

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



**PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL PERÚ**

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DE
NANOMATERIALES DE ORIGEN BIOLÓGICO**

Tesis para optar el Título de Ingeniero Mecánico, que presenta el bachiller:

Fernando Pastor Cavalié Orihuela

ASESOR: Fernando Torres García

Lima, Marzo de 2014

RESUMEN

En la presente tesis se obtuvo las propiedades elásticas del adhesivo de la seda víscida producida por arañas de la especie *Argiope Argentata*. Las muestras de seda de esta especie se obtuvieron a partir de ejemplares capturados en las cercanías a los pantanos de Villa en el distrito de Chorrillos, estos ejemplares fueron criados en amplias cajas de cartón y alimentados con gusanos *tenebrio molitor*, la seda con el adhesivo para desarrollar los ensayos es obtenida de la tela tejida por la propia araña, debido a que este adhesivo sólo es depositado en los hilos circunferenciales de la telaraña.

Para hallar el Módulo de Young o Módulo Elástico de este adhesivo, se realizaron ensayos de nanoindentación con un Microscopio de Fuerza Atómica o AFM por sus siglas en inglés. Al desarrollar este tipo de ensayo sobre un material blando como lo es un adhesivo, se busca obtener la deflexión de la viga en voladizo, o cantiléver (inglés), del AFM y la Fuerza de contacto entre el cantiléver y el adhesivo.

Obtenemos la Deflexión y la Fuerza de contacto para cada punto del ensayo de nanoindentación, entonces usamos el modelo de Hertz para superficies en contacto y aproximamos la relación obtenida al modelo teórico, así hallamos el módulo de elasticidad para cada punto del ensayo de nanoindentación sobre la muestra del adhesivo. Se obtuvieron un total de 208 módulos elásticos sobre las dos muestras obtenidas con mejor resolución del AFM.

Los resultados del módulo de elasticidad hallados se encuentran en su mayoría en el rango de 20 y 100 KPa, adicionalmente y siguiendo el criterio de C. Dahlquist, tendríamos que el adhesivo de esta especie de araña es un adhesivo con muy buenas propiedades adherentes. No se encontró literatura sobre este procedimiento en otras especies de arañas, por lo cual comparamos los datos obtenidos con literatura encontrada de experimentos en adhesivos de insectos u otros sistemas biológicos.

INDICE

Introducción.....	5
Objetivos.....	7
Capítulo 1.- Materiales Biológicos	
1.1. Concepto de materiales biológicos.....	8
1.2. Propiedades en materiales biológicos.....	9
Capítulo 2.- Revisión de la literatura	
2.1. Concepto de Adhesividad.....	14
2.2. Punto de Vista Biológico de la Adhesión	15
2.3. Punto de Vista Físico de la Adhesión	15
2.4. Adhesividad en Sistemas Biológicos.....	16
2.5. Adhesividad en Insectos.....	18
2.6. Propiedades Adhesivas en Insectos.....	20
2.7. Adhesión en la seda de Araña.....	22
2.7.1. Adhesión en la especie Mastophora.....	23
2.7.2. Adhesión en la especie Latrodectus Hesperus.....	23
2.7.3. Adhesión en la especie Orbe.....	24
2.8. Caracterización del Adhesivo de la Seda de araña.....	27
2.9. Estructura de la Gota de Adhesivo.....	27
2.10. Estudio de las Propiedades Adhesivas de la seda de araña.....	29
2.11. Humedad en las gotas de adhesivo.....	32
2.12. Dependencia de la Humedad en la Adhesión.....	35
2.13. Criterio de Dahlquist	42

Capítulo 3.- Parte Experimental

3.1. Microscopio de Fuerza Atómica (AFM).....	43
3.2. Principios básicos del AFM.....	44
3.3. Resolución del Microscopio de Fuerza Atómica.....	45
3.4. Tipos de puntas en un AFM.....	46
3.5. Aislamiento Vibracional para Ensayos	47
3.6. Modos de ensayo en AFM.....	47
3.7. AFM en líquidos.....	53
3.8. Evaluación de propiedades mecánicas.....	53
3.9. Procedimiento Analítico en Ensayos	54
3.10. Muestra experimental.....	58
3.11. Equipo experimental AFM	61
3.12. Desarrollo de los ensayos.....	63
3.13.- Procedimiento para el cálculo del Módulo de Elasticidad.....	79

