1126/science.2675315 (1989).
- 32 Chen, P. Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry in High-Throughput Screening of Homogeneous Catalysts. *Angewandte Chemie International Edition* **42**, 2832-2847, doi:10.1002/anie.200200560 (2003).



CAPÍTULO 5

5. Espectrometría de Masa y Rigidez Nanomecánica de Nanopartículas y Bacterias

5.1. INTRODUCCIÓN

La identificación de especies es un problema fundamental en diversos campos como la química, biología, medicina, etc. La espectrometría de masas convencional identifica especies por su relación carga-masa con una gran sensibilidad^{1,2} ($< 10^{-24} g$) pero está limitada a analitos muy pequeños ($< 10^{-19} g$) y por lo tanto posee un bajo rango dinámico, desde $100 Da$ a $100 KDa$, donde $1 Da = 1.66054 \cdot 10^{-24} g$ es la unidad de masa atómica. Además, su rendimiento decrece significativamente para grandes entidades, como es el caso de nanoestructuras y entidades biológicas macromoleculares. En estos

casos, la espectrometría convencional fragmenta de manera sucesiva los analitos mediante diversos métodos de disociación, lo que produce un patrón espectral en masa muy complejo y difícil de interpretar. Los resonadores nanomecánicos, como los tipo palanca o puentes^{3,4}, han demostrado su gran potencial como sensores de masa⁵⁻⁹ ya que poseen una gran sensibilidad ($\sim Da$) y un amplio rango dinámico, permitiendo la caracterización tanto de nanoestructuras¹⁰ como de complejos macromoleculares biológicos¹¹.

En este último capítulo se introducen los fundamentos básicos de la espectrometría de masa y rigidez basada en resonadores nanomecánicos. Para ello se comenzará describiendo la teoría de la espectrometría nanomecánica y cómo la masa y la rigidez de los analitos afectan a la frecuencia de resonancia del resonador. A continuación, se describen los efectos de borde del adsorbato, así como la forma de adsorción y cómo esto afecta a la rigidez total del sistema modificando el cambio relativo en la frecuencia de resonancia. Para calcular la posición de adsorción, la masa y la rigidez de las partículas depositadas en el resonador mediante el espectrómetro, se desarrolla un algoritmo para realizar el desacoplo de la masa, rigidez y posición de adsorción a partir de los cambios relativos en la frecuencia de resonancia de varios modos de oscilación. Finalmente, se muestran los experimentos realizados con nanopartículas de oro de 100 nm de diámetro y con bacterias *Escherichia coli*, siendo esta la primera vez que se mide, de manera simultánea, la masa y la rigidez de partículas individuales y bacterias mediante espectrometría nanomecánica.

5.2. TEORÍA DE LA ESPECTROMETRÍA NANOMECÁNICA

El principio físico de la espectrometría nanomecánica se basa en que cuando una partícula es adsorbida en la superficie de un resonador, su frecuencia de resonancia cambia, y este cambio está relacionado con la rigidez y la masa, tanto del adsorbato como del resonador, así como con la posición de adsorción. Por tanto, si tenemos perfectamente calibrado el resonador, podremos obtener la masa y rigidez del adsorbato.

Como se vio en el *capítulo 1*, la energía cinética y potencial de un resonador tipo palanca vienen dadas por las ecuaciones 1.48 y 1.49. Utilizando la ecuación de los modos de vibración flexurales (ecuación 1.69) e integrando a lo largo de la longitud de la palanca, obtenemos la energía cinética, T_0 , y la energía de deformación o potencial, U_0 , antes de producirse la adsorción, como:

$$T_0 = \frac{1}{2} A_n^2 m_c \omega_{n0}^2 \cos^2(\omega_{n0} t) \quad (5.1)$$

$$U_0 = \frac{1}{24} A_n^2 E_c V_c h_c^2 \left(\frac{\beta_n}{L_c} \right)^4 \cos^2(\omega_{n0} t) \quad (5.2)$$

Donde A_n , ω_{n0} y β_n son la amplitud, la frecuencia angular y el autovalor correspondiente al modo de vibración n , respectivamente. E es el módulo de Young, V el volumen y h el espesor. El subíndice c hace referencia al resonador, que en nuestro caso es una micropalanca, y el subíndice 0 hace referencia a antes de producirse la adsorción. Destacar que, como se trata de un movimiento armónico, el valor medio de la energía cinética varía con el cuadrado de la frecuencia mientras que el valor medio de la energía potencial o de deformación no depende de la frecuencia. Definimos el valor medio de la energía cinética efectiva como $\langle \tilde{T} \rangle = \frac{\langle T \rangle}{\omega_{n0}^2}$ y utilizando el método de Rayleigh-Ritz^{12,13} obtenemos que:

$$\omega^2 = \frac{\langle U \rangle}{\langle \tilde{T} \rangle} \quad (5.3)$$

Durante el movimiento del resonador, el valor medio de la energía cinética y potencial deben ser iguales. Esta igualdad (ecuación 5.3) nos proporciona el valor de la frecuencia de resonancia del sistema y nos permite explicar, de una manera sencilla, el principio físico del efecto que tiene la adsorción de partículas sobre el resonador. Para ello supongamos una partícula con masa, pero sin rigidez, que es adsorbida en el resonador. Al no tener rigidez, la energía potencial no se modifica. Por lo tanto, para mantener el valor medio de la energía cinética, la frecuencia de resonancia debe disminuir debido al aumento en la masa total del sistema. Por otro lado, supongamos ahora que una partícula sin

masa, pero con rigidez, es adsorbida sobre la superficie del resonador. Esto provocará un aumento en la energía potencial, debido al sobrecoste energético necesario para doblar el adsorbato durante la oscilación del resonador. Para mantener el balance entre la energía potencial y cinética del sistema, ya que la partícula no tiene masa, la frecuencia de resonancia debe aumentar.

Supongamos ahora que se produce una adsorción de una partícula pequeña sobre el resonador y, por tanto, se produce una pequeña variación en la energía cinética y potencial, lo que implica cambios en la frecuencia de resonancia. De tal manera que podemos escribir la frecuencia, energía cinética y potencial después de la adsorción como:

$$\begin{aligned}\omega_n &= \omega_{n0} + \Delta\omega_n \\ \langle U \rangle &= \langle U_0 \rangle + \Delta\langle U \rangle \\ \langle \tilde{T} \rangle &= \langle \tilde{T}_0 \rangle + \Delta\langle \tilde{T} \rangle\end{aligned}\quad (5.4)$$

Utilizando la ecuación 5.3, el cambio relativo de la frecuencia angular debido a una adsorción sobre la superficie del resonador para pequeñas perturbaciones se puede aproximar por,

$$\frac{\Delta\omega_n}{\omega_{n0}} \approx \frac{1}{2} \frac{\omega_n^2 - \omega_{n0}^2}{\omega_{n0}^2} \quad (5.5)$$

Y utilizando las ecuaciones 5.4 tenemos,

$$\frac{\Delta\omega_n}{\omega_{n0}} \approx \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta\langle U \rangle}{\langle U_0 \rangle} - \frac{\Delta\langle \tilde{T} \rangle}{\langle \tilde{T}_0 \rangle} \right) \quad (5.6)$$

Por lo tanto, el cambio relativo debido a una adsorción viene dado por el balance entre la variación relativa del promedio de la energía de deformación y cinética efectiva. Es decir, un aumento en la energía cinética, por ejemplo, debido a una masa, produce una disminución en la frecuencia mientras que un aumento de la energía de deformación, por ejemplo, debido a una partícula que aporte rigidez al sistema, produce un aumento en la frecuencia.

Supongamos que se adhiere un adsorbato sobre la superficie del resonador. La variación de la energía cinética debida al adsorbato se puede escribir como:

$$\Delta\langle\tilde{T}\rangle = \frac{1}{2} \int_a \rho_a A_a^2 \psi_n^2(x) dV \quad (5.7)$$

Donde el subíndice a hace referencia al adsorbato. Usando la aproximación de que la forma del modo no cambia¹⁴⁻¹⁶, la cual es válida para adsorbatos pequeños en comparación con el tamaño del resonador, podemos escribir el cambio relativo en energía cinética como:

$$\frac{\Delta\langle\tilde{T}\rangle}{\langle\tilde{T}_0\rangle} = \frac{\rho_a}{m_c} \int_a \psi_n^2(x) dV \quad (5.8)$$

Para el caso del cambio relativo de la energía media de deformación o energía potencial, hay que tener en cuenta el cambio en el eje neutro debido a la rigidez del adsorbato (ver figura 5.1), por tanto, la variación de la energía de deformación no depende solamente del adsorbato, sino también de la variación que se produce en el interior de la palanca.



Figura 5.1. Cambio en el eje neutro debido a un adsorbato depositado en la superficie de la micropalanca. El eje neutro permanece inalterado, salvo en la zona donde se ha producido la adsorción, la cual se desplaza hasta la nueva posición $z = h_n$.

Para calcular la nueva posición del eje neutro, igualamos a cero las tensiones longitudinales a lo largo de la palanca, lo que implica que se deba cumplir la siguiente relación¹⁷:

$$E_c \int_{-\frac{h_c}{2}}^{\frac{h_c}{2}} (z - h_n) dz + E_a \int_{\frac{h_c}{2}}^{\frac{h_c}{2} + h_a} (z - h_n) dz = 0 \quad (5.9)$$

Obteniendo fácilmente la nueva posición del eje neutro como:

$$h_n = \frac{E_a h_a (h_a + h_c)}{2(E_a h_a + E_c h_c)} \quad (5.10)$$

Por tanto, el valor promedio de la variación de energía de deformación, suponiendo que tanto el resonador como el adsorbato están constituidos por materiales isótropos y homogéneos, viene dado por:

$$\Delta\langle U \rangle = \frac{A_n^2 E_a h_a (E_a h_a^3 + E_c h_c (4h_a^2 + 6h_a h_c + 3h_c^2))}{24(E_a h_a + E_c h_c)} \int_a \left(\frac{\partial^2 \psi_n(x)}{\partial x^2} \right)^2 dS \quad (5.11)$$

Usando la ecuación 5.2 podemos escribir el cambio relativo del valor promedio de la energía potencial como,

$$\frac{\Delta\langle U \rangle}{\langle U_0 \rangle} = \frac{E_a h_a (E_a h_a^3 + E_c h_c (4h_a^2 + 6h_a h_c + 3h_c^2))}{E_c V_c h_c^2 (E_a h_a + E_c h_c)} \left(\frac{L_c}{\beta_n} \right)^4 \int_a \left(\frac{\partial^2 \psi_n(x)}{\partial x^2} \right)^2 dS \quad (5.12)$$

Estas fórmulas son válidas tanto para adsorbatos tipo capa plana, que cubran toda la superficie de la palanca, como para adsorbatos puntuales. Para el caso de una capa homogénea tenemos que la integral de volumen de la forma del modo al cuadrado del adsorbato viene dada por $\int_a \psi_n^2(x) dV = V_a$, mientras que la integral de superficie del cuadrado de la curvatura es $\int_a \left(\frac{\partial^2 \psi_n(x)}{\partial x^2} \right)^2 dS = \frac{b_c \beta_n^4}{L_c^2}$ y, por tanto, podemos escribir el cambio relativo en frecuencia debido a una capa homogénea depositada sobre toda la superficie del resonador como¹⁷:

$$\frac{\Delta\omega_n}{\omega_{n0}} = -\frac{1}{2} \frac{m_a}{m_c} + \frac{E_a h_a (E_a h_a^3 + E_c h_c (4h_a^2 + 6h_a h_c + 3h_c^2))}{E_c h_c^3 (E_a h_a + E_c h_c)} \quad (5.13)$$

La ecuación 5.13 se puede aproximar para el caso de capas delgadas comparadas con el espesor de la palanca y con módulo de Young mucho menor que el de la palanca, como es el caso de los materiales biológicos, por la siguiente expresión más compacta y elegante^{3,4}:

$$\frac{\Delta\omega_n}{\omega_{n0}} \approx -\frac{1}{2} \frac{m_a}{m_c} + \frac{3}{2} \frac{E_a h_a}{E_c h_c} \quad (5.14)$$

En el espectrómetro de masa y rigidez desarrollado en este trabajo de tesis doctoral, las entidades depositadas sobre el resonador son partículas individuales y lo suficientemente pequeñas para considerar que la forma del modo de vibración no se ve afectada. Por tanto, podemos escribir que la integral de volumen de la forma del modo al cuadrado viene dada por $\int_a \psi_n^2(x) dV \approx \psi_n^2(x_0) V_a$, mientras que la integral de superficie de la curvatura al cuadrado es $\int_a \left(\frac{\partial^2 \psi_n(x)}{\partial x^2}\right)^2 dS \approx \left(\frac{\partial^2 \psi(x_0)}{\partial x^2}\right)^2 b_a L_a$ donde x_0 es la posición de adsorción de la partícula. Finalmente, podemos escribir el cambio relativo en frecuencia de resonancia debido a la adsorción de partículas puntuales sobre la superficie del resonador como:

$$\frac{\Delta\omega_n}{\omega_{n0}} = -\frac{1}{2} \frac{m_a}{m_c} \psi_n^2(x_0) + \frac{E_a V_a (E_a h_a^3 + E_c h_c (4h_a^2 + 6h_a h_c + 3h_c^2))}{2E_c V_c h_c^2 (E_a h_a + E_c h_c)} \left(\frac{L_c}{\beta_n}\right)^4 \left(\frac{\partial^2 \psi(x_0)}{\partial x^2}\right)^2 \quad (5.15)$$

Al igual que para el caso de capas delgadas se puede aproximar la ecuación 5.15 para adsorbatos cuyo espesor y módulo de Young son menores que los de la palanca, obteniendo que el cambio relativo en frecuencia para partículas individuales viene dado por^{16,18}:

$$\frac{\Delta\omega_n}{\omega_{n0}} = -\frac{1}{2} \frac{m_a}{m_c} \psi_n^2(x_0) + \frac{3E_a V_a}{2E_c V_c} \left(1 + 2\eta + \frac{4}{3}\eta^2\right) \left(\frac{L_c}{\beta_n}\right)^4 \left(\frac{\partial^2 \psi(x_0)}{\partial x^2}\right)^2 \quad (5.16)$$

Donde se ha definido el parámetro η , que da cuenta de la relación entre el espesor del adsorbato y el espesor de la palanca, como:

$$\eta = \frac{h_a}{h_c} \quad (5.17)$$

Como se puede ver en la ecuación 5.16 el cambio relativo en la frecuencia de resonancia de un resonador debido a la adsorción de una partícula puntual es debido a dos términos: el término de masa, que es proporcional a la forma del modo al cuadrado y el término de rigidez, que es proporcional a la curvatura del modo al cuadrado. El término de masa contribuye de manera negativa mientras que el de rigidez lo hace de manera positiva al cambio de frecuencia. Una implicación directa es que el efecto de masa en la frecuencia de resonancia se incrementa cuando la adsorción se produce en regiones de la palanca en las cuales la

amplitud del modo de oscilación es mayor (mayor energía cinética), mientras que el efecto de rigidez es mayor si la adsorción se produce en regiones donde la curvatura de la palanca es mayor (mayor energía potencial) como se puede ver en la figura 5.2.

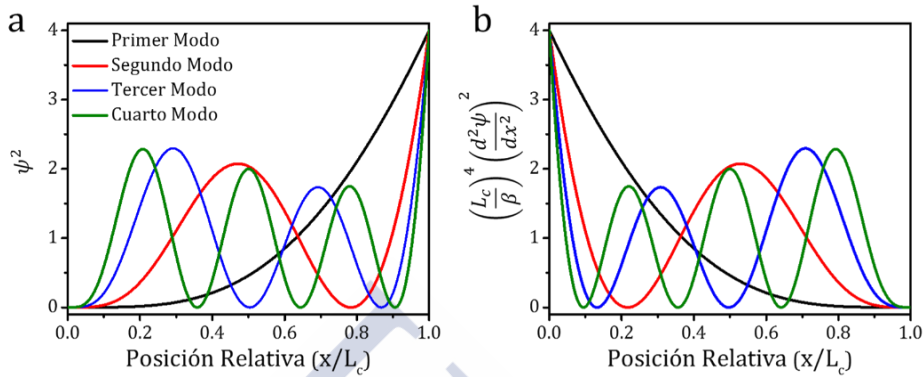


Figura 5.2. **a.** Amplitud normalizada del modo al cuadrado (término proporcional al efecto de masa) y **b.** curvatura normalizada del modo al cuadrado (término proporcional al efecto de rigidez) para el primer (negro), segundo (rojo), tercer (azul) y cuarto (verde) modo flexural de vibración. El efecto de masa es proporcional a la forma del modo al cuadrado mientras que el efecto de rigidez es proporcional al cuadrado de la curvatura del modo.

La figura 5.2 muestra dos gráficas en las cuales se representa el cuadrado de la forma del modo: $\psi_n^2(x_0)$ (figura 5.2a) y el término $\left(\frac{L_c}{\beta_n}\right)^4 \left(\frac{\partial^2 \psi(x_0)}{\partial x^2}\right)^2$ (figura 5.2b), proporcional a la curvatura del modo al cuadrado, para los primeros cuatro modos flexurales de vibración de una resonador tipo palanca. El primero nos da información sobre el término de masa y el segundo sobre el término de rigidez. Por ejemplo, el primer modo flexural (línea negra) es más sensible a la masa en la región próxima al extremo libre ($x = L_c$) mientras que cerca del extremo anclado ($x = 0$) es la zona más sensible a la rigidez del adsorbato.

5.2.1. EFECTOS DE BORDE Y ÁNGULO DE ADSORCIÓN

Como hemos visto, la adsorción de una partícula sobre la superficie del resonador tiene dos efectos contrapuestos en la frecuencia de resonancia: mientras que el efecto de masa hace que la frecuencia de resonancia disminuya, el efecto de rigidez hace que la frecuencia de resonancia aumente. En la ecuación 5.16 descrita anteriormente no se

han tenido en cuenta varios efectos importantes que han sido estudiados en profundidad por el Dr. José Jaime Ruz en el laboratorio de Bionanomecánica en el Instituto de Microelectrónica de Madrid, IMM-CSIC, durante la realización de su tesis doctoral¹⁹ y que se resumen a continuación sin entrar en mucho detalle sobre su desarrollo teórico.

Uno de los efectos más importantes a tener en cuenta es la relajación de los bordes del adsorbato y cómo esto afecta al término de rigidez. Hasta ahora se ha considerado el adsorbato como una extensión de la palanca en la dirección z , pero con otra densidad y otro módulo de Young y siendo la deformación del adsorbato la misma que sufre la palanca (ver figura 5.1). Sin embargo, para adsorbatos reales, como es obvio, los bordes están libres de deformarse y pueden liberar parte de la tensión producida por la deflexión de la palanca. Para estudiar con mayor precisión cómo afectan los efectos de borde sobre la frecuencia de resonancia se ha llevado a cabo un estudio en 2D. Debido a que los bordes del adsorbato están libres de deformarse liberan parte de la tensión producida por la deflexión de la palanca, haciendo que la deformación del adsorbato sea menor y, por lo tanto, el coste energético se reduzca considerablemente, produciendo que el cambio relativo en la frecuencia de resonancia, debido al término de rigidez, se sobreestime. Supongamos un adsorbato alargado orientado según el eje largo de la palanca, como el de la figura 5.3. Cuando la palanca se deforma lo hace también el adsorbato. Sin embargo, la deformación que sufre el adsorbato en los bordes es distinta que la que sufre en el centro¹⁶.