Capítulo 4.- Resultados y Discusiones

4.1. Resultados.....	84
4.2. Resumen de Resultados.....	87
4.3. Discusiones.....	88
Conclusiones	90
Recomendaciones	91
Bibliografía	92

Anexos

INTRODUCCIÓN

Una de las propiedades más complejas y estudiadas, dentro de los materiales biológicos en todas sus escalas es la adhesión, los adhesivos producidos naturalmente son comunes en muchos sistemas biológicos y son conocidos por su mayor fuerza de adherencia y durabilidad comparada con los materiales sintéticos. La adhesión en la seda de araña, que será el objeto principal de estudio de esta tesis, se debe a proteínas adhesivas a través de distintos tipos de seda con propiedades que aún no han sido adaptadas en algún tipo de polímero sintético, esta forma de adhesión se produce mediante gotitas de pegamento adheridas a la seda las cuales no son visibles a simple vista, sino con la ayuda de un microscopio.

En la naturaleza existen muchas especies que poseen propiedades de adhesión para su sobrevivencia, los Geckos por ejemplo son una especie de lagarto que en sus dedos tienen un arreglo laminar de microvellosidades, lo que les permite poder escalar cualquier superficie sin problemas, la alta densidad de estas microvellosidades aumentan al área real de contacto con una superficie, lo que permite que la adhesión se desarrolle a través de fuerzas de van der Waals. Las esporas de ciertas algas verdes (*Enteromorpha linza*) producen una glicoproteína adhesiva que proporciona un anclaje a un sustrato para poder desarrollarse. El pegamento producido por el gusano "Castillo de Arena", ha sido usado como modelo para la fabricación de adhesivos sintéticos desarrollados con compuestos químicos que presentan los mismos grupos funcionales que le brindan a la goma de este gusano las propiedades adhesivas. De la misma forma la proteína DOPA (dihidroxifenilalanina) presente en los adhesivos de los mejillones ha inspirado la utilización de compuestos de estructura química similar para desarrollar nuevos adhesivos; el adhesivo producido por los mejillones es incluso más fuerte que otros adhesivos sintéticos a base de polímeros como las resinas epóxicas y fenólicas, además presentan flexibilidad y elasticidad.

Todos los mecanismos de adhesión en los organismos vivos se desarrollan en presencia de agua, motivo por el cual, para ser útiles en diferentes aplicaciones existe una necesidad de desarrollar materiales con propiedades adhesivas en ambientes acuosos y con capacidad de biocompatibilidad; los adhesivos comerciales a base de compuestos sintéticos fenólicos, son remplazados por taninos y lignina, biopolímeros que son extraídos de la madera, y que en algunos casos mejoran las propiedades adhesivas, por lo que se usan extensivamente en la industria.

La araña también es capaz de producir seda adhesiva, compuesta por la fibra o seda y el pegamento: la fibra de seda axial es segregada por la glándula Flageliforme, y el adhesivo o pegamento es segregado por la glándula Agregada de la araña, el cual está conformado en su mayoría por glicoproteínas. Este adhesivo suele estar distribuido a lo largo de la seda, en los dos tipos conocidos como seda viscosa y seda cribellar, las cuales son consideradas uno de los adhesivos más fuertes y efectivos de origen biológico