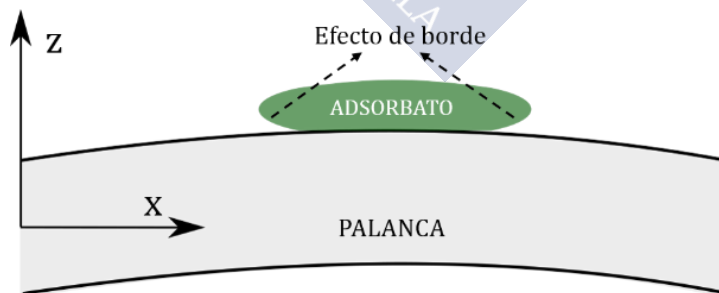


Figura 5.3. Representación gráfica de los efectos de borde. Como se puede ver, los bordes están libres de deformarse. Esto se traduce en que los efectos de rigidez son menores en los extremos del adsorbato.

La contribución del término de rigidez al cambio relativo en la frecuencia de resonancia debe ser modificada de la siguiente manera:

$$\frac{\Delta f}{f_0} = \frac{K}{2} (p(\eta) - g(\lambda_a, \eta)) \quad (5.18)$$

Donde K está relacionada con la curvatura de la forma del modo (ver ecuación 5.16) como:

$$K = \frac{E_a S_a L_c^4 (\psi_n''(x_0))^2}{E_c S_c \beta_n^4} \quad (5.19)$$

Donde $S_a = L_a h_a$ y $S_c = L_c h_c$ son el área del adsorbato y de la palanca, respectivamente, mientras que $p(\eta)$ es el término descrito en la ecuación 5.16, es decir:

$$p(\eta) = 3 + 6\eta + 4\eta^2 \quad (5.20)$$

El nuevo término que da cuenta de los efectos de borde tiene la siguiente forma^{16,19}:

$$g(\lambda_a, \eta) = \frac{B(\eta) \tanh\left(\frac{p(\eta)\lambda_a}{B(\eta)}\right)}{\lambda_a} \quad (5.21)$$

Siendo λ_a el coeficiente entre la longitud y el espesor del adsorbato:

$$\lambda_a = \frac{L_a}{h_a} \quad (5.22)$$

Las funciones $p(\eta)$ y $B(\eta)$ dependen de la forma del adsorbato¹⁶. Mientras que para el caso de un rectángulo en 2D la función $p(\eta)$ viene dada por la ecuación 5.20, para calcular el valor de $B(\eta)$ se ha realizado un estudio mediante simulaciones por elementos finitos obteniendo que $B(\eta) \approx 5.45 + 13.92\eta + 10.53\eta^2$.

Al introducir esta corrección, el cambio en frecuencia debido al término de rigidez ya no depende solamente del parámetro η sino que ahora también depende del parámetro λ_a . Cuando λ_a es muy pequeño, el cambio debido a la rigidez también será muy pequeño pudiendo

despreciarse^{15,20,21}. Sin embargo, para adsorbatos tipo capa delgada en los que su espesor es despreciable frente a su extensión, es decir, para λ_a grandes, el segundo término de la ecuación 5.18 tiende a cero y el cambio en frecuencia debido a la rigidez se puede aproximar por el término que corresponde a la rigidez de la ecuación 5.16. Es en la zona intermedia, donde se encuentran la mayoría de las entidades biológicas individuales, en la cual este nuevo término, que tiene en cuenta los efectos de borde, cobra mayor importancia.

Otro parámetro importante que modifica el cambio relativo en frecuencia debido al término de rigidez, para adsorbatos que no presentan simetría esférica o circular, es el ángulo de adsorción con respecto al resonador, α , como se puede ver en la figura 5.4. Para tener en cuenta este parámetro es necesario realizar una extensión en 3D del modelo descrito anteriormente.

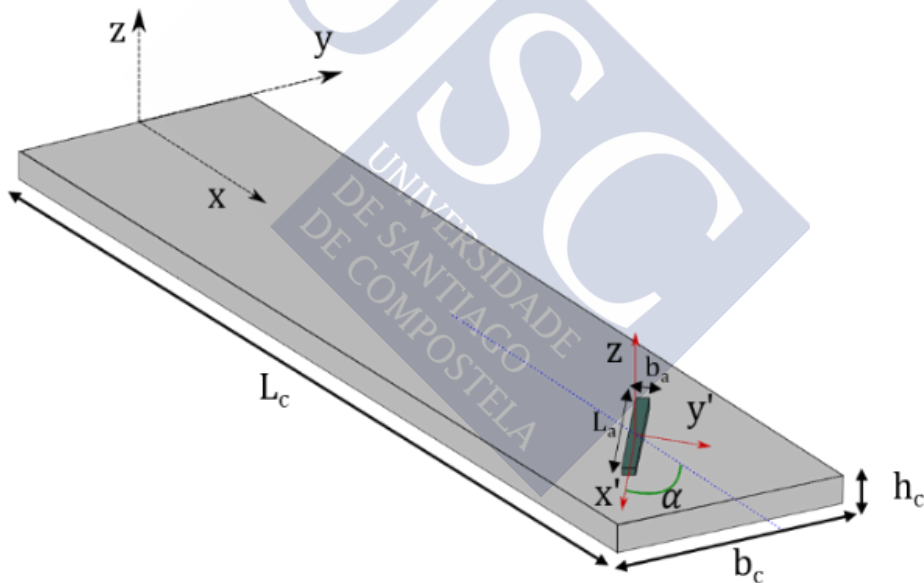


Figura 5.4. Dibujo esquemático donde se representa un adsorbato con forma rectangular con longitud L_a , altura h_a y anchura b_a en la superficie de un resonador tipo palanca de longitud L_c , altura h_c y anchura b_c , orientado con un ángulo α con respecto al eje x , de la palanca.

Para recalcar la importancia de ángulo de adsorción, supongamos un adsorbato con forma de paralelepípedo de longitud L_a , anchura b_a y espesor h_a , como se muestra en la figura 5.4. Si la adsorción se produce

de forma longitudinal a la palanca, los bordes del adsorbato son pequeños en comparación con su extensión a lo largo del eje de la palanca, por tanto λ_a será grande y el término $g(\lambda_a, \eta)$ pequeño, es decir, los efectos de borde serán despreciables. Sin embargo, si el adsorbato está orientado perpendicularmente, su espesor será del orden de su extensión con lo cual λ_a será pequeño y el término $g(\lambda_a, \eta)$ próximo a $p(\eta)$, y por tanto, en este caso los efectos de borde serán muy importantes. Este ejemplo pone de manifiesto la importancia que tiene la orientación del adsorbato sobre la superficie del resonador. Para tener en cuenta este efecto se ha realizado un estudio en función del ángulo de adsorción^{16,19,22}. Los resultados obtenidos nos permiten escribir la variación relativa del cambio de frecuencia debido al término de rigidez en función del ángulo de adsorción como:

$$\frac{\Delta f}{f_0} = \frac{K}{2}(p(\eta) - g(\lambda_a, \eta) \cos^4 \alpha - g(\mu_a, \eta) \sin^4 \alpha - g_{45}(\lambda_a, \mu_a, \eta) \sin^2 2\alpha) \quad (5.23)$$

Donde μ_a es el cociente entre la anchura y el espesor del adsorbato, es decir:

$$\mu_a = \frac{b_a}{h_a} \quad (5.24)$$

Y α es el ángulo de adsorción con respecto al eje x de la palanca. Para esta extensión al modelo en 3D el valor de K viene dado por:

$$K = \frac{E_a V_a L_c^4 \Psi_n''(x_0)^2}{E_c V_c \beta_n^4} \quad (5.25)$$

Mientras que la función $g_{45}(\lambda_a, \mu_a, \eta)$, que está relacionada con la componente cruzada de la energía de deformación, se puede expresar como¹⁶:

$$g_{45}(\lambda_a, \mu_a, \eta) = a_0(\lambda_a, \mu_a, \eta)[a_1(\lambda_a, \mu_a, \eta) + a_1(\mu_a, \lambda_a, \eta) + a_2(\lambda_a, \mu_a, \eta)] \quad (5.26)$$

Donde a_0 , a_1 y a_2 vienen dadas por:

$$a_0(\lambda_a, \mu_a, \eta) = \frac{4p(\eta) \sinh\left(\frac{B_{45}(\eta)\lambda_a}{2}\right)^2 \sinh\left(\frac{B_{45}(\eta)\mu_a}{2}\right)^2}{B_{45}(\eta)^2 \lambda_a \mu_a (1 - \cosh(B_{45}(\eta)\lambda_a) \cosh(B_{45}(\eta)\mu_a))^2}$$

$$a_1(\lambda_a, \mu_a, \eta) = B_{45}(\eta)\lambda_a \coth\left(\frac{B_{45}(\eta)\mu_a}{2}\right) \left(\cosh(B_{45}(\eta)\mu_a) \cosh\left(\frac{B_{45}(\eta)\lambda_a}{2}\right)^2 - 1 \right) \quad (5.27)$$

$$a_2(\lambda_a, \mu_a, \eta) = -\sinh(B_{45}(\eta)\lambda_a) \sinh(B_{45}(\eta)\mu_a)$$

La función $B_{45}(\eta)$ debe ser calculada numéricamente y, para el caso de un paralelepípedo, viene dada por:

$$B_{45}(\eta) = 0.90 - 0.34\eta + 0.16\eta^2 \quad (5.28)$$

La ecuación 5.23 describe el cambio relativo en frecuencia debido al término de rigidez que sufre un resonador cuando un adsorbato es adsorbido sobre su superficie teniendo en cuenta los efectos de borde, forma y orientación del adsorbato. Cuando el ángulo de adsorción es 0 o $\pi/2$ la ecuación 5.23 se transforma en la ecuación 5.18 como es de esperar. Para los casos $\lambda_a \gg 1$ y $\mu_a \gg 1$ (límite de capa delgada) la ecuación se reduce a la forma sin efectos de borde, es decir, a la parte correspondiente con el término de rigidez de la ecuación 5.16, mientras que para el caso $\lambda_a = \mu_a = 0$ (límite partícula puntual) la ecuación tiende a cero y los efectos de rigidez son despreciables.

5.2.2. DESACOPLO DE LA MASA, LA RIGIDEZ Y LA POSICIÓN DE ADSORCIÓN

La teoría de la espectrometría nanomecánica nos permite predecir los cambios en frecuencia debido a la adsorción de partículas sobre la superficie del resonador. Los cambios en frecuencia no solo dependen de la posición de adsorción, de la masa y de la rigidez del adsorbato^{17,18,23}, sino que también son importante otros parámetros como el radio de contacto o la forma de adsorción^{3,16,22}, ya que afectarán de distinta manera a la rigidez del sistema, como ya hemos visto en la sección anterior.

Mediante el espectrómetro de masa y rigidez descrito en el *capítulo 4* se pueden medir cambios en frecuencia producidos por la adsorción de partículas individuales. Sin embargo, lo que nos interesa es poder obtener información práctica de estos cambios. Para ello será necesario desacoplar la posición de adsorción, la masa y la rigidez del adsorbato mediante un algoritmo. La obtención de estos tres parámetros a partir de los cambios en la frecuencia de resonancia de los distintos

modos de vibración se denomina problema inverso. A continuación, se describe con detalle el algoritmo del problema inverso desarrollado en este trabajo.

Cuando medimos un cambio en la frecuencia de resonancia, por ejemplo, del primer modo flexural, existen infinitos valores posibles de posición, masa y rigidez para el mismo cambio en frecuencia (ecuación 5.16). En la literatura existen dos maneras de solventar este problema: mediante la adsorción localizada^{18,24} o mediante la medida simultánea de varios modos de vibración^{14,15,22}. La adsorción localizada consiste básicamente en limitar el área de detección del resonador a aquella zona que nos interesa. Por ejemplo, si queremos medir la masa podemos funcionalizar^{18,25} el extremo libre de la palanca para que las partículas de interés solo se adhieran en esa zona, ya que la contribución de la masa al cambio relativo en frecuencia es proporcional al cuadrado de la amplitud del modo de vibración, mientras que si queremos medir rigidez se funcionalizaría el extremo anclado. De esta manera la posición ya no es una incógnita en nuestro problema, ya que la tendremos perfectamente definida en nuestro sistema de ecuaciones. Este método de adsorción localizada presenta una serie de inconvenientes como son la reducción del área de detección o la necesidad de técnicas avanzadas laboratorio para funcionalizar o limitar zonas específicas de adsorción del resonador.

El espectrómetro de masa y rigidez desarrollado a lo largo de este trabajo de tesis doctoral utiliza la técnica multimodal, es decir, se miden simultáneamente los cambios relativos en frecuencia de varios modos de vibración^{14-16,22,26,27}. Cada modo de vibración tiene una forma y curvatura diferente (ver figura 5.2) y, por tanto, una contribución diferente al cambio relativo en frecuencia debido a la posición de adsorción, masa y rigidez del adsorbato. Supongamos que estamos midiendo N frecuencias de resonancia simultáneamente y una partícula es adsorbida en la posición $\xi_0 = x_0/L$, lo que provocará un cambio relativo en la frecuencia de resonancia distinto para cada modo que vendrá dado por:

$$\Omega_n = -\Delta_m \psi_n^2(\xi_0) + \Delta_s \frac{1}{\beta_n^4} \left(\frac{d^2 \psi_n(\xi_0)}{d\xi^2} \right)^2 \quad (5.29)$$

Donde la ecuación 5.29 es una forma más elegante y compacta de reescribir la ecuación 5.16, teniendo en cuenta los efectos de borde y la forma del adsorbato estudiados anteriormente. Donde $\Omega_n = \Delta f_n / f_{n0}$ es el cambio relativo en frecuencia de resonancia, ψ_n es la forma del modo n-ésimo, β_n es el autovalor correspondiente al modo n-ésimo, ξ_0 es la posición de adsorción normalizada a la longitud de la palanca, $\Delta_m = \frac{1}{2} \frac{m_a}{m_c}$ es la relación entre la masa del adsorbato y la masa del resonador y que llamaremos *término de masa*, mientras que el término $\Delta_s = \frac{1}{2} \frac{V_a E_a}{V_c E_c} \Gamma_e$ lo llamaremos *término de rigidez*. Donde Γ_e contiene información sobre la forma del adsorbato y los efectos de borde descritos anteriormente. Al término $\Gamma_e E_a$, lo llamaremos *módulo de Young efectivo* del adsorbato. Como se puede ver en la ecuación 5.29, mientras que el cambio relativo en la frecuencia de resonancia tiene una dependencia lineal con los términos de masa y rigidez, la dependencia es no lineal con la posición de adsorción. Esto implica que conociendo la posición de adsorción podremos obtener los términos de masa y rigidez a partir de dos ecuaciones, siempre y cuando sean linealmente independientes. Supongamos que medimos N modos, la ecuación 5.29 se puede ver como un sistema de N ecuaciones con tres incógnitas: ξ_0 , Δ_m y Δ_s .

Con el espectrómetro de masa y rigidez desarrollado se pueden seguir hasta 6 frecuencias de oscilación simultáneamente (*Apéndice A*) mediante el uso de un amplificador lock-in con PLL y la opción de multifrecuencia (HF2LI-PLL-MF, Zurich Instruments). Además, el ruido en frecuencia se puede asumir como gaussiano²⁸ de tal forma que estamos en condiciones de definir la función de densidad de probabilidad^{15,20,29}, PDF (del inglés “*Probability Density Function*”) de los cambios relativos en frecuencia para cada modo n , como:

$$PDF(\Omega_n) = \frac{e^{-\frac{(\Omega_n - \mu_n)^2}{2\sigma_n^2}}}{\sigma_n \sqrt{2\pi}} \quad (5.30)$$

Donde μ_n y σ_n son el valor medio y la desviación estándar del cambio relativo en frecuencia medidos experimentalmente con el espectrómetro correspondiente al modo n . Como en nuestro caso medimos N modos de manera simultánea, definimos la función densidad de probabilidad conjunta, JPDF (del inglés “*Joint Probability Density*”)

Function”), que nos da la probabilidad de que ocurran N saltos en N modos de vibración de manera simultánea. Como todas las funciones de densidad individuales son normales, la función conjunta será una distribución multinormal³⁰, es decir:

$$JPDF(\hat{\Omega}) = \frac{e^{-\frac{(\hat{\Omega}-\mathbf{M})\Sigma^{-1}(\hat{\Omega}-\mathbf{M})^T}{2}}}{(2\pi)^{N/2}\sqrt{|\Sigma|}} \quad (5.31)$$

Donde $\hat{\Omega} \equiv (\Omega_1, \Omega_2, \dots, \Omega_N)$, \mathbf{M} es el vector de valores medios del cambio relativo en frecuencia y Σ es la matriz de covarianza:

$$\mathbf{M} = (\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_N) \quad (5.32)$$

$$\Sigma = \begin{pmatrix} \sigma_1^2 & \sigma_1\sigma_2\rho_{12} & \dots & \sigma_1\sigma_N\rho_{1N} \\ \sigma_1\sigma_2\rho_{12} & \sigma_2^2 & \dots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \sigma_1\sigma_N\rho_{1N} & \dots & \dots & \sigma_N^2 \end{pmatrix} \quad (5.33)$$

Donde ρ_{ij} es la correlación entre los modos i y j . μ_i y σ_i son la media experimental y la desviación estándar del cambio relativo en frecuencia del modo i medidos con el espectrómetro de masa y rigidez. Para obtener el valor de la posición de adsorción, el término de masa y el término de rigidez es necesario expresar la ecuación 5.31 en función de las variables: ξ_0 , Δ_m y Δ_s . Para ello utilizamos la ecuación 5.29 en la ecuación 5.31 de tal manera que podemos escribir la función densidad de probabilidad conjunta como: $JPDF(\xi_0, \Delta_m, \Delta_s)$

La resolución del problema inverso consiste en encontrar el trío de valores $(\xi_0, \Delta_m, \Delta_s)$ que maximiza la función densidad de probabilidad conjunta. Matemáticamente, esto es equivalente a encontrar el trío de valores que minimizan el siguiente funcional²²:

$$F = (\hat{\Omega}(\xi_0, \Delta_m, \Delta_s) - \mathbf{M})\Sigma^{-1}(\hat{\Omega}(\xi_0, \Delta_m, \Delta_s) - \mathbf{M})^T \quad (5.34)$$

Por lo tanto, el problema se reduce a encontrar los valores de posición de adsorción, término de masa y término de rigidez que minimicen el funcional dado por la ecuación 5.34. A continuación, se detallan los experimentos donde se ha aplicado el algoritmo del problema

inverso para la obtención de la posición de adsorción, el término de masa y el término de rigidez.

5.3. ESPECTROMETRÍA DE MASA Y RIGIDEZ DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

En este apartado se detallan las medidas experimentales realizadas con el espectrómetro de masa y rigidez de nanopartículas de oro (*GNPs*) y se pone en práctica el método del problema inverso. Los experimentos fueron realizados utilizando el espectrómetro descrito previamente en el capítulo 4. Para ello se han utilizado nanopartículas de oro 100 nm de diámetro (Sigma Aldrich), las cuales se presentan en una solución de *buffer* de citrato. La disolución utilizada en el espectrómetro fue preparada con la ayuda de la Dr. Priscila Monteiro Kosaka del grupo de Bionanomecánica del Instituto de Microelectrónica de Madrid, IMM-CSIC. Las *GNPs* son previamente lavadas mediante centrifugación y filtrado (8000 rpm, 10 min, 25°C) en un vial de 1 mL, del cual 950 µL del líquido sobrante es retirado del vial y se añaden 950 µL de agua Milli-Q® de nuevo al vial de 1 mL, repitiendo el proceso de lavado y centrifugado por triplicado. Este proceso se realiza para evitar la presencia de sales de la solución del *buffer* comercial y otras impurezas que puedan producir ruidos indeseados en las medidas de los cambios relativos de la frecuencia de resonancia. En el último paso del lavado, las partículas son resuspendidas en una disolución preparada con agua Milli-Q® con 0.5% de Tween 20® que, como ya se ha mencionado en el capítulo anterior, es un tensoactivo tipo polisorbato que disminuye la tensión superficial de la disolución permitiendo la formación del cono de Taylor y, por tanto, la consiguiente nebulización de las partículas, aplicando un menor voltaje a la disolución. La concentración de las *GNPs* se caracterizó mediante un Bioespectrofotómetro (Eppendorf) siguiendo el procedimiento descrito por Haiss³¹. La disolución es ajustada para conseguir una concentración de $3 \cdot 10^9$ *GNPs*/mL. Destacar que, durante el desarrollo de este trabajo se han probado diferentes tipos de disoluciones y concentraciones para las *GNPs*, desde el mismo *buffer* de citrato sin ningún filtrado ni tratamiento, el cual producía muchos cristales de sal en el resonador y, por tanto, eventos producidos por

adsorciones no deseadas, hasta disoluciones de 50:50 agua Milli-Q® y etanol, pasando por disoluciones de agua Milli-Q® con diferentes concentraciones de sales tipo $NaCl$, las cuales producían inestabilidades en el cono de Taylor. Finalmente, la disolución utilizada para los experimentos con nanopartículas ha sido la preparada con agua Milli-Q® con 0.5% de Tween 20® consiguiendo, de esta manera, un cono de Taylor estable, así como la ausencia de cristales de sal en la superficie del resonador. A continuación, se describe y caracteriza la palanca utilizada en el espectrómetro de masa y rigidez para los experimentos realizados con las *GNPs*.

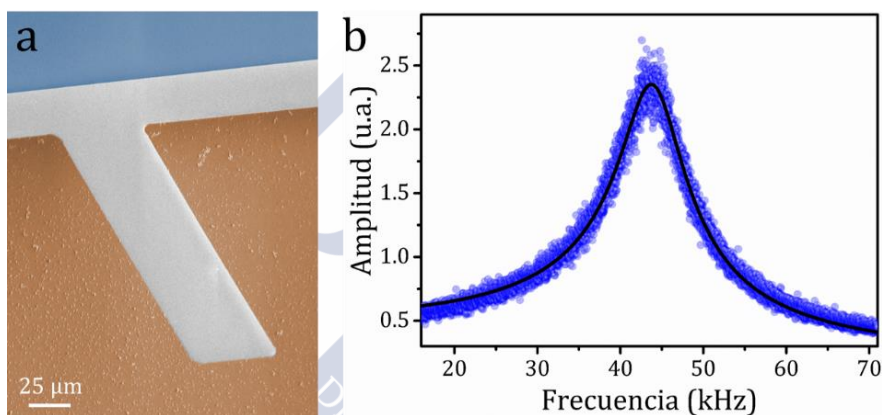


Figura 5.5. a. Imagen SEM en falso color de la micropalanca de nitruro de silicio utilizada para los experimentos con las *GNPs*, cuya longitud nominal es de $50 \mu\text{m}$, anchura $15 \mu\text{m}$ y espesor 100 nm . **b.** Resonancia experimental del primer modo flexural de vibración medido en aire mediante el método de deflexión del haz obteniendo una frecuencia de $f = 44.08 \text{ kHz}$, y un factor de calidad de $Q = 5.62$. Los puntos azules son los datos experimentales mientras que la línea negra representa el ajuste a la ecuación 1.81.

En la figura 5.5a se muestra una imagen de SEM, en falso color, de la micropalanca de nitruro de silicio (Si_3N_4) utilizada para los experimentos con las *GNPs*. Las dimensiones de la palanca han sido caracterizadas mediante SEM de alta definición obteniendo una longitud de $L_c = 50.60 \pm 0.17 \mu\text{m}$, anchura $b_c = 14.68 \pm 0.06 \mu\text{m}$ y espesor $h_c = 99.6 \pm 2.8 \text{ nm}$. La figura 5.5b muestra la frecuencia de resonancia del primer modo flexural, caracterizados en aire y a temperatura ambiente mediante el método de deflexión del haz. La respuesta en frecuencia se ha ajustado usando la ecuación 1.81 del oscilador armónico descrito en el capítulo 1, obteniendo una frecuencia de resonancia de $f_1 = 44.08 \pm$

0.01 kHz y un factor de calidad de $Q_1 = 5.62 \pm 0.02$. Utilizando la teoría descrita por el profesor John E. Sader^{32,33}, las dimensiones de la palanca, la frecuencia y el factor de calidad se obtienen los valores de la densidad, $\rho_c = 3374 \pm 94 \text{ kg/m}^3$, y módulo de Young, $E_c = 241 \pm 22 \text{ GPa}$, del resonador. La caracterización del resonador nanomecánico es necesaria para poder obtener la masa y el módulo de Young efectivo del adsorbato, como se puede deducir de los términos de masa y rigidez descritos anteriormente: (Δ_m, Δ_s) .

5.3.1. VERIFICACIÓN DEL ALGORITMO DEL PROBLEMA INVERSO

Para verificar el desarrollo teórico explicado anteriormente se ha realizado un experimento consistente en la deposición de siete nanopartículas de oro individuales y su posterior localización mediante inspección óptica, con la ayuda de un microscopio en campo oscuro³⁴ y de un microscopio electrónico de barrido. Durante la deposición se ha utilizado el espectrómetro de masa y rigidez y se han detectado un total de siete eventos utilizando el amplificador lock-in con PLL para los tres primeros modos flexurales de vibración de la micropalanca.

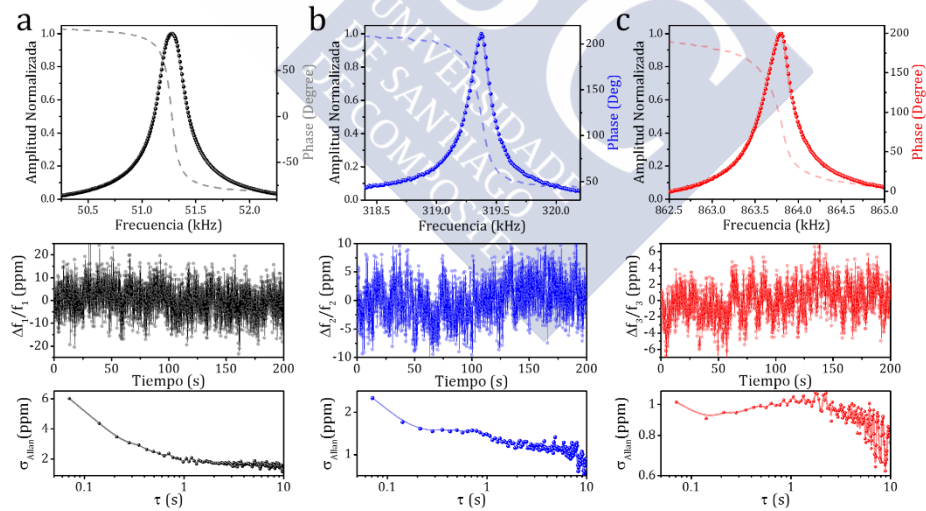


Figura 5.6. Amplitudes normalizadas de la frecuencias de resonancia de la palanca utilizada para los experimentos con las *GNPs*, fluctuaciones del cambio relativo en frecuencia en partes por millón y desviación de Allan correspondiente para **a.** primer modo (negro), $f_1 \sim 51.3 \text{ kHz}$, $Q_1 \sim 150$, **b.** segundo modo (azul), $f_2 \sim 319.4 \text{ kHz}$, $Q_2 \sim 1100$ y **c.** tercer modo (rojo) flexural de vibración, $f_3 \sim 863.8 \text{ kHz}$, $Q_3 \sim 1500$.

En la figura 5.6 se muestran las respuestas en frecuencia de los tres primeros modos flexurales de la micropalanca medidos a 0.1 *mbar* en la etapa de detección del espectrómetro descrito en el capítulo 4 mediante la técnica de deflexión del haz (Apéndice A), así como una grabación de 200 *s* de las fluctuaciones en la frecuencia relativa y la desviación Allan^{20,22,35} correspondiente antes de comenzar con la adsorción de nanopartículas (ver ecuación 3.4 en el capítulo 3.3.3). La frecuencia de resonancia y el factor de calidad son: para el primer modo flexural $f_1 \sim 51.3 \text{ kHz}$, $Q_1 \sim 150$, para el segundo modo $f_2 \sim 319.4 \text{ kHz}$, $Q_2 \sim 1100$, y para el tercer modo $f_3 \sim 863.8 \text{ kHz}$, $Q_3 \sim 1500$. Para calcular las frecuencias y factores de calidad se ajustan las respuestas en frecuencia de resonancia de la figura 5.6 utilizando la ecuación 1.81 del oscilador armónico. La desviación Allan, $\sigma_{Allan}(\tau)$ para las tres primeras frecuencias flexurales de oscilación al tiempo de adquisición de 70 *ms* son 6.0, 2.3 y 1.0 *p.p.m.* respectivamente. En el experimento con *GNPs* el lock-in con PLL adquiere un punto de las frecuencias de oscilación, de cada uno de los tres modos, cada 70 *ms*. Este tiempo de muestreo es más que suficiente para asegurarnos de que solo se produzca una adsorción dentro del tiempo de adquisición.

La figura 5.7a muestra la medida en tiempo real del cambio relativo en frecuencias de resonancia en partes por millón de los tres primeros modos flexurales de vibración de la micropalanca durante la adsorción de las siete nanopartículas de oro. Se observan siete eventos los cuales han sido numerados para su identificación sobre la superficie del resonador. Mediante un software implementado en Matlab se calcula el cambio relativo en la frecuencia de resonancia para cada evento teniendo en cuenta que: i) el cambio en frecuencia ocurre más rápido que el tiempo de adquisición, que en este caso es 70 *ms*, ii) el cambio ha de ser mayor al menos que el doble de la desviación Allan del ruido en frecuencia y iii) debe producirse un cambio en frecuencia en, al menos, dos modos simultáneamente.

Finalmente, los valores del cambio relativo en frecuencia, así como la desviación estándar del mismo, son utilizados en el algoritmo del problema inverso para calcular el mínimo del funcional 5.34. Con los siete eventos medidos con el espectrómetro (ver figura 5.7a), se ha

aplicado el método del problema inverso y se ha calculado la posición de adsorción de las siete *GNPs*.

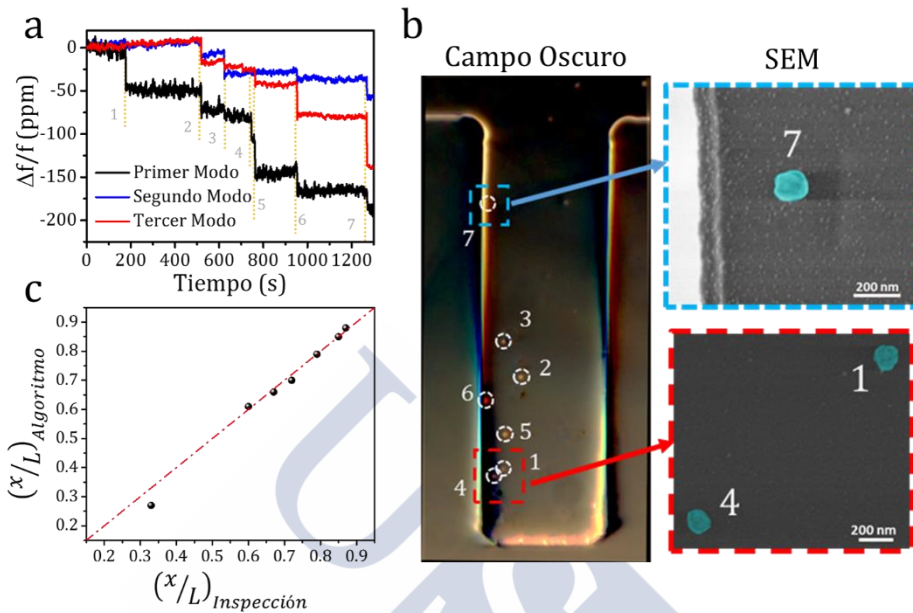


Figura 5.7. a. Medida en tiempo real del cambio relativo en la frecuencia de resonancia de los tres primeros modos flexurales de vibración durante la adsorción de *GNPs*. Se observan siete eventos en frecuencia en un tiempo de **20 min**, que han sido numerados e identificados en (b). b. Imágenes de campo oscuro y SEM donde se observan claramente las *GNPs*. c. Gráfica de la posición de adsorción calculada mediante el algoritmo del problema inverso frente a las posiciones obtenidas mediante la inspección óptica, observándose una excelente correlación.

Con el fin de corroborar las posiciones obtenidas mediante la resolución del problema inverso, la micropalanca utilizada se inspecciona con un microscopio óptico en campo oscuro³⁴ (LU Plan Fluor, AN: 0.8, Nikon) y con un SEM de alta resolución (SEM, FEI Verios 460) obteniendo la posición de las partículas sobre la palanca²². La gráfica de la figura 5.7c muestra una perfecta correlación entre los datos obtenidos con el algoritmo del problema inverso y mediante la inspección óptica y SEM. En la imagen de SEM de falso color de la figura 5.7b se distinguen perfectamente las *GNPs* (en azul cian) sobre la superficie de la micropalanca. Este experimento pone de manifiesto el potencial de la teoría de la espectrometría nanomecánica y el sistema experimental desarrollado, validando el algoritmo del problema inverso.

5.3.2. ESPECTROMETRÍA DE *GNPs*

A continuación, se analizan un total de 120 eventos durante la adsorción de *GNPs* mediante el algoritmo del problema inverso. En los experimentos realizados con las *GNPs* se han seguido los tres primeros modos flexurales de vibración mediante el amplificador lock-in con PLL. Destacar que, durante la realización de este trabajo de tesis doctoral, se realizaron muchos experimentos y se almacenaron centenares de cambios en frecuencia pero, finalmente, mediante el software desarrollado en Matlab con las condiciones descritas anteriormente, se han seleccionado un total de 120 eventos. Destacar también que las medidas realizadas con el espectrómetro de masa y rigidez con las *GNPs* se consigue una eficiencia de adsorción de nanopartículas mucho mayor que en los experimentos descritos anteriormente para la verificación del algoritmo del problema inverso, donde se han detectado siete saltos en aproximadamente 20 *min*. Esto es debido a que para la deposición de las siete *GNPs* se ha posicionado el resonador sobre el soporte en la etapa de detección (ver capítulo 4.3.3) lejos de la zona de máxima adsorción de partículas, ya que nos interesaba tener pocas *GNPs* para poder realizar la inspección óptica.

La figura 5.8a muestra una serie imagen en campo oscuro³⁴ de las *GNPs* adsorbidas sobre un sustrato limpio de silicio después de 15 *min*, 30 *min*, 45 *min* y 60 *min* de nebulización con el espectrómetro de masa y rigidez. La figura 5.8b muestra una ampliación de la zona central de la figura 5.8a después de nebulizar 60 *min* donde se distinguen perfectamente las *GNPs* sobre la superficie del sustrato de silicio. La figura 5.8c representa la densidad superficial de *GNPs* en función del radio para un tiempo de nebulización de 60 *min*. El centro del radio es calculado como el centro masas de todas las *GNPs* que aparecen en la imagen de campo oscuro. Se aprecia claramente como decae la densidad de *GNPs* a medida que nos alejamos del centro de la nube.

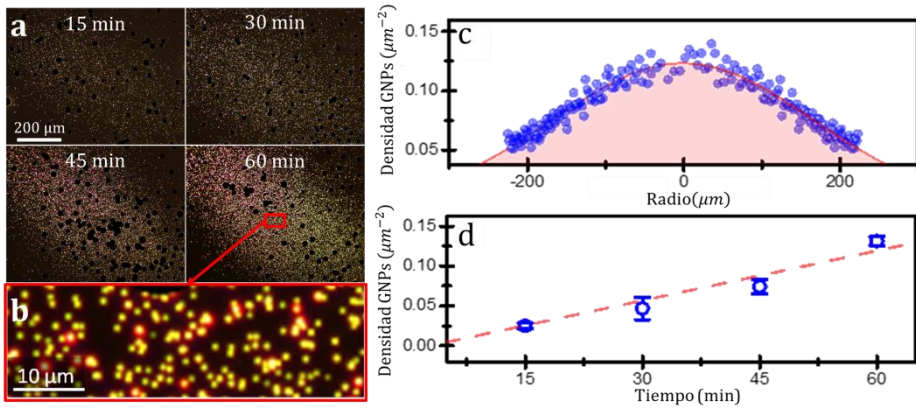


Figura 5.8. **a.** Serie de imágenes ópticas en campo oscuro de las *GNPs* para diferentes tiempos de nebulización: **15, 30, 45 y 60 min.** **b** Imagen ampliada de las *GNPs* en campo oscuro de la región recuadrada en la imagen de **60 min**, donde se distinguen las *GNPs*. **c.** Densidad superficial de *GNPs* en función del radio después de nebulizar el sustrato durante **60 min**. El centro del radio se calcula como el centro de masas de la distribución de las *GNPs*. **d.** Densidad superficial de *GNPs* para diferentes tiempos de nebulización (puntos azules) y ajuste lineal (línea roja discontinua) utilizada para estimar la eficiencia del flujo de *GNPs* sobre la superficie del resonador.

Por último, la figura 5.8d representa la densidad superficial de *GNPs*, calculada en un círculo de radio $300 \mu\text{m}$ y con centro el centro de masas de la distribución de nanopartículas, en función del tiempo de nebulización (símbolos). El ajuste (línea roja discontinua) arroja un flujo de nanopartículas de $\sim 250 \text{ GNPs}/\text{min}$ en un área de $300^2\pi \mu\text{m}^2$, es decir, aproximadamente $10^{-3} (\text{GNPs}/\mu\text{m}^2 \cdot \text{min})$. Como la palanca utilizada tiene un área de $\sim 750 \mu\text{m}^2$ se estima aproximadamente un evento por minuto.

La figura 5.9 muestra una de las medidas en tiempo real del cambio relativo en frecuencia de los tres primeros modos flexurales de vibración durante la adsorción de *GNPs* sobre la palanca, donde se observan claramente los cambios en frecuencia relativa simultáneos e instantáneos. El tiempo total de la medida es de aproximadamente 80 min . En la gráfica ampliada, entre el tiempo 1000 s y 2000 s , se observan con mayor detalle los saltos en frecuencia producidos por la adsorción de *GNPs* individuales. Los experimentos con el espectrómetro de masa y rigidez nanomecánico muestran, de media, aproximadamente una adsorción cada minuto, en buen acuerdo con la gráfica de la figura 5.8d.