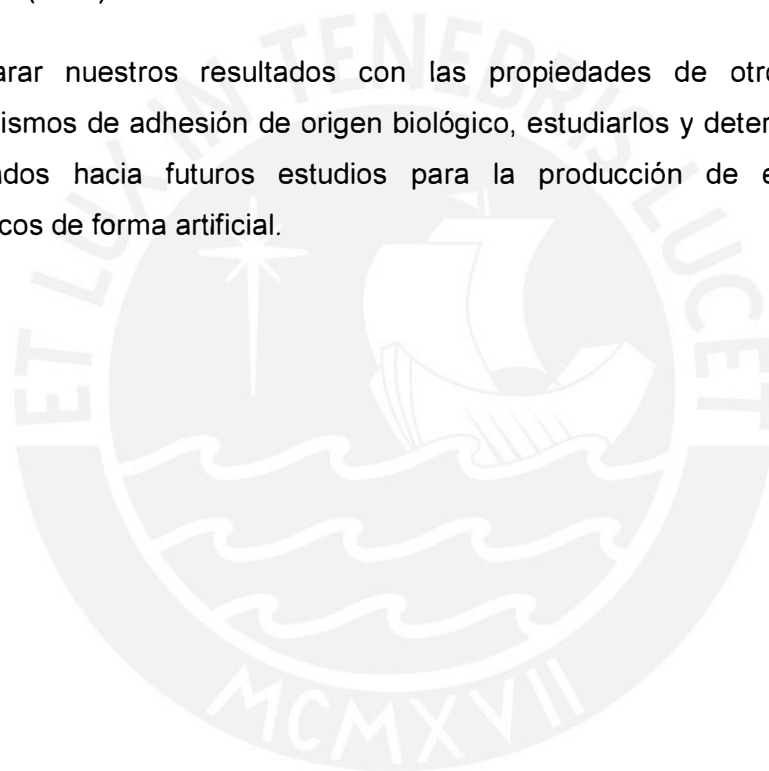
Se han reportado diversas aplicaciones para los bioadhesivos en la biomedicina, por ejemplo, se utilizan bioadhesivos para imitar los procesos de regeneración biológica en el crecimiento de células, con lo cual se proporcionan los factores microambientales necesarios para optimizar el crecimiento celular y la regeneración de los tejidos, de este modo, con el bioadhesivo se elimina la necesidad de suturas y se reduce el riesgo de infecciones en la herida.

También se han usado bioadhesivos en la construcción de biosensores, los biosensores combinan las capacidades de reconocimiento molecular de la biología con la capacidad de procesamiento de señales de los dispositivos electrónicos, con el fin de fabricar biosensores, los adhesivos son necesarios para integrar los componentes biológicos en micro dispositivos electrónicos. Hay estudios publicados sobre el uso de bioadhesivos en la administración de fármacos para localizar los sistemas de entrega en los sitios específicos, ya sea para el tratamiento local o para la liberación prolongada del fármaco.

Encontramos que las aplicaciones de estos adhesivos de origen biológico son diversas y en distintos campos del desarrollo humano como también en la ingeniería. En la presente tesis hemos caracterizado a uno de estos adhesivos biológicos mediante sus propiedades elásticas, teniendo una base científica de la formación microestructural del material.

OBJETIVOS

- Estudiar la morfología y comportamiento de las gotas de adhesivo de la seda de araña de la especie *Argiope Argentata*.
- Estudiar el comportamiento elástico, mediante el Módulo de Young o Módulo de Elasticidad, de las gotas de adhesivo de la seda de araña de la especie *Argiope Argentata*; mediante ensayos de Nanoindentación con un Microscopio de Fuerza Atómica (AFM).
- Comparar nuestros resultados con las propiedades de otros adhesivos o mecanismos de adhesión de origen biológico, estudiarlos y determinar resultados orientados hacia futuros estudios para la producción de estos materiales biológicos de forma artificial.



CAPITULO 1.- MATERIALES BIOLÓGICOS

1.1. Concepto de Materiales Biológicos

La mayoría de materiales biológicos son compuestos complejos cuyas propiedades mecánicas consideramos sobresalientes si tenemos en cuenta los elementos que las forman; estas estructuras complejas que han evolucionado en cientos de millones de años son inspiradores científicos para el diseño de nuevos materiales.

Tienen características que los definen: la multifuncionalidad, la capacidad de regeneración o auto-sanación, la auto-organización (también característica fundamental de muchos materiales biológicos)[1], la manera en como las estructuras se ensamblan a partir del nivel molecular, a partir de los aminoácidos 20, proceden a polipéptidos, polisacáridos, y polipéptidos-sacáridos, estos a su vez conforman las proteínas básicas que son los componentes principales de los tejidos blandos y también están presentes en la mayoría de los biominerales.

Los llamados materiales funcionales biológicos, tienen una estructura desarrollada para una función específica, como: adhesión, propiedades ópticas, etc. Como consecuencia de esto tenemos la búsqueda de materiales y estructuras llamadas "bioinspiradas", los estudios se centran en las metodologías de diseño de materiales biológicos usando materiales sintéticos convencionales. Las nuevas fronteras residen en la síntesis de materiales a través de procesos bioinspirados que son característicos de los sistemas biológicos, los cuales implican una escala nanométrica en el ensamblaje de sus componentes y el desarrollo de sus estructuras, aunque este enfoque ya se encuentra en proceso, con el tiempo conducirá a un extenso de nuevos sistemas de materiales con sus mecanismos fundamentales de crecimiento y su estructura a nivel biológico.