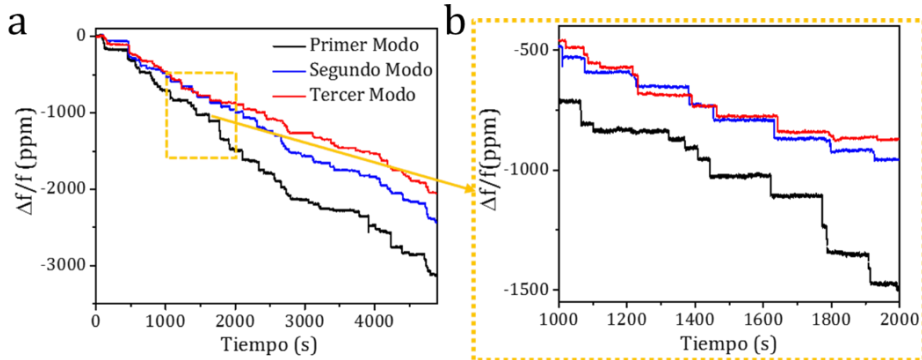


Figura 5.9. a. Medida en tiempo real durante aproximadamente **80 min** de los tres primeros modos flexurales de vibración durante la adsorción de *GNPs*. b. Zoom de la zona comprendida entre **1000 s** y **2000 s**. Se observan saltos instantáneos y simultáneos en las frecuencias de resonancia en el momento en que cada nanopartícula es adsorbida sobre la superficie del resonador.

Después de aplicar el problema inverso a las 120 adsorciones se calcula la función densidad de probabilidad de la masa y del módulo de Young efectivo dado por $\Gamma_e E_a$ de las *GNPs*. Para recalcar la importancia del término de considerar la rigidez del sistema, se realiza el cálculo de la masa de las *GNPs* con la teoría de la espectrometría nanomecánica sin tener en cuenta el término de rigidez^{14,15,20,29}. La masa de las nanopartículas considerando el término de rigidez es de $11.6 \pm 3.8 fg$, mientras que si no consideramos el término de rigidez en la minimización del funcional dado por la ecuación 5.34 la masa decrece a $10.3 \pm 3.7 fg$, es decir, no considerar la rigidez subestima la masa de los adsorbatos en un 10%, aproximadamente, lo que pone de manifiesto la importancia del término de rigidez para calcular la masa de los adsorbatos con mayor precisión²² en espectrometría nanomecánica.

Con el fin de corroborar los resultados experimentales obtenidos mediante la espectrometría nanomecánica, las nanopartículas de oro han sido calibradas mediante dos técnicas de caracterización diferentes: mediante SEM de alta definición y mediante un AFM. Para ello una muestra de silicio de $5 \times 5 mm$ fue limpiada cuidadosamente con una solución de Piranha durante 15 min, enjuagada por triplicado con agua Milli-Q[®] y secada bajo un flujo de N_2 . El sustrato limpio de silicio se sumerge en una solución de 0.001% *w/v* de poli-lisine en agua Milli-Q[®] durante 60 min y a 25 °C bajo una agitación suave. Después, la muestra de

silicio es sumergida en una solución de *GNPs* con una concentración de 10^8 *GNPs/mL* en agua Milli-Q® durante 60 *min.* Finalmente es aclarada con agua Milli-Q® y secada bajo un flujo de N_2 . La muestra fue inspeccionada en el SEM mediante la adquisición de 100 imágenes de $1 \times 1 \mu m^2$, como se puede observar en la figura 5.10a. Las imágenes fueron tratadas con el programa ImageJ, midiendo un total de 260 *GNPs*, mediante el cual se realiza el cálculo de su área, suponiendo que son perfectamente esféricas. Conociendo la densidad del oro $\rho_{Au} = 19300 \text{ kg/m}^3$ se calcula la densidad de probabilidad en masa de las *GNPs* caracterizadas mediante SEM, como se observa en la figura 5.10b, obteniendo un valor medio en masa de $11.6 \pm 5.7 \text{ fg}$, en muy buen acuerdo con la masa obtenida con el espectrómetro nanomecánico.

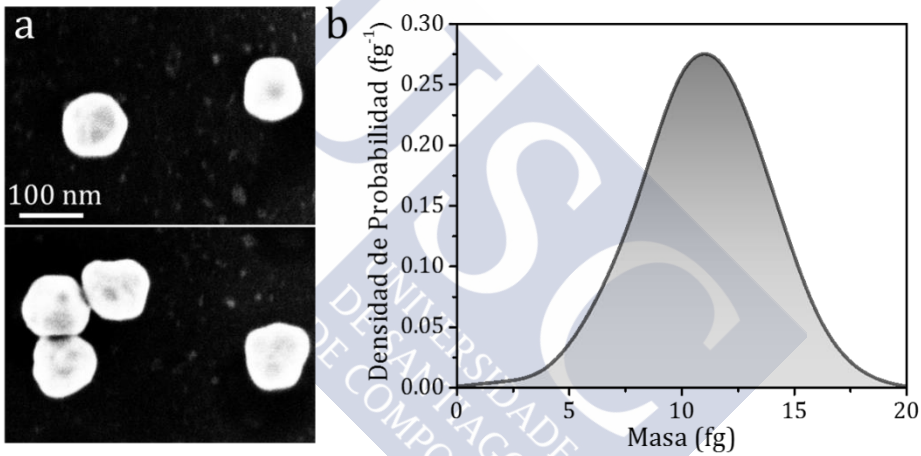


Figura 5.10. a. Imágenes de SEM de las *GNPs* depositadas sobre un sustrato de silicio y b. gráfica de la densidad de probabilidad calculada a partir de la medida de 260 nanopartículas obteniendo una masa de $11.6 \pm 5.7 \text{ fg}$.

A su vez, se caracterizaron mediante AFM (Bruker) un total de 215 nanopartículas arrojando un valor medio de la masa de las *GNPs* de $11.4 \pm 2.8 \text{ fg}$. La figura 5.11 muestra una imagen de AFM de la medida de las alturas de las *GNPs* utilizando el modo “*PeakForce Tapping*”. Conociendo la altura de las nanopartículas medidas por AFM y considerando las nanopartículas perfectamente esféricas se calcula la densidad de probabilidad en masa. El AFM fue previamente calibrado utilizando una muestra de calibración (TGS1, NT-MDT). La altura media de las *GNPs* es de $103 \pm 9 \text{ nm}$.

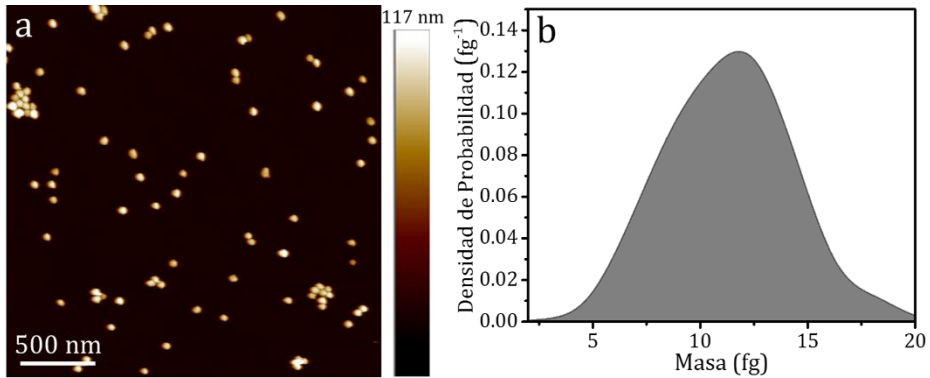


Figura 5.11. **a.** Imagen de AFM para la calibración de las *GNPs* y **b.** densidad de probabilidad calculada a partir de la medida de la altura mediante AFM de 215 nanopartículas obteniendo una media en masa de $11.4 \pm 2.8 \text{ fg}$.

Finalmente, en la figura 5.12a se representa la densidad de probabilidad de la masa de las 120 *GNPs* depositadas sobre la palanca mediante el espectrómetro de masa y rigidez, considerando y despreciando el término de rigidez, así como la densidad de probabilidad calculada a partir de las imágenes SEM. La figura 5.12b muestra una imagen SEM en falso color donde se distinguen perfectamente las *GNPs* (azul cian) sobre la superficie del resonador después de los experimentos. Como se puede observar, la caracterización realizada mediante SEM y AFM están en muy buen acuerdo con el valor obtenido considerando el término de rigidez en la teoría de la espectrometría nanomecánica.

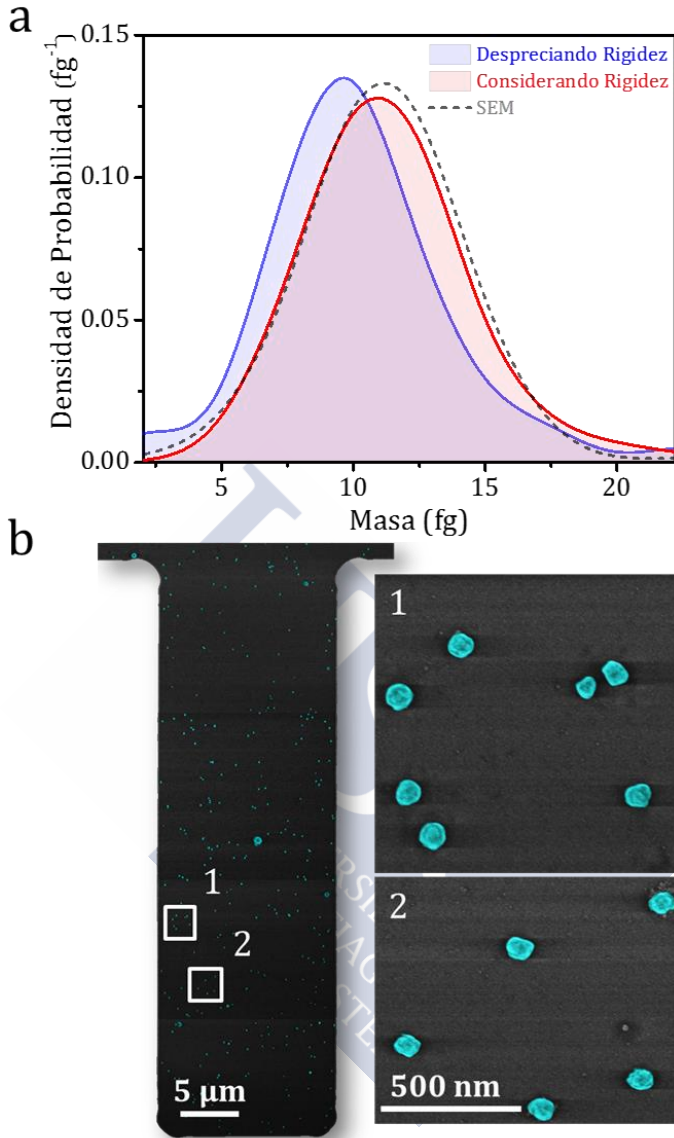


Figura 5.12. a. Densidad de probabilidad de la masa de las *GNPs* medidas con el espectrómetro y aplicando el algoritmo del problema inverso considerando rigidez (rojo) y despreciando rigidez (azul). Calibración de la masa de las *GNPs* mediante SEM (línea discontinua) la cual se ajusta perfectamente con la masa considerando rigidez. b. Imagen SEM en falso color de una palanca después de la adsorción de *GNPs*. Se puede observar las zonas 1 y 2 ampliadas donde se distinguen perfectamente las *GNPs*.

En la figura 5.13 se representa la distribución de probabilidad del módulo de Young efectivo dado por el término $\Gamma_e E_a$, donde recordemos que el término Γ_e tiene información sobre la forma del adsorbato y los

efectos de borde que se han descrito en la sección anterior. Para calcular la rigidez efectiva es necesario conocer el volumen de las *GNPs*, ya que $\Delta_s = \frac{1}{2} \frac{V_a E_a}{V_c E_c} \Gamma_e$. Para ello se ha usado el valor obtenido de la masa para cada adsorción y el valor de la densidad del oro para estimar el volumen de las nanopartículas. La medida de la rigidez efectiva se realiza para corroborar los valores obtenidos, ya que para caracterizar las partículas sería suficiente clasificarla mediante el término de masa y el término de rigidez, es decir: Δ_m, Δ_s , que son nuestros observables.

El valor medio de la rigidez efectiva del adsorbato es $130 \pm 96 \text{ GPa}$. El efecto de la rigidez de una *GNPs* adsorbida sobre la superficie del resonador debería ser despreciable, ya que se considera como una masa puntual y los efectos de borde serían enormes como hemos visto anteriormente. Sin embargo, los resultados experimentales arrojan un valor de la rigidez efectiva considerable.

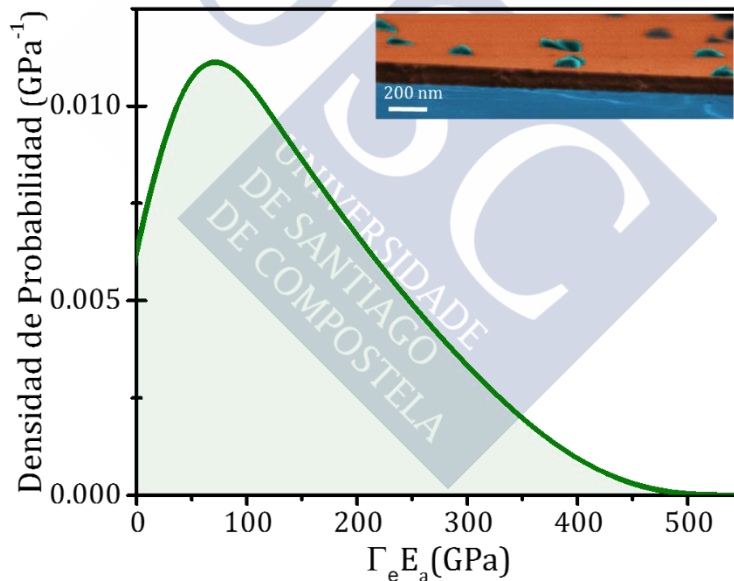


Figura 5.13. Densidad de probabilidad de la rigidez efectiva de las 120 *GNPs* calculada utilizando el algoritmo del problema inverso. En la imagen SEM en falso color se puede ver la palanca de perfil (naranja) utilizada durante la adsorción de nanopartículas (azul cian) donde se aprecia la fuerte adhesión entre las nanopartículas y la palanca

Para explicar el efecto de la rigidez, las *GNPs* depositadas mediante el espectrómetro de masa y rigidez han sido inspeccionadas mediante SEM y AFM, donde se puede apreciar como las nanopartículas

se aplastan contra la superficie del resonador disminuyendo su altura y aumentando considerablemente la superficie de contacto, como se puede ver en la imagen SEM en falso color de la figura 5.13. En la figura 5.14a se representa las medidas realizadas con el AFM de las *GNPs* adsorbidas después de su nebulización con el espectrómetro sobre la superficie de la palanca, las cuales arrojan un valor medio de altura de $59.0 \pm 7.8 \text{ nm}$, como se puede observar en el histograma de la figura 5.14b. La altura medida es un 59% menos que la altura nominal media aportada por el fabricante, así como las medidas de AFM realizadas antes de la nebulización (figura 5.11). Este aplastamiento al que son sometidas, debido probablemente al impacto y a las fuerzas de adhesión, nos permiten obtener un valor de la rigidez efectiva.

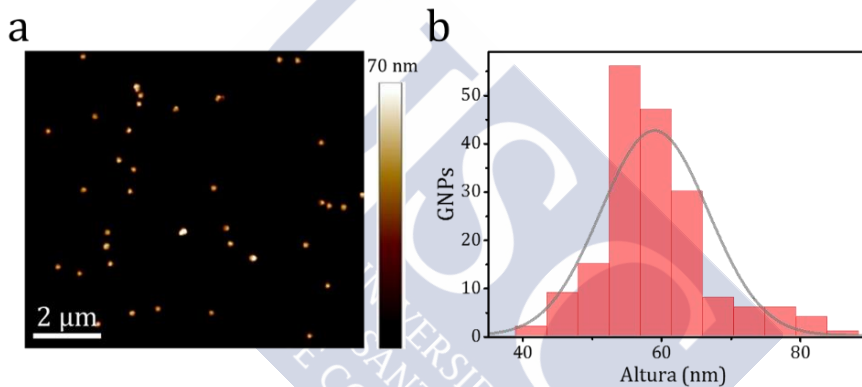


Figura 5.14. a. Imagen de AFM de las alturas de las *GNPs* después de su nebulización y b. histograma el cual arroja un valor medio de la altura de $59.0 \pm 7.8 \text{ nm}$.

Con el fin de comprobar el efecto de la rigidez efectiva, se han realizados simulaciones por elementos finitos, considerando la forma aplastada las nanopartículas, es decir, como casquetes esféricos de altura 60 nm, como la obtenida por AFM después de los experimentos, y un volumen de $V = 5.24 \times 10^5 \text{ nm}^3$ correspondiente al de una nanopartícula de 100 nm de diámetro. Se calculan los cambios relativos en frecuencia para los tres primeros modos flexurales de vibración variando la posición a lo largo de la palanca. A continuación, se aplica el algoritmo del problema inverso obteniéndose una rigidez efectiva promedio de 165 GPa en buena concordancia con los resultados experimentales²². Las simulaciones fueron realizadas por el Dr. Jose Jaime Ruz.

La forma poco homogénea de la densidad de probabilidad de la rigidez efectiva de las *GNPs* que se observa en la figura 5.13 es debida a la forma de la adsorción de las nanopartículas las cuales, como es lógico, no se adhieren de la misma manera y, por tanto, los efectos de borde son diferentes en cada una de las adsorciones..

Estos experimentos muestran por primera vez la medida simultanea de la masa y la rigidez efectiva de nanopartículas individuales con espectrometría nanomecánica.

5.4. ESPECTROMETRÍA DE MASA Y RIGIDEZ DE BACTERIAS *E. COLI*

Finalmente, aplicamos la técnica de la espectrometría nanomecánica para la medida de la masa y rigidez de bacterias individuales. La caracterización de microorganismos es esencial para el diagnóstico rápido de enfermedades y el tratamiento efectivo de infecciones. La mayoría de las técnicas utilizadas se basan en el estudio de las propiedades medias de una población, ignorando la gran heterogeneidad que existe entre las diferentes células. La técnica desarrollada durante este trabajo de tesis doctoral nos permite analizar, con un alto rendimiento, microorganismos individuales mediante la caracterización de dos coordenadas ortogonales: el término de masa y el término de rigidez. Ambos parámetros nos proporcionan información sobre la conformación estructural, propiedades patológicas y propiedades mecánicas³⁶. La masa de entidades biológicas intactas es generalmente estimada mediante SEM o interferometría óptica, sin embargo, estas medidas son indirectas y requieren asunciones sobre las propiedades de los materiales que conforman la célula³⁷. Por otro lado, la técnica más utilizada para la caracterización de las propiedades mecánicas es la nano-indentación³⁸ mediante el contacto entre una punta de AFM y la entidad biológica³⁹. Sin embargo, el AFM es una técnica de caracterización lenta, ya que se basa en la indentación punto a punto de toda la superficie de las células. Por lo tanto, el espectrómetro nanomecánico desarrollado en este trabajo se postula como un excelente candidato para la caracterización de complejos biológicos, sorteando los problemas de las técnicas estándares de caracterización.

En este apartado se detallan los resultados obtenidos en el espectrómetro nanomecánico con bacterias *Escherichia coli* DH5 α (*E. coli*). Las células han sido cedidas por el Dr. Jesús Mingorance del Departamento de Microbiología del Hospital La Paz (Madrid). Las disoluciones fueron preparadas por la Dra. Carmen Martínez Domínguez. Para la preparación de la disolución 10 mL de *buffer* Luria-Bertani (LB, Sigma-Aldrich) se inoculó con 50 μ L de cultivo *E. coli* en fase estacionaria y se cultivaron durante toda la noche a 37°C con agitación suave antes de su utilización. Para evitar la formación de residuos en el medio de cultivo, las bacterias fueron recolectadas mediante centrifugación a 4400 rpm durante 25 min a 20°C, repitiendo el proceso por triplicado. Finalmente, las bacterias son resuspendidas en 50% propanol-2/agua Milli-Q®, siguiendo el procedimiento descrito por Goodacre⁴⁰. La concentración de las bacterias se ajustó a 10⁹ bacterias/mL caracterizadas mediante un Bioespectrofotómetro (Eppendorf).

Los resonadores utilizados para los experimentos con las bacterias son palancas comerciales de nitruro de silicio con una capa de Ti/Au de 45 nm de espesor para mejorar la reflexión del láser (MLCT-O10, Bruker). Cada uno de estos chips comerciales están compuestos por 6 resonadores, 5 de ellos son triangulares y uno es rectangular. Para los experimentos se ha utilizado el rectangular. Las dimensiones nominales proporcionadas por el fabricante son 200 μ m de longitud, 20 μ m de anchura y 0.55 μ m de espesor. Las dimensiones exactas, al igual que para la palanca utilizada en los experimentos con las GNPs, fueron caracterizadas mediante SEM para la correcta calibración de las micropalancas, obteniendo una longitud $L_c = 201.27 \pm 0.76 \mu$ m, una anchura $b_c = 23.42 \pm 0.38 \mu$ m y un espesor $h_c = 556 \pm 10$ nm. La figura 5.15a muestra una imagen en SEM de una palanca como la utilizada para los experimentos con las bacterias y en la figura 5.15b se muestra una gráfica del ruido termomecánico de la frecuencia de resonancia del primer modo flexural de vibración medido en aire.

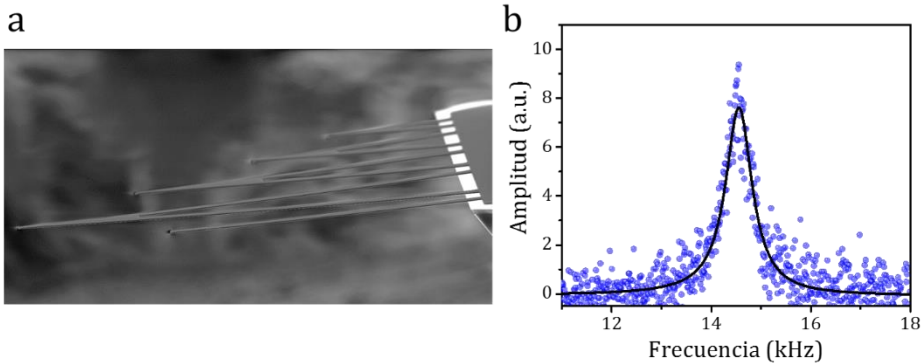


Figura 5.15. a. Imagen SEM del chip utilizado para los experimentos con las bacterias. Se puede distinguir el resonador tipo palanca. **b.** Pico de resonancia del primer modo flexural de vibración en aire: $f = 14.55 \text{ kHz}$, $Q = 22.42$. Los puntos azules son los datos experimentales mientras que la línea negra representa el ajuste a la ecuación 1.81.

Al igual que en la espectrometría de las nanopartículas, la palanca utilizada para los experimentos con las bacterias ha sido calibrada mediante el método de Sader^{32,33}. A partir de la medida del espectro termomecánico del primer modo flexural de la palanca en aire obtenemos la frecuencia de resonancia, $f = 14.55 \text{ kHz}$, y el factor de calidad, $Q = 22.42 \text{ kHz}$ mediante un ajuste (línea negra) utilizando la ecuación 1.81. Con estos valores y las dimensiones del resonador caracterizadas mediante SEM se obtiene una densidad de $\rho_c = 4127 \pm 103 \text{ kg/m}^3$ y un módulo de Young de $E_c = 171 \pm 13 \text{ GPa}$. La calibración de la palanca es necesaria para el desacoplo de la masa y rigidez del resonador del de las bacterias.

5.4.1. ESPECTROMETRÍA DE BACTERIAS

En este apartado se detallan las medidas realizadas durante la adsorción de las bacterias. En este caso, se han seguido los cuatro primeros modos flexurales de vibración de la palanca. La figura 5.16 muestra los espectros de resonancia de los cuatro primeros modos flexurales de vibración medidos mediante la técnica de deflexión del haz a 0.1 mbar en la etapa de detección del espectrómetro de masa y rigidez.

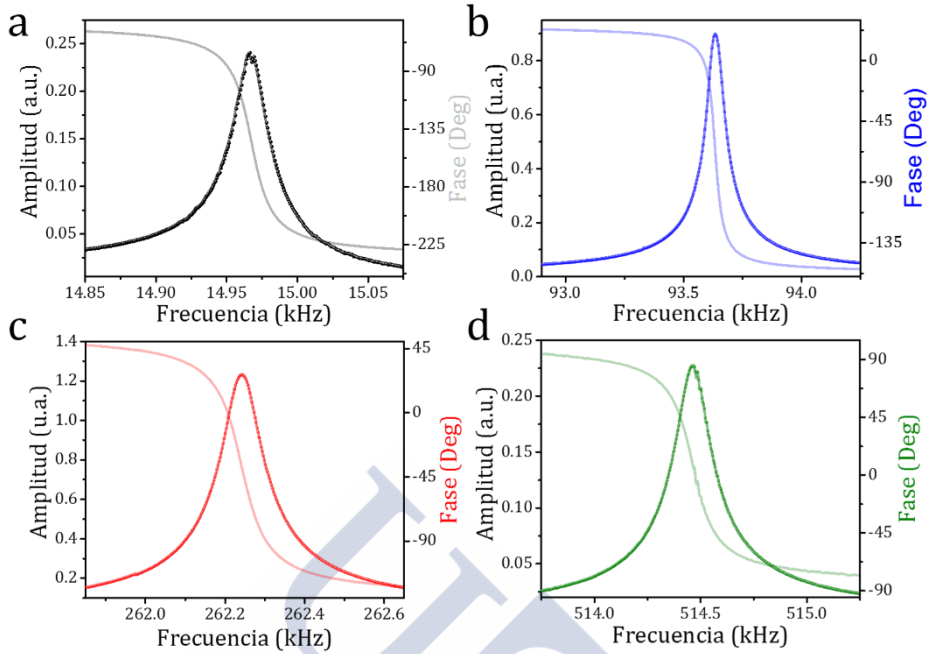


Figura 5.16. Frecuencia de resonancia de: **a.** primer modo (negro), $f_1 = 14.97 \text{ kHz}$, $Q_1 = 370$, **b.** segundo modo $f_2 = 93.64 \text{ kHz}$, $Q_2 = 720$, **c.** tercer modo $f_3 = 262.24 \text{ kHz}$, $Q_3 = 1500$ y **d.** cuarto modo $f_4 = 514.46 \text{ kHz}$, $Q_4 = 2000$ flexural de vibración de una palanca como la utilizada en los experimentos con las bacterias medidas a 0.1 mbar en el espectrómetro.

La frecuencia de resonancia y el factor de calidad para el primer modo flexural son $f_1 \sim 14.97 \text{ kHz}$, $Q_1 \sim 370$, para el segundo modo son $f_2 \sim 93.64 \text{ kHz}$, $Q_2 \sim 720$, para el tercero modo son $f_3 \sim 262.24 \text{ kHz}$, $Q_3 \sim 1500$ y para el cuarto $f_4 \sim 514.46 \text{ kHz}$, $Q_4 \sim 2000$. Los espectros de resonancia son ajustados a la ecuación 1.81 para calcular el factor de calidad y la frecuencia de resonancia.

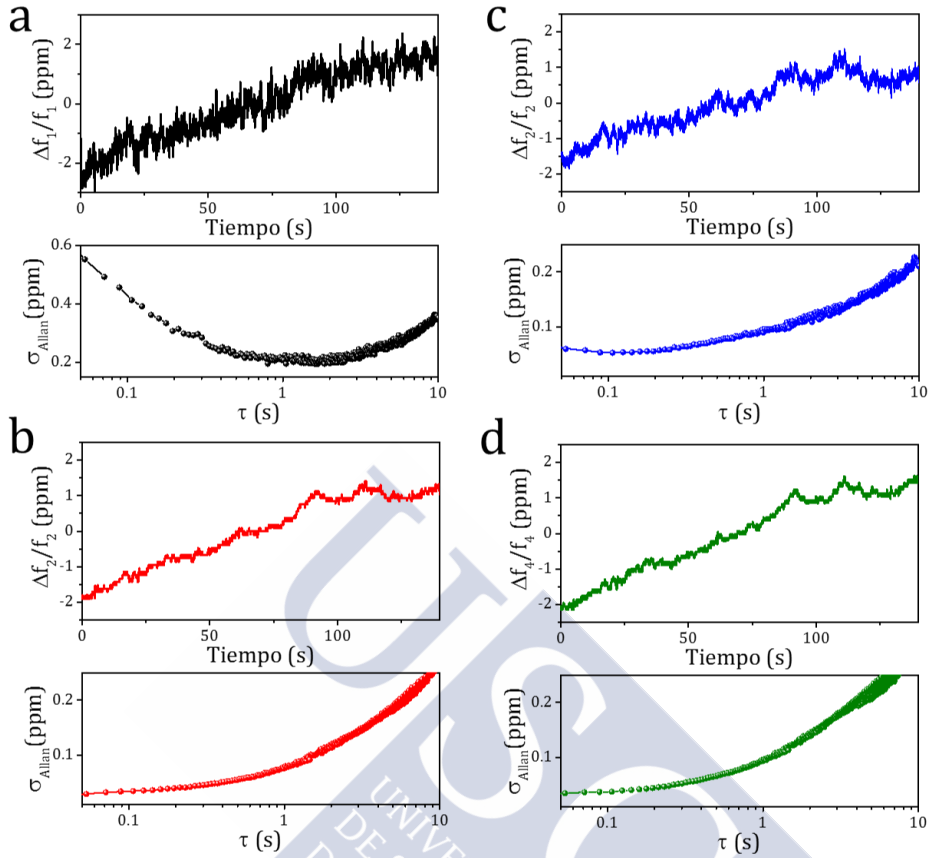


Figura 5.17. cambio en frecuencia relativa en partes por millón y desviación de Allan para: **a.** primer modo, **b.** segundo modo, **c.** tercer modo y **d.** cuarto modo flexural de una palanca como la utilizada en los experimentos con las bacterias.

La figura 5.17 muestra una medida de la frecuencia relativa durante 200 s y la desviación de Allan correspondiente de los cuatro primeros modos flexurales de vibración de la palanca utilizada para los experimentos con las bacterias antes de comenzar la nebulización. El tiempo de adquisición utilizado en el amplificador lock-in con PLL para los experimentos con las bacterias es de 20 ms, es decir, el PLL adquiere un punto cada 20 ms. La desviación de Allan para los cuatro primeros modos flexurales de vibración a eso tiempo de adquisición son 0.82, 0.10, 0.02 y 0.03 *p.p.m.*, respectivamente. La desviación de Allan se utiliza para calcular el cambio mínimo en la frecuencia relativa que es considerado como una adsorción de bacteria, como ya se ha explicado en la espectrometría con *GNPs*.

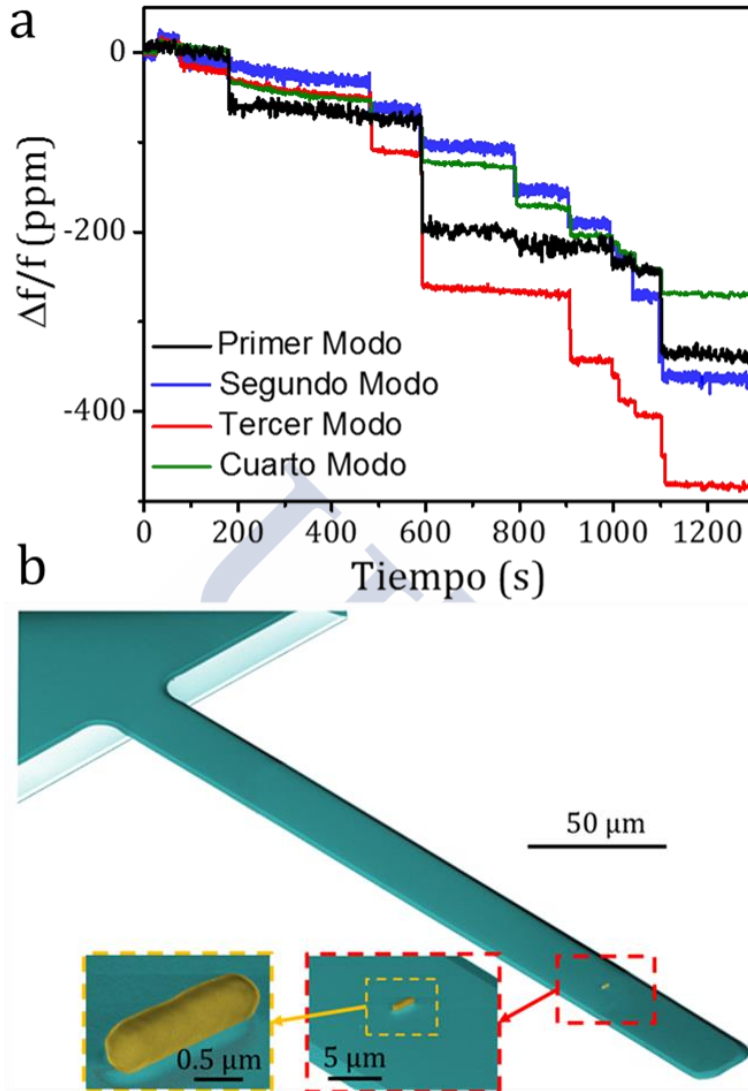


Figura 5.18. a. Medida en tiempo real de los saltos en la frecuencia relativa de los cuatro primeros modos flexurales de vibración durante la adsorción de bacterias. b. Micropalanca utilizada en los experimentos con las bacterias (Bruker, MLCT-O10) donde se aprecia una bacteria *E. coli* individual sobre la superficie del resonador. Los recuadros muestran imágenes de SEM de la bacteria con una mayor amplificación.

Considerando las mismas condiciones descritas anteriormente en los experimentos realizados con las *GNPs*, se han obtenido un total de 189 saltos en frecuencia, los cuales han sido analizados utilizando el algoritmo del problema inverso. La figura 5.18a muestra una medida en tiempo real del cambio relativo en la frecuencia de resonancia de los

cuatro primeros modos flexurales de vibración durante la adsorción de bacterias. Cada salto instantáneo se corresponde con la adsorción de una bacteria individual sobre la superficie del resonador. En la figura 5.18b se muestra una imagen SEM en falso color de una única bacteria *E. coli* depositada sobre el extremo libre de la micropalanca dentro del espectrómetro de masa y rigidez. En la imagen se puede observar con claridad que la bacteria está intacta y fuertemente adherida a la superficie del resonador.

Las bacterias han sido caracterizadas por microscopía óptica de campo oscuro y SEM después de su nebulización. La longitud media de las bacterias utilizadas en los experimentos es $L_a = 1.87 \pm 0.52 \mu\text{m}$ y el diámetro es $h_a = 0.49 \pm 0.05 \mu\text{m}$ en buen acuerdo con las dimensiones de las bacterias en su estructura nativa. La figura 5.19a muestra una serie de imágenes SEM de las bacterias *E. coli* sobre la superficie de la micropalanca, mientras que en la figura 5.19b se pueden observar imágenes tomadas en campo oscuro³⁴ con un objetivo 50x y 20x.

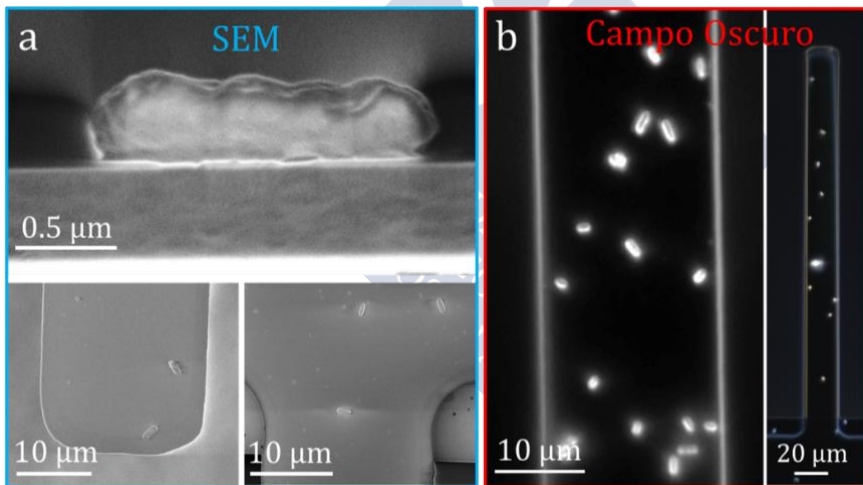


Figura 5.19. a. Imágenes SEM de bacterias depositadas con el espectrómetro. La imagen superior muestra una *E. coli* vista de perfil sobre la palanca utilizada como sensor. Las imágenes inferiores muestran el extremo libre y el anclado del resonador con bacterias sobre su superficie. b. Imágenes de campo oscuro obtenidas con un objetivo 50x (izquierda) y 20x (derecha) donde se distinguen las *E. coli* depositadas sobre la palanca después de su nebulización.

Los resultados obtenidos de las dimensiones de las bacterias son utilizados para calcular el módulo de Young a partir del término de

rigidez, Δ_s , el cual es el observable, al igual que en el caso de la espectrometría de las GNPs.

La figura 5.20 muestra la distribución de probabilidad en masa de las bacterias después de aplicar el algoritmo del problema inverso a los 189 eventos, considerando y despreciando el término de rigidez. Como se puede observar, al igual que para el caso de las GNPs, el valor en masa despreciando el término de rigidez es, aproximadamente, un 10% menor que el valor considerando rigidez, lo cual vuelve a poner de manifiesto la importancia del término de rigidez en la espectrometría nanomecánica.

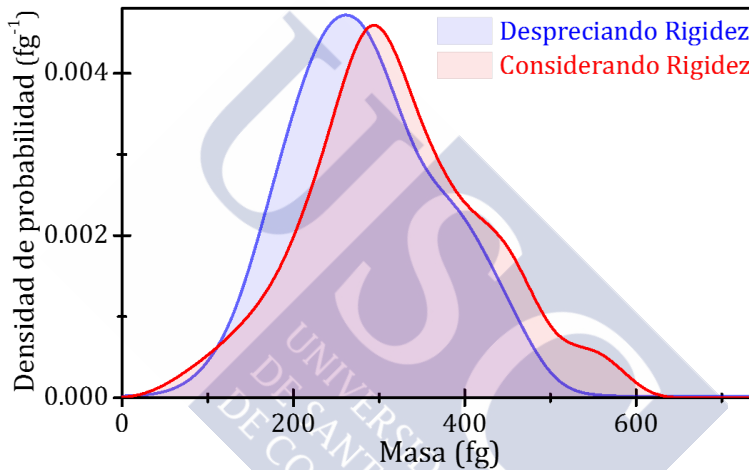


Figura 5.20. Densidad de probabilidad de masa de las bacterias *E. coli* aplicando el algoritmo del problema inverso a las 189 adsorciones considerando la rigidez (rojo) y despreciando el término de rigidez (azul).

El valor medio obtenido para la masa de las bacterias *E. coli* es de $318 \pm 95 \text{ fg}$, la cual concuerda con los valores estimados de la masa de una bacteria *E. coli* seca obtenidos mediante SEM y resonadores suspendidos con microcanales^{37,41}. La amplia distribución de la densidad de probabilidad en masa es debido a la gran heterogeneidad en tamaño y propiedades mecánicas, típica de las poblaciones celulares como se comprobó con inspección óptica y de SEM (ver figura 5.19).

Para calcular la rigidez efectiva, es decir el término $E_a \Gamma_e$ de las bacterias es necesario conocer previamente su volumen, al igual que para el caso de la espectrometría de las GNPs, ya que el término de rigidez,

que es el observable que calculamos, viene dado por $\Delta_s = \frac{1}{2} \frac{V_a E_a}{V_c E_c} \Gamma_e$, donde conocemos el volumen y el módulo de Young de la palanca. A su vez hemos calculado previamente la masa de las bacterias con el algoritmo del problema inverso. Como ya se ha explicado anteriormente, las dimensiones de las bacterias han sido caracterizadas mediante SEM y microscopia de campo oscuro, obteniendo una densidad de masa para las bacterias de $\rho_a = 900 \pm 100 \text{ kg/m}^3$. La figura 5.21 muestra la densidad de probabilidad de la rigidez efectiva de las bacterias, siendo la primera vez que se mide la rigidez de entidades biológicas individuales mediante espectrometría nanomecánica²².

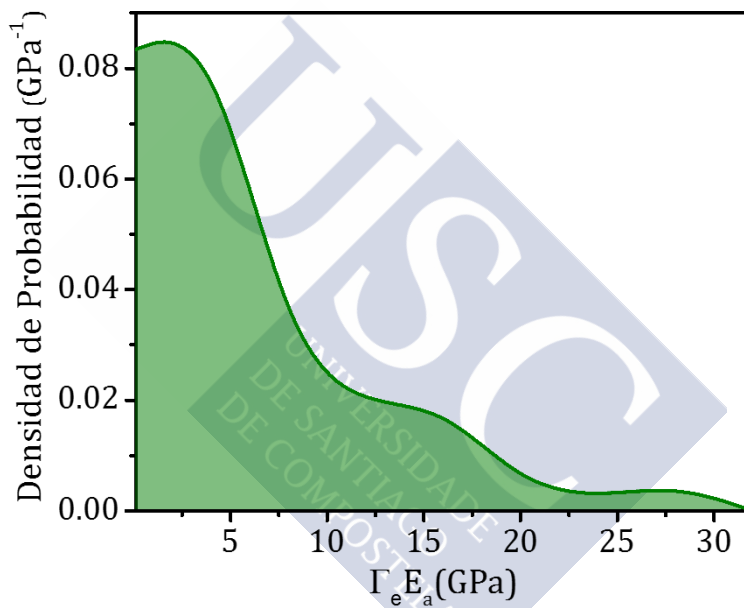


Figura 5.21. Densidad de probabilidad de la rigidez efectiva obtenida a partir de los 189 saltos de la frecuencia relativa, durante la adsorción de las bacterias *E. coli*, calculada utilizando el algoritmo del problema inverso.

La forma de la distribución de la rigidez efectiva puede ser explicada debido a la forma cilíndrica característica de las bacterias *E. coli*. La forma de la función Γ_e para adsorbatos con forma cilíndrica ha sido estudiada en profundidad por Dr. José Jaime Ruz durante la realización de su tesis doctoral, realizando un estudio del virus mosaico del tabaco¹⁶ (TMV), el cual también tiene forma cilíndrica, obteniendo que el valor de la función Γ_e para este tipo de adsorbatos se puede escribir como:

$$\Gamma_e(\alpha, \lambda_a, r, \eta) = p(\lambda_a, r) - g_0(\lambda_a, r, \eta) \cos^4 \alpha - g_{90}(r, \eta) \sin^4 \alpha - g_{45}(\lambda_a, r, \eta) \sin^2 2\alpha \quad (5.35)$$

Donde se ha considerado que la bacteria es un cilindro de radio R_a y longitud L_a . Por lo tanto, redefinimos los parámetros $\eta = \frac{2R_a}{h_c}$ y $\lambda_a = \frac{L_a}{2R_a}$. Es decir, el parámetro λ_a tiene información de cuanto de largo es comparado con su radio, mientras que el término η tiene información de su radio con respecto al espesor de la palanca. Mientras que la definición de $\mu \equiv r = \frac{R_c}{R_a}$, donde R_c es el radio de contacto entre la bacteria y el resonador¹⁶, es decir, el radio de la superficie de la bacteria que está en contacto directo con la palanca.

Para calcular que forma tiene la función densidad de probabilidad Γ_e se realizaron simulaciones de Monte-Carlo generando un total de 100k valores para Γ_e utilizando la ecuación 5.35 y variando los parámetros de acuerdo con los valores observados mediante SEM y microscopía de campo oscuro (figura 5.19). Por lo tanto, el parámetro λ_a se varió siguiendo una distribución normal con media 3.81 y desviación 1.06, mientras que el parámetro η se varió siguiendo una distribución normal de media 0.88 y desviación 0.07, el ángulo de orientación entre 0 y 90 grados de manera aleatoria y el parámetro r entre 0.1 y 0.6. La función de distribución obtenida para estos valores se ajusta perfectamente a la siguiente función:

$$PDF(\Gamma_e) = (a_0 + a_1\Gamma_e + a_2\Gamma_e^2)e^{-c\Gamma_e^2} \quad (5.36)$$

Donde $a_0 = 0.695$, $a_1 = -0.556$, $a_2 = 0.175$ y $c = 0.162$ con un coeficiente $R^2 = 0.992$. La forma de esta función densidad de probabilidad es debida a la diferente contribución que producen los efectos de borde dependiendo del ángulo de adsorción, como se ha explicado anteriormente. Cuando la bacteria es adsorbida longitudinalmente los efectos de borde son pequeños y la rigidez efectiva aumenta mientras que si la adsorción se produce transversalmente los efectos de borde son enormes y la rigidez efectiva será pequeña. El estudio realizado nos permite estimar, por primera vez, el módulo de Young de las bacterias *E. coli* mediante espectrometría nanomecánica. La figura 5.21 representa la rigidez efectiva, que llamaremos $\widetilde{E}_{ef} = \Gamma_e E_a$. Por lo tanto, la función

analítica para el nuevo ajuste utilizada para estimar el módulo de Young, E_a , viene dada por:

$$PDF(\widetilde{E}_{ef}) = \frac{1}{E_a} \left(a_0 + a_1 \frac{\widetilde{E}_{ef}}{E_a} + a_2 \frac{\widetilde{E}_{ef}^2}{E_a^2} \right) e^{-\frac{c\widetilde{E}_{ef}^2}{E_a^2}} \quad (5.37)$$

A partir de la ecuación 5.37 podemos obtener el valor del módulo de Young de las bacterias, ya que el parámetro E_a es el único parámetro libre del ajuste. Por lo tanto, utilizando los valores experimentales obtenemos un valor de $E_a = (4.2 \pm 1) GPa$. En la figura 5.22 se presentan los valores experimentales obtenidos con el espectrómetro, así como el ajuste dado por la ecuación 5.37, del cual se obtiene el valor del módulo de Young de las bacterias. El valor obtenido puede parecer bastante alto para tratarse de entidades biológicas, pero hay que tener en cuenta que ha sido obtenido para bacterias secas, ya que los experimentos se realizan en vacío.

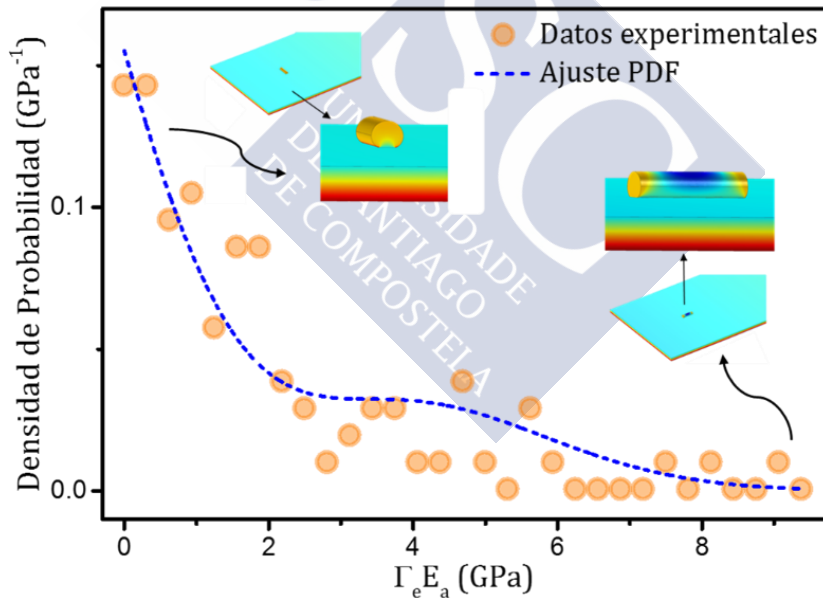


Figura 5.22. Densidad de probabilidad de la rigidez efectiva de las bacterias *E. coli* obtenida después de aplicar el algoritmo del problema inverso a las 189 adsorciones medidas con el espectrómetro de masa y rigidez. El ajuste obtenido a la ecuación 5.37 arroja un valor para el módulo de Young de las bacterias de $(4.2 \pm 1) GPa$. Como se puede ver en los “insets”, los valores de rigidez altos son debidos a la adsorción longitudinal sobre la superficie de la palanca, mientras que los valores bajos se corresponden a adsorciones transversales.

Para corroborar el valor obtenido mediante espectrometría nanomecánica se ha medido el módulo de Young mediante nanoindentación con AFM. Las bacterias caracterizadas han sido previamente nebulizadas con el espectrómetro sobre un sustrato de silicio limpio. Se utiliza el modelo DMT (Derjagin, Muller, Topotov) proporcionado por el software del AFM (Bruker), para la estimación del módulo de Young, el cual puede ser resumido en la siguiente ecuación:

$$F = \frac{4}{3} \frac{E}{(1-\nu^2)} \sqrt{R} \delta^{1/3} \quad (5.38)$$

Donde F es la fuerza aplicada, que se obtiene en la curva de la fuerza a la hora de realizar la indentación, E es módulo de Young, que es el parámetro a ajustar, ν es el ratio de Poisson, R es el radio de la punta y δ es la profundidad de indentación. El AFM utilizado fue un Nanoscope IV Multimode (Bruker) en modo “*PeakForce Tapping*” y la palanca utilizada para la medida tiene una constante elástica de 200 N/m (TAP525, Bruker) con una punta con un radio de curvatura, calibrado previamente mediante AFM y SEM, de 250 nm , aproximadamente.

La figura 5.23a muestra una imagen en AFM de una de las bacterias caracterizadas mediante la técnica de indentación durante este trabajo de tesis doctoral.

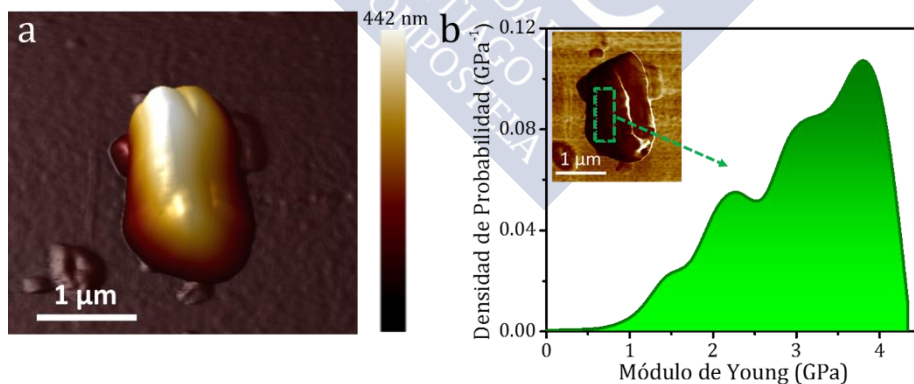


Figura 5.23. a. Imagen de altura de una bacteria *E. coli* caracterizada mediante AFM después de ser nebulizada con el espectrómetro. La altura media de la bacteria es de $460 \pm 20 \text{ nm}$. **b.** Distribución de la densidad de probabilidad del módulo de Young obtenido mediante indentación de la bacteria mostrada en (a) utilizando el modelo DMT. El valor medio del módulo de Young es $3.6 \pm 0.8 \text{ GPa}$.

Los valores del módulo de Young obtenidos para diferentes bacterias *E. coli* depositadas con el espectrómetro y caracterizadas mediante indentación con AFM se encuentran en el rango de 3 – 5 *GPa*, lo cual está en muy buen acuerdo con los resultados obtenidos con el espectrómetro de masa y rigidez. La figura 5.23b muestra la distribución de densidad de probabilidad del módulo de Young obtenido mediante el modelo DMT de la bacteria mostrada en la figura 5.23a. El valor medio obtenido del módulo de Young es de 3.6 ± 0.8 *GPa*. Por lo tanto, la espectrometría de masa y rigidez nanomecánica se postula como un excelente candidato para la caracterización de complejos macromoleculares biológicos intactos, abriendo la puerta a una nueva técnica de clasificación de microorganismos a partir del estudio de sus dos coordenadas ortogonales: su masa y rigidez.

5.5. CONCLUSIONES

En este último capítulo se ha estudiado la teoría en la cual se basa la espectrometría nanomecánica, introduciendo, junto al término de masa, el término de rigidez en el cálculo del cambio relativo en frecuencia producido por la adsorción de partículas sobre la superficie de un resonador nanomecánico. Se ha visto como el término de masa influye en la frecuencia de resonancia haciendo que esta disminuya mientras que, por otro lado, el término de rigidez hace que la frecuencia aumente. El nuevo modelo desarrollado tiene en cuenta la forma del adsorbato y como, debido a su tamaño finito, sus bordes están libres de relajarse, lo cual introduce un nuevo término en la teoría de la espectrometría nanomecánica. Este fenómeno tiene importantes consecuencias como son la dependencia con el ángulo de adsorción sobre la superficie de la palanca, así como también el radio de contacto, es decir, la fuerza de adhesión entre el adsorbato y el resonador, propiedades importantes que hasta el momento no habían sido tenidas en cuenta. La teoría desarrollada permite conocer el cambio relativo en frecuencia producido por un adsorbato, teniendo en cuenta tanto la masa como la rigidez del mismo. A su vez, se ha desarrollado el algoritmo del problema inverso para obtener el término de masa, el término de rigidez y la posición de adsorción a partir de los cambios relativos de la frecuencia de resonancia de varios modos de vibración. El método se

basa en encontrar los valores del término de masa, rigidez y posición de adsorción que maximizan la función de densidad de probabilidad conjunta multinormal para los modos de vibración, es decir, encontrar los valores más probables en masa, rigidez y posición que generen los cambios relativos en frecuencia de los diferentes modos de vibración.

Finalmente se ha comprobado el modelo teórico desarrollado mediante la caracterización de nanopartículas y bacterias. Para la medida de las *GNPs* se ha verificado la teoría mediante la adsorción de siete nanopartículas y su posterior localización mediante SEM y mediante el algoritmo del problema inverso. Se ha calculado la masa para un total de 120 *GNPs* considerando y despreciando la rigidez, demostrando que si no se considera la rigidez se subestima la masa en un 10%. A su vez se ha calculado la rigidez efectiva de las *GNPs* corroborando los resultados con simulaciones por FEM. También se han caracterizado un total de 189 adsorciones de bacterias *E. coli* calculando su término de masa y rigidez mediante el algoritmo del problema inverso. Por último, se ha estimado el valor del módulo de Young a partir de la teoría desarrollada para partículas cilíndricas y se ha corroborado el resultado con medidas mediante indentación por AFM con excelentes resultados.

Los experimentos realizados en este trabajo estiman por primera vez el módulo de Young de entidades biológicas individuales mediante la espectrometría nanomecánica, abriendo las puertas a futuras aplicaciones para la caracterización de complejos biológicos macromoleculares a partir de dos coordenadas ortogonales: término de masa y término de rigidez.



REFERENCIAS

- 1 Angel, T. E. *et al.* Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions. *Chemical Society Reviews* **41**, 3912-3928, doi:10.1039/C2CS15331A (2012).
- 2 Aebersold, R. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198-207 (2003).
- 3 Tamayo, J., Kosaka, P. M., Ruz, J. J., San Paulo, A. & Calleja, M. Biosensors based on nanomechanical systems. *Chemical Society Reviews* **42**, 1287-1311, doi:10.1039/C2CS35293A (2013).
- 4 Anja, B., Søren, D., Stephan Sylvest, K., Silvan, S. & Maria, T. Cantilever-like micromechanical sensors. *Reports on Progress in Physics* **74**, 036101 (2011).
- 5 Yang, Y. T., Callegari, C., Feng, X. L., Ekinci, K. L. & Roukes, M. L. Zeptogram-Scale Nanomechanical Mass Sensing. *Nano letters* **6**, 583-586, doi:10.1021/nl052134m (2006).
- 6 Ekinci, K. L. & Roukes, M. L. Nanoelectromechanical systems. *Review of Scientific Instruments* **76**, 061101, doi:10.1063/1.1927327 (2005).
- 7 ChasteJ *et al.* A nanomechanical mass sensor with yoctogram resolution. *Nat Nano* **7**, 301-304, doi:http://www.nature.com/nnano/journal/v7/n5/abs/nnano.2012.42.html#supplementary-information (2012).
- 8 Ramos, D. *et al.* Optomechanics with silicon nanowires by harnessing confined electromagnetic modes. *Nano letters* **12**, 932-937, doi:10.1021/nl204002u (2012).
- 9 Ramos, D. *et al.* Silicon nanowires: where mechanics and optics meet at the nanoscale. *Scientific reports* **3**, 3445, doi:10.1038/srep03445 (2013).
- 10 Schmid, S., Kurek, M., Adolphsen, J. Q. & Boisen, A. Real-time single airborne nanoparticle detection with nanomechanical resonant filter-fiber. *Scientific reports* **3**, 1288, doi:10.1038/srep01288 (2013).
- 11 Chan, B.-D., Icoz, K., Huang, W., Chang, C.-L. & Savran, C. A. On-demand weighing of single dry biological particles over a 5-order-of-magnitude dynamic range. *Lab on a chip* **14**, 4188-4196, doi:10.1039/C4LC00765D (2014).
- 12 Ritz, W. Über eine neue Methode zur Lösung gewisser Variationsprobleme der mathematischen Physik. *Journal für die reine und angewandte Mathematik* **135**, 1-61 (1909).

- 13 Ritz, W. Theorie der Transversalschwingungen einer quadratischen Platte mit freien Rändern. *Annalen der Physik* **333**, 737-786 (1909).
- 14 Dohn, S., Svendsen, W., Boisen, A. & Hansen, O. Mass and position determination of attached particles on cantilever based mass sensors. *The Review of scientific instruments* **78**, 103303, doi:10.1063/1.2804074 (2007).
- 15 Hanay, M. S. *et al.* Single-protein nanomechanical mass spectrometry in real time. *Nature nanotechnology* **7**, 602-608, doi:10.1038/nnano.2012.119 (2012).
- 16 Ruz, J. J., Tamayo, J., Pini, V., Kosaka, P. M. & Calleja, M. Physics of Nanomechanical Spectrometry of Viruses. *Sci. Rep.* **4**, doi:10.1038/srep06051 <http://www.nature.com/srep/2014/140813/srep06051/abs/srep06051.html#supplementary-information> (2014).
- 17 Ramos, D. *et al.* Detection of bacteria based on the thermomechanical noise of a nanomechanical resonator: origin of the response and detection limits. *Nanotechnology* **19**, 035503 (2008).
- 18 Ramos, D. *et al.* Arrays of Dual Nanomechanical Resonators for Selective Biological Detection. *Analytical Chemistry* **81**, 2274-2279, doi:10.1021/ac8024152 (2009).
- 19 Ruz, J. J. Teoría de sensores nanomecánicos aplicados a la detección biológica. *PhD Tesis* (2016).
- 20 Naik, A. K., Hanay, M. S., Hiebert, W. K., Feng, X. L. & Roukes, M. L. Towards single-molecule nanomechanical mass spectrometry. *Nature nanotechnology* **4**, 445-450, doi:10.1038/nnano.2009.152 (2009).
- 21 Hanay, M. S. *et al.* Inertial imaging with nanomechanical systems. *Nat Nano* **10**, 339-344, doi:10.1038/nnano.2015.32 <http://www.nature.com/nnano/journal/v10/n4/abs/nnano.2015.32.html#supplementary-information> (2015).
- 22 Malvar, O. *et al.* Mass and stiffness spectrometry of nanoparticles and whole intact bacteria by multimode nanomechanical resonators. *Nature communications* **7**, 13452 (2016).
- 23 Ramos, D., Tamayo, J., Mertens, J., Calleja, M. & Zaballos, A. Origin of the response of nanomechanical resonators to bacteria adsorption. *Journal of Applied Physics* **100**, 106105, doi:10.1063/1.2370507 (2006).
- 24 Calleja, M., Kosaka, P. M., San Paulo, A. & Tamayo, J. Challenges for nanomechanical sensors in biological detection. *Nanoscale* **4**, 4925-4938, doi:10.1039/C2NR31102J (2012).

- 25 Kosaka, P. M. *et al.* Detection of cancer biomarkers in serum using a hybrid mechanical and optoplasmonic nanosensor. *Nat Nano* **advance online publication**, doi:10.1038/nnano.2014.250 <http://www.nature.com/nnano/journal/vaop/ncurrent/abs/nnano.2014.250.html#supplementary-information> (2014).
- 26 Gil-Santos, E. *et al.* Nanomechanical mass sensing and stiffness spectrometry based on two-dimensional vibrations of resonant nanowires. *Nature nanotechnology* **5**, 641-645, doi:10.1038/nnano.2010.151 (2010).
- 27 Dohn, S., Schmid, S., Amiot, F. & Boisen, A. Position and mass determination of multiple particles using cantilever based mass sensors. *Applied Physics Letters* **97**, 044103, doi:doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.3473761 (2010).
- 28 Sansa, M. *et al.* Frequency fluctuations in silicon nanoresonators. *Nat Nano* **11**, 552-558, doi:10.1038/nnano.2016.19 <http://www.nature.com/nnano/journal/v11/n6/abs/nnano.2016.19.html#supplementary-information> (2016).
- 29 Sage, E. *et al.* Neutral particle mass spectrometry with nanomechanical systems. *Nature communications* **6**, doi:10.1038/ncomms7482 (2015).
- 30 Roe, B. P. *Probability and statistics in experimental physics*. (Springer Science & Business Media, 2012).
- 31 Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J. & Fernig, D. G. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Analytical Chemistry* **79**, 4215-4221, doi:10.1021/ac0702084 (2007).
- 32 Sader, J. E. Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope. *Journal of Applied Physics* **84**, 64-76, doi:doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.368002 (1998).
- 33 Eysden, C. A. V. & Sader, J. E. Resonant frequencies of a rectangular cantilever beam immersed in a fluid. *Journal of Applied Physics* **100**, 114916, doi:10.1063/1.2401053 (2006).
- 34 Pini, V. *et al.* Spatially multiplexed dark-field microspectrophotometry for nanoplasmonics. *Scientific reports* **6**, 22836, doi:10.1038/srep22836 (2016).
- 35 Malvar, O. *et al.* Highly Sensitive Measurement of Liquid Density in Air Using Suspended Microcapillary Resonators. *Sensors* **15**, 7650-7657 (2015).

- 36 Longo, G. *et al.* Antibiotic-induced modifications of the stiffness of bacterial membranes. *Journal of Microbiological Methods* **93**, 80-84, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.01.022 (2013).
- 37 Loferer-Krößbacher, M., Klima, J. & Psenner, R. Determination of bacterial cell dry mass by transmission electron microscopy and densitometric image analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 688-694 (1998).
- 38 Ebenstein, D. M. & Pruitt, L. A. Nanoindentation of biological materials. *Nano Today* **1**, 26-33, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1748-0132(06)70077-9 (2006).
- 39 Calzado-Martín, A., Encinar, M., Tamayo, J., Calleja, M. & San Paulo, A. Effect of Actin Organization on the Stiffness of Living Breast Cancer Cells Revealed by Peak-Force Modulation Atomic Force Microscopy. *ACS Nano*, doi:10.1021/acsnano.5b07162 (2016).
- 40 Goodacre, R., Heald, J. K. & Kell, D. B. *Characterisation of intact microorganisms using electrospray ionisation mass spectrometry*. Vol. 176 (1999).
- 41 Feijó Delgado, F. *et al.* Intracellular Water Exchange for Measuring the Dry Mass, Water Mass and Changes in Chemical Composition of Living Cells. *PLOS ONE* **8**, e67590, doi:10.1371/journal.pone.0067590 (2013).



APÉNDICE A

A. Métodos de Transducción y Excitación Nanomecánica

A.1. MÉTODOS DE TRANSDUCCIÓN

En este apéndice se describen los diferentes métodos de detección y excitación más comúnmente utilizados con resonadores nanomecánicos, centrándonos en el método de deflexión del haz y la excitación piezoeléctrica, ya que son los métodos utilizados en el espectrómetro de masa y rigidez desarrollado en este trabajo.

Los dispositivos estudiados en esta tesis doctoral son resonadores micro- y nanomecánicos, como estructuras tipo palanca o puente, los cuales requieren técnicas de transducción que permitan monitorizar en tiempo real sus vibraciones con una resolución sub-nanométrica. Los sistemas de medida más utilizados se pueden agrupar en dos grandes grupos: los sistemas ópticos y los sistemas eléctricos. Entre los sistemas de transducción eléctrica destacan la lectura piezorresistiva, la lectura piezoeléctrica, la lectura capacitiva y el efecto túnel, mientras que en los sistemas de transducción ópticos destacan los sistemas interferométricos y las técnicas de deflexión del haz. A continuación, se describirán brevemente los sistemas de transducción eléctrica y óptica más utilizados.

A.1.1. MÉTODOS DE TRANSDUCCIÓN ELÉCTRICA

La piezorresistividad se define como el cambio de la resistividad de un material debido a su deformación. Esta propiedad permite medir el movimiento de los resonadores mediante una medida directa del cambio de su resistencia¹. Para ello es necesario la fabricación de los resonadores con materiales piezoresistivos. Las resistencias típicas en este tipo de resonadores son del orden de $k\Omega$ y la configuración más utilizada es la del tipo puente de Wheatstone. Esta técnica tiene la desventaja de que presentan derivas mecánicas producidos por cambios térmicos propios del efecto Joule, así como la necesidad de realizar conexiones eléctricas externa.

Por otro lado, la lectura piezoeléctrica² requiere la fabricación de resonadores con materiales piezoeléctricos, como por ejemplo ZnO. El efecto piezoeléctrico induce cargas transitorias en la capa piezoeléctrica cuando se deforma el resonador³. La principal desventaja de este método de transducción es la necesidad de realizar contactos eléctricos, así como la necesidad de grandes espesores de materiales piezoeléctricos para una buena transducción de la señal y poseen, además, poca velocidad de lectura, la cual está limitada por el circuito eléctrico.

Otro método de transducción es el método capacitivo⁴. Este método se basa en la medida del cambio de la capacitancia entre un material conductor en el resonador nanomecánico y otro fijo, separados

por una pequeña distancia. La capacitancia entre dos placas plano paralelas es inversamente proporcional a la separación entre ellas, por lo tanto, la sensibilidad del método mejora cuanto menor es la separación. Una de las desventajas de este método son las variaciones producidas por el dieléctrico del medio, por lo que estos sistemas no se pueden utilizar en medios conductores como soluciones con electrolitos tipo sales, así como la necesidad de realizar conexiones eléctricas, al igual que todos los métodos de transducción eléctricos. Por otro lado, tanto los métodos piezoresistivos y piezoeléctricos como los métodos capacitivos tienen la ventaja de ser compactos y de poder realizar la excitación y lectura con el mismo resonador simultáneamente.

Por último, el efecto túnel de los electrones⁵ se produce cuando la distancia entre una punta afilada y un resonador nanomecánico es inferior al nanómetro. Cuando se aplica un voltaje entre la punta y el resonador se produce un flujo de electrones. La corriente túnel depende de la distancia entre el resonador y la punta, por tanto, monitorizando esta corriente se puede medir el movimiento del resonador. Estos sistemas presentan una alta sensibilidad, pero con una respuesta no lineal y un rango dinámico limitado. Además, la fabricación de este tipo de dispositivos requiere de un gran esfuerzo, así como también la necesidad de realizar conexiones eléctricas con el exterior.

A.1.2. MÉTODOS DE TRANSDUCCIÓN ÓPTICA

Por otro lado, los sistemas de lecturas ópticos destacan por su alta sensibilidad, su fácil implementación, la posibilidad de utilizarse en líquidos, así como de ser métodos de detección poco invasivos. Los métodos de transducción óptica se pueden dividir en: métodos interferométricos, métodos de transmisión, métodos de deflexión del haz y métodos optomecánicos.

Los métodos interferométricos se basan en la interferencia constructiva y destructiva que se produce cuando un haz láser se refleja entre dos superficies plano-paralelas. Los métodos interferométricos se caracterizan por tener una alta sensibilidad, por encima de $1 \text{ pm}/\sqrt{\text{Hz}}$, ($1 \text{ pm} = 10^{-12} \text{ m}$), permitiendo la detección de las vibraciones termomecánicas de NW^6 . Como ya se ha visto en el *capítulo 2* una de las

configuraciones más utilizadas es la configuración Fabry-Perrot, la cual se ha utilizado a lo largo de este trabajo de tesis doctoral para la medida de las frecuencias de resonancia de los nanohilos de silicio descrito en el *capítulo 2*. Otra de las configuraciones es la configuración tipo Michelson, en la cual se toma como referencia un espejo fijo, siendo el resonador el otro punto de reflexión del haz. La configuración tipo Michelson es la base de las medidas realizadas en las instalaciones LIGO, las cuales han conseguido la detección de ondas gravitacionales⁷.

Otro método de transducción óptico utilizado a lo largo de esta tesis es el conocido como método de transmisión^{8,9}, (o “*scattering*” hacia delante) el cual se ha utilizado para la medida de los microcapilares de sílice fundido. Este método también ha sido utilizado para la medida de la frecuencia de resonancia de nanohilos. Como ya se ha mencionado, uno de los propósitos del estudio de los *SiNWs* era su posible implementación como sensor en el espectrómetro de masa y rigidez. Se utilizaron nanohilos comerciales de plata/galio (Ag_2Ga) crecidos coaxialmente en la punta afilada de un hilo de tungsteno (NaugaNeedles).

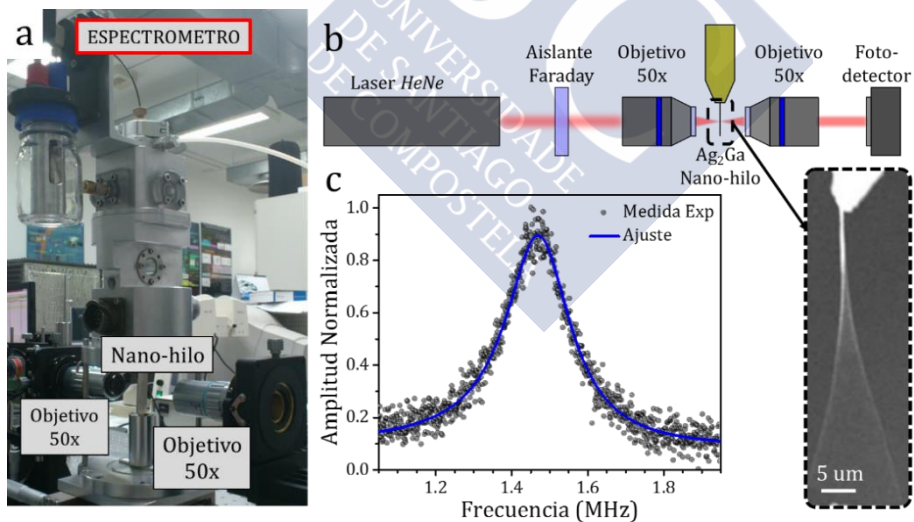


Figura A.1. a. Fotografía del sistema experimental usado para la medida de la frecuencia de resonancia de los NWs de Ag_2Ga mediante el método de transmisión. b. Esquema del método óptico de transmisión utilizado para la medida del ruido termomecánico del NWs. La imagen del SEM muestra la amplitud de vibración del primer modo del NW. c. Espectro termomecánico del primer modo del NW medido en aire ($f = 1.4 \text{ MHz}$).

La figura A.1 muestra el sistema experimental utilizado para la medida de estos resonadores con el primer prototipo del espectrómetro. Para realizar la medida de la resonancia de los nanohilos un láser de HeNe ($\lambda = 633 \text{ nm}$, 10 mW , Newport) es enfocado en el extremo libre del resonador por medio de un objetivo $50x$ (distancia de trabajo 20.5 mm , apertura numérica 0.42 , Mitutoyo) y el haz transmitido es nuevamente enfocado con otro objetivo $50x$ de las mismas características y, finalmente, colimado hacia un fotodetector (PDA10A-EC, Thorlabs Inc.) que recoge la señal dispersada por el resonador. La figura muestra un espectro de resonancia termomecánico de un NW de Ag_2Ga medido en aire. La frecuencia de resonancia es de $1476.6 \pm 0.6 \text{ kHz}$ y el factor de calidad de 7.1 ± 0.1 . Estos resonadores, aun presentando muy buenas características para ser utilizados como sensores gracias a su reducida masa y su alta frecuencia de resonancia, tienen un serio inconveniente debido a su reducida área de detección. Un resonador tipo palanca tiene una mayor superficie de detección, el cual fue uno de los motivos fundamentales para ser elegidos finalmente como sensores en el espectrómetro de masa y rigidez. Estos resonadores unidimensionales podrían utilizarse en el futuro en un espectrómetro de masa y rigidez que consiguiera guiar, mediante cuadrupolos o hexapolos por ejemplo, los analitos al nanohilo.

Por último, los métodos de detección optomecánicos basados en cavidades ópticas presentan la mayor sensibilidad al desplazamiento, pudiendo alcanzar $10^{-18} \text{ m}/\sqrt{\text{Hz}}$, es decir, muy por debajo de lo que mide un átomo¹⁰. El principio físico de detección está basado en el acoplamiento de una cavidad óptica a un resonador nanomecánico. La vibración del resonador varía las dimensiones de la cavidad óptica y, por tanto, si inyectamos luz en la cavidad, la intensidad estará modulada debido a esta vibración¹¹.

A continuación, se describe la técnica de deflexión del haz utilizada en el espectrómetro de masa y rigidez para la medida de la vibración de las micropalancas.

A.1.3. TÉCNICA DE DEFLEXIÓN DEL HAZ

Para la medida de los modos de vibración de los resonadores nanomecánicos tipo palanca utilizados como elementos sensor en el espectrómetro de masa y rigidez, se ha utilizado la técnica de deflexión del haz. Esta técnica consiste en un haz láser, que se enfoca cerca del extremo libre del resonador, y un fotodetector, el cual recoge la señal reflejada en el resonador (figura A.2a).

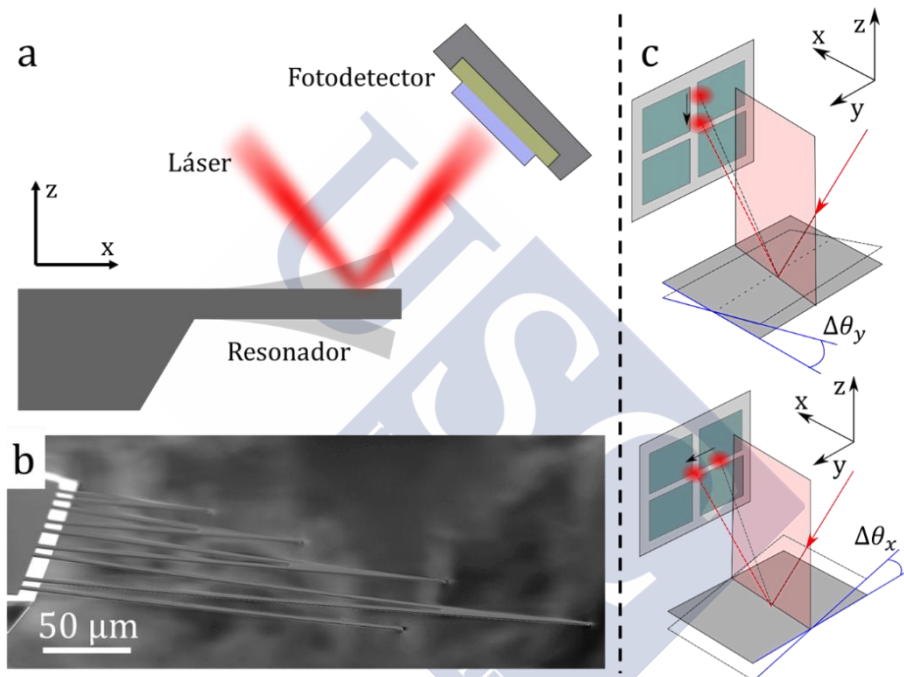


Figura A.2. a. Método de deflexión del haz. Un láser se enfoca cerca del extremo libre del resonador y el haz reflejado es recogido por un fotodetector. b. Fotografía de resonadores tipo palanca y triangulares comerciales utilizados para AFM (Bruker MLCT-010). c. Representación esquemática del desplazamiento del haz láser en el fotodetector debido al cambio de la pendiente entorno a eje X e Y.

El método de deflexión del haz es el más utilizado tanto en AFM como en sensores micro- y nanomecánicos^{12,13}. Mediante este método se puede medir tanto las deflexiones estáticas¹⁴ como las dinámicas de los resonadores^{15,16}. La figura A.2b muestra un chip comercial utilizado en AFM (MLCT-010, Bruker) donde se pueden distinguir cuatro resonadores de nitruro de silicio con forma triangular, con longitudes desde $75\ \mu\text{m}$ a $300\ \mu\text{m}$ y un resonador rectangular con una longitud de

200 μm y 20 μm de ancho. El espesor es de 515 nm con un recubrimiento de 45 nm oro cuya función es mejorar la reflexión del haz láser. El haz láser utilizado para la medida de los resonadores en el espectrómetro de masa y rigidez es de tipo diodo (51nano FI, Schäfter + Kirchhoff) con una longitud de onda $\lambda = (642 \pm 5) \text{ nm}$. El láser se encuentra acoplado a una fibra y mediante un colimador (60FC-T, Schäfter + Kirchhoff) y una lente (13M-60, Schäfter + Kirchhoff) se enfoca cerca del extremo libre del resonador.

El foco del láser es de 60 mm , la distancia de trabajo es de 54 mm , la apertura numérica es de 0.125 y la potencia de láser a la salida es ajustable entre 0 – 21 mW . El láser también cuenta con un aislante Faraday para evitar que las reflexiones externas vuelvan a introducirse en su interior y produzca inestabilidades.

El fotodetector utilizado en la técnica de deflexión del haz puede ser un fotodiodo sensible a la posición, PSD (del inglés “*Position Sensitive Detector*”) o un fotodiodo segmentado. En este último caso, la señal luminosa de cada segmento se convierte en corriente eléctrica de manera independiente. También se han conseguido detectar desplazamientos del orden de Angstroms con fotodetectores no segmentados, localizando el haz reflejado en el borde de la región fotosensible¹⁷. El fotodetector (S4349, Hamamatsu) utilizado en el espectrómetro desarrollado en este trabajo de tesis doctoral está dividido en 4 cuadrantes o segmentos, QPD (del inglés “*Quadrant Photo-Detector*”) como se esquematiza en la figura A.2c. Estos fotodetectores segmentados presentan la ventaja de ser sensibles tanto a los desplazamientos flexurales como a los torsionales, como se deduce de la figura A.2c. La posición a la que se debe enfocar el haz en el resonador para obtener la mayor sensibilidad al desplazamiento depende del modo que se quiera medir, siendo mayor en la zona de mayor pendiente. Por ejemplo, para medir el primer modo flexural la mejor posición es cerca del extremo libre. Mediante esta técnica y la utilización de un sistema de escaneo en 2D se ha conseguido medir matrices de resonadores tipo palancas obteniendo simultáneamente información sobre la topografía estática y la forma de los modos de oscilación¹⁶ flexurales y torsionales. Finalmente, la corriente generada en cada segmento del fotodetector es

amplificada por medio de unos pre-amplificadores I/V (DHPCA-199, FEMTO) y la señal es adquirida por un amplificador digital lock-in (HF2LI, Zurich Instruments) con lazo de seguimiento de fase, PLL (del inglés “*Phase-Locked Loop*”) y multi-frecuencia. Mediante esta técnica se consigue medir varias frecuencias de resonancia simultáneamente de los resonadores utilizados en el espectrómetro con una gran resolución, detectando cambios relativos en frecuencia del orden de ppm¹⁸.

A.2. MÉTODOS DE EXCITACIÓN

Con el fin de excitar los resonadores a sus frecuencias de resonancia se ha utilizado un método de excitación mecano-acústica mediante el uso de una cerámica piezoeléctrica. Principalmente, la necesidad de excitar los resonadores es debida a dos motivos: por un lado, la amplitud de vibración por ruido termomecánico suele ser sub-nanométrica lo cual complicaría su detección, y por otro lado para realizar el seguimiento de las frecuencias de resonancia mediante un PLL es necesario tener la fase bien definida, por lo tanto, es necesario excitar el resonador.

Existen diferentes métodos de excitación como por ejemplo la excitación electrostática¹⁹, magnética²⁰, piezoeléctrica²¹, térmica²² o por efecto Joule²³, magnetostrictiva²⁴, o mediante métodos ópticos como la excitación foto-térmica²⁵ o por fuerzas ópticas²⁶. A continuación, se describe la excitación piezoeléctrica, ya que es el método de excitación utilizado en este trabajo, tanto para los resonadores utilizados en el espectrómetro (*capítulos 4 y 5*), como para el microcapilar de sílice utilizado como densímetro (*capítulo 3*).

A.2.1. EXCITACIÓN PIEZOELÉCTRICA

En el caso del espectrómetro y del microcapilar de sílice se ha utilizado una cerámica piezo-eléctrica la cual va adherida al resonador. En el espectrómetro, el soporte de teflón de la campana del sensor descrita en la sección 4.3.3 está diseñada para albergar una cerámica piezo-eléctrica de $5\text{ mm} \times 5\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ (PICMA®, PImicos). Mediante cinta de carbono se adhiere el chip que contiene los resonadores encima de la cerámica. De esta forma se consigue que la vibración se transmita

de manera eficiente. Mediante la aplicación de una diferencia de voltaje entre los extremos del material piezo-eléctrico se produce la dilatación y contracción del material, actuando sobre la micropalanca. Se trata de un sistema de excitación sencillo, pero que presenta una serie de desventajas como, por ejemplo, la aparición de resonancias espurias provenientes del chip, del propio soporte o del líquido que lo rodea²⁷. Además, este método de excitación está limitado por su ancho de banda, a diferencia de los métodos ópticos los cuales pueden alcanzar frecuencias mucho mayores. Las cerámicas piezo-eléctricas utilizadas en este trabajo llegan a frecuencias de resonancia del orden de 600 kHz, pudiendo excitar a frecuencias mayores, pero degradando considerablemente su amplitud.





REFERENCIAS

- 1 Bargatin, I., Myers, E. B., Arlett, J., Gudlewski, B. & Roukes, M. L. Sensitive detection of nanomechanical motion using piezoresistive signal downmixing. *Applied Physics Letters* **86**, 133109, doi:10.1063/1.1896103 (2005).
- 2 Saadon, S. & Sidek, O. A review of vibration-based MEMS piezoelectric energy harvesters. *Energy Conversion and Management* **52**, 500-504, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2010.07.024 (2011).
- 3 Karabalin, R. B., Villanueva, L. G., Matheny, M. H., Sader, J. E. and Roukes, M. L. Stress-Induced Variations in the Stiffness of Micro- and Nanocantilevers Beams. *Phys. Rev. Lett.* **108**, 236101, doi:https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.108.236101 (2011).
- 4 Yang, Y. T., Callegari, C., Feng, X. L., Ekinci, K. L. & Roukes, M. L. Zeptogram-Scale Nanomechanical Mass Sensing. *Nano letters* **6**, 583-586, doi:10.1021/nl052134m (2006).
- 5 Ionescu, A. M. & Riel, H. Tunnel field-effect transistors as energy-efficient electronic switches. *Nature* **479**, 329-337 (2011).
- 6 Gil-Santos, E., Ramos, D., Pini, V., Llorens, J., Fernández-Regúlez, M., Calleja, M., Tamayo, J. and San Paulo, A. Optical back-action in silicon nanowire resonators: bolometric versus radiation pressure effects. *New Journal of Physics* **15**, 035001, doi:10.1088/1367-2630/15/3/035001. (2013)
- 7 Collaboration, L. S. *et al.* Observation of Gravitational Waves from a Binary Black Hole Merger. *Physical Review Letters* **116**, 061102 (2016).
- 8 Sanii, B. & Ashby, P. D. High Sensitivity Deflection Detection of Nanowires. *Physical Review Letters* **104**, 147203 (2010).
- 9 Malvar, O. *et al.* Highly Sensitive Measurement of Liquid Density in Air Using Suspended Microcapillary Resonators. *Sensors* **15**, 7650-7657 (2015).
- 10 Gil-Santos, E., Baker, C., Nguyen, D. T., Hease, W., Gomez, C., Lemaître, A., Ducci, S., Leo, G. and Favero, I. High-Frequency nano-optomechanical disk resonators in liquids. *Nature Nanotechnology* **10**, 810-817. doi:10.1038/nnano.2015.160 (2015).

- 11 Ramos, D., Gil-Santos, E., Pini, V., Llorens, J, Fernández-Regúlez, M., San Paulo, A., Calleja, M. and Tamayo, J. Optomechanics with silicon nanowires by harnessing confined electromagnetic modes. *Nano Letters* **12**, 932-937. doi: dx.doi.org/10.1021/nl201002u. (2012)
- 12 Meyer, G. & Amer, N. M. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* **53**, 1045-1047, doi:10.1063/1.100061 (1988).
- 13 Meyer, G. & Amer, N. M. Simultaneous measurement of lateral and normal forces with an optical-beam-deflection atomic force microscope. *Applied Physics Letters* **57**, 2089-2091, doi:10.1063/1.103950 (1990).
- 14 Domínguez, C. M. *et al.* Hydration Induced Stress on DNA Monolayers Grafted on Microcantilevers. *Langmuir*, doi:10.1021/la501865h (2014).
- 15 del Rey, M. *et al.* Monitoring swelling and deswelling of thin polymer films by microcantilever sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **204**, 602-610, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.08.021 (2014).
- 16 Javier, T. *et al.* Imaging the surface stress and vibration modes of a microcantilever by laser beam deflection microscopy. *Nanotechnology* **23**, 315501 (2012).
- 17 Karabacak, D., Kouh, T., Huang, C. C. & Ekinci, K. L. Optical knife-edge technique for nanomechanical displacement detection. *Applied Physics Letters* **88**, 193122, doi:10.1063/1.2203513 (2006).
- 18 Malvar, O. *et al.* Mass and stiffness spectrometry of nanoparticles and whole intact bacteria by multimode nanomechanical resonators. *Nature communications* **7**, 13452 (2016).
- 19 Chia-Hua, C. *et al.* A low actuation voltage electrostatic actuator for RF MEMS switch applications. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **17**, 1649 (2007).
- 20 Bell, D. J., Lu, T. J., Fleck, N. A. & Spearing, S. M. MEMS actuators and sensors: observations on their performance and selection for purpose. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **15**, S153 (2005).
- 21 Koganezawa, S. *et al.* Dual-stage actuator system for magnetic disk drives using a shear mode piezoelectric microactuator. *IEEE Transactions on Magnetics* **35**, 988-992, doi:10.1109/20.753821 (1999).
- 22 Butler, J. T., Bright, V. M. & Cowan, W. D. Average power control and positioning of polysilicon thermal actuators. *Sensors and Actuators*

- A: *Physical* **72**, 88-97, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0924-4247\(98\)00211-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-4247(98)00211-8) (1999).
- 23 Sehr, H. *et al.* Time constant and lateral resonances of thermal vertical bimorph actuators. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **12**, 410 (2002).
- 24 Penedo, M., Fernández-Martínez, I., Costa-Krämer, J. L., Luna, M. & Briones, F. Magnetostriction-driven cantilevers for dynamic atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* **95**, 143505, doi:[10.1063/1.3237180](https://doi.org/10.1063/1.3237180) (2009).
- 25 Ramos, D., Mertens, J., Calleja, M. & Tamayo, J. Photothermal self-excitation of nanomechanical resonators in liquids. *Applied Physics Letters* **92**, -, doi:[doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.2917718](http://dx.doi.org/10.1063/1.2917718) (2008).
- 26 Gil-Santos, E. *et al.* Optical back-action in silicon nanowire resonators: bolometric versus radiation pressure effects. *New Journal of Physics* **15**, 035001, doi:[10.1088/1367-2630/15/3/035001](https://doi.org/10.1088/1367-2630/15/3/035001) (2013).
- 27 Asakawa, H. & Fukuma, T. Spurious-free cantilever excitation in liquid by piezoactuator with flexure drive mechanism. *Review of Scientific Instruments* **80**, 103703, doi:[10.1063/1.3238484](https://doi.org/10.1063/1.3238484) (2009).





CONCLUSIONES GENERALES

Este trabajo de tesis doctoral se ha centrado en el desarrollo de un espectrómetro de masa y rigidez, tanto para partículas inorgánicas como para entidades biológicas. A lo largo de la tesis se ha estudiado diferentes tipos de resonadores, tanto desde un punto de vista teórico como experimental, incluyendo el estudio de nanohilos de silicio cónicos y microcapilares resonantes de sílice fundido, así como de micropalanca de silicio y de nitruro de silicio.

Se han desarrollado modelos matemáticos que tiene en cuenta el grado de conicidad de los $SiNW$ y que ponen de manifiesto su incremento en sensibilidad gracias a esta característica, normalmente indeseable a la hora de la fabricación de resonadores. Para nanohilos con un grado de conicidad $\alpha > 0.8$ la mínima masa detectable se mejora en más de un orden de magnitud si lo comparamos con un nanohilo uniforme. Tanto la forma del modo como la frecuencia de resonancia de los nanohilos dependen fuertemente de su grado de conicidad. Un efecto interesante de la dependencia del grado de conicidad con la frecuencia de resonancia es la posibilidad de calcular la conicidad de un nanohilo midiendo los dos primeros modos flexurales de vibración a partir de una sencilla ecuación, evitándonos, de esta manera, la necesidad de una caracterización mediante SEM.

Del mismo modo se han estudiado microcapilares resonantes de sílice fundido. Se ha implementado un sencillo sistema experimental como sensor de densidad de masa de líquidos en tiempo real y a presión atmosférica. El sistema experimental consta de un microcapilar comercial, un láser y un fotodetector. El láser se hace incidir sobre el centro de la región suspendida del microcapilar y el haz transmitido es recogido por un fotodetector. Por medio de una cerámica piezo-eléctrica se excita el capilar en torno a su frecuencia de resonancia y mediante un amplificador lock-in con PLL se consigue seguir en el tiempo la frecuencia de resonancia. El sensor se basa en que cuando un líquido fluye por el interior del capilar su frecuencia de resonancia cambia en función de la densidad del líquido. Con este sencillo y barato sistema

experimental se ha conseguido un límite de detección en aire de $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ y una responsividad experimental de $0.0314 \text{ mL}/\text{g}$.

Finalmente, el desarrollo de un espectrómetro de masa y rigidez ha permitido la medida, por vez primera, de la masa y rigidez de entidades orgánicas e inorgánicas abriendo la puerta a nuevos sistemas de caracterización basado en estas dos coordenadas ortogonales: término de masa y término de rigidez. El espectrómetro implementado a lo largo de este trabajo de tesis doctoral está formado por tres etapas claramente diferenciadas. La primera se encuentra a presión atmosférica y es donde tiene lugar la nebulización de las partículas por medio de la conocida técnica de electrospray. Las partículas son nebulizadas hacia una segunda etapa que se encuentra a 10 mbar y que contiene un capilar caliente para ayudar a la completa evaporación del solvente y a su vez facilitar el guiado hacia la tercera etapa donde se localiza el resonador nanomecánico y la cual se encuentra a 0.1 mbar . Con el espectrómetro de masa y rigidez nanomecánico se ha medido la masa de nanopartículas de oro de 100 nm de diámetro ($\sim 11 \text{ fg}$) así como la masa de bacterias *E. coli* ($\sim 318 \text{ fg}$) y se ha conseguido estimar, por primera vez, tanto el módulo de Young efectivo de *GNPs* como el módulo de Young de bacterias *E. coli* ($E = 4.2 \text{ GPa}$) mediante resonadores nanomecánicos. También se ha demostrado que si no se tiene en cuenta el término de rigidez en la teoría nanomecánica la masa de los adsorbatos se subestima, lo cual es particularmente importante para el caso de resonadores ultra-finos. Por tanto, la espectrometría de masa y rigidez nanomecánica se postula como una potente herramienta para la clasificación de entidades biológicas intactas por medio de la caracterización de su masa y rigidez.

LISTA DE PUBLICACIONES

1. **O. Malvar**, E. Gil-Santos, J. J. Ruz, D. Ramos, V. Pini, M. Fernández-Regúlez, M. Calleja, J. Tamayo and A. San Paulo. *Tapered silicon nanowires for enhanced nanomechanical sensing*. Applied Physics Letters. 103, **3**, 033101 (2013). DOI: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4813819>
2. D. Ramos, E. Gil-Santos, **O. Malvar**, J. M. Llorens, V. Pini, A. San Paulo, M. Calleja and J. Tamayo. *Silicon nanowires: where mechanics and optics meet at the nanoscale*. Scientific Reports, **3**, 3445. (2013). DOI: 10.1038/srep03445
3. C. M. Domínguez, P. M. Kosaka, G. Mokry, V. Pini, **O. Malvar**, M. del Rey, D. Ramos, A. San Paulo, J. Tamayo and M. Calleja. Hydration induced stress on DNA monolayers grafted on microcantilevers. Langmuir, **30** (36), 10962-10969 (2014). DOI: 10.1021/la501865h
4. **O. Malvar**, D. Ramos, C. M. Domínguez, P. M. Kosaka, J. Tamayo and M. Calleja. *Highly sensitive measurement of liquid density in air using suspended microcapillary resonators*. Sensors, **15** (4), 7650-7657 (2015). DOI: 10.3390/s150407650
5. V. Pini, P. M. Kosaka, J. J. Ruz, **O. Malvar**, M. Encinar, J. Tamayo and M. Calleja. *Spatially multiplexed dark-field microspectrophotometry for nanoplasmonics*. Scientific Reports, **6**, 22836 (2016). DOI: 10.1038/srep22836
6. V. Pini, P. M. Kosaka, J. J. Ruz, **O. Malvar**, M. Encinar, J. Tamayo and M. Calleja. *Spatially multiplexed microspectrophotometry in bright field mode for thin film characterization*. Sensor, **16** (6), 926 (2016). DOI: 10.3390/s16060926

7. **O. Malvar**, J. J. Ruz, P. M. Kosaka, C. M. Domínguez, E. Gil Santo, M. Calleja and J. Tamayo. *Mass and stiffness spectrometry of nanoparticles and whole intact bacteria by multimode nanomechanical resonators*. Nature Communications, **7**, 13452 (2016). DOI: 10.1038/ncomms13452
8. V. Pini, J. J. Ruz, P. M. Kosaka, **O. Malvar**, M. Calleja and J. Tamayo. How two-dimensional bending can extraordinarily stiffen thin sheets. Scientific Reports, **6**, 29627 (2016). DOI: 10.1038/srep29627



PATENTES

1. **O. Malvar**, J. J. Ruz, P. M. Kosaka, M. Calleja and J. Tamayo. *Procedimiento para obtener la position de adsorción, la masa y la rigidez de una partícula*, Ref. 201630443 (2016), patente solicitada, *Nanodreams S.L.*
2. V. Pini, P. M. Kosaka, J. Tamayo, M. Calleja, D. Ramos, **O. Malvar**, J. J. Ruz and M. Encinar. *High-Resolution Spatially Multiplexed Spectral Analysis of Surfaces*, PCT/ES2015/070732 (2015), Licenciada a *Mecwins S.L.*