El estudio de los sistemas biológicos como estructuras se remonta a los primeros años del siglo veinte, el trabajo realizado por D'Arcy W. Thompson, publicado por primera vez en 1917, puede considerarse como el primer gran trabajo en este campo. Consideró a los sistemas biológicos como estructuras de ingeniería y obtuvo relaciones que describen su forma. Muchos sistemas biológicos tienen propiedades mecánicas que son mejores de los que se pueden lograr utilizando materiales sintéticos, este es un hecho sorprendente, si tenemos en cuenta que los polímeros básicos y los minerales utilizados en los sistemas naturales son bastante débiles.

El campo de los materiales biológicos introduce nuevas oportunidades a los científicos para resolver problemas multidisciplinarios complejos, algunas características son específicas y únicas en los materiales biológicos, muchas de las cuales son distintivas como resultado de la evolución.

Aunque la biología es una ciencia madura, el estudio de los materiales y sistemas biológicos por la Ingeniería y Ciencia de los Materiales es reciente y tiene dentro de sus objetivos: proporcionar las herramientas para el desarrollo de materiales inspirados en la biología, este campo es también llamado biomimética, que está atrayendo cada vez más la atención y es una de las nuevas fronteras en la investigación de materiales; otro objetivo es el que podamos mejorar nuestra comprensión en la interacción de los materiales sintéticos y estructuras biológicas con el objetivo de permitir la introducción de sistemas nuevos y complejos en el cuerpo humano, que conduzcan finalmente a la suplementación y sustitución de órganos, estos son los llamados biomateriales [2].

El alcance y la complejidad de la materia son enormes y requieren muchas décadas de esfuerzo de investigación, por lo tanto, se han centrado los estudios en una serie de sistemas que han despertado un especial interés; esto no es de ninguna manera una lista exhaustiva porque hay muchos sistemas que sólo han sido investigados superficialmente, actualmente se investigan muchos organismos biológicos como: el abulón, las conchas marinas, la clara del huevo, el exoesqueleto de cangrejo, la seda de la araña, entre otros.

1.2. Propiedades en Materiales Biológicos

Los mapas de propiedades mecánicas, más conocido como mapas Ashby, se han convertido en una manera muy conveniente de concentrar una gran cantidad de información respecto a diferentes aspectos de materiales según su clasificación, en un sencillo diagrama [3].

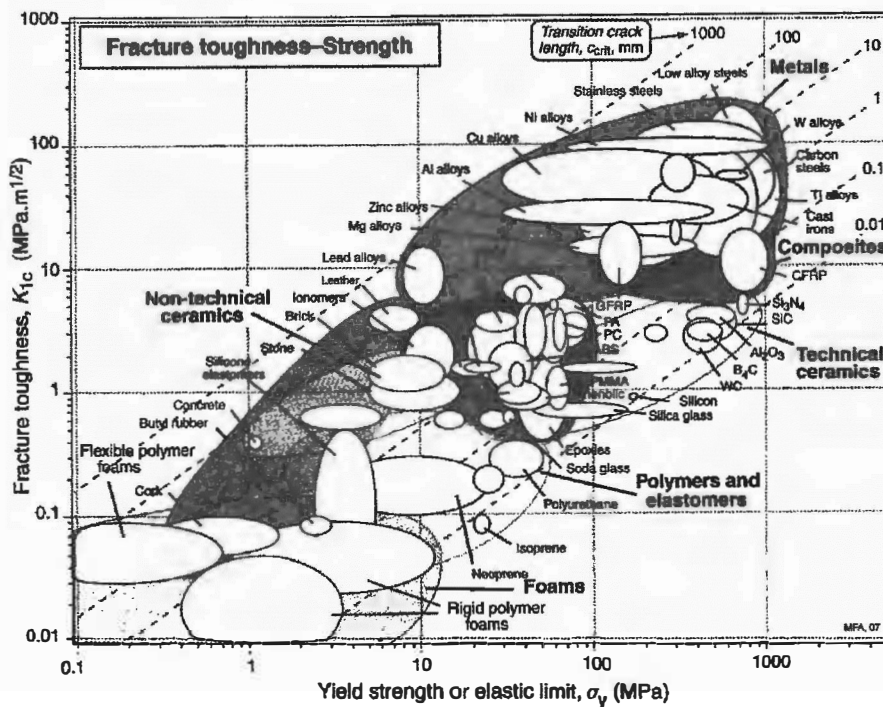
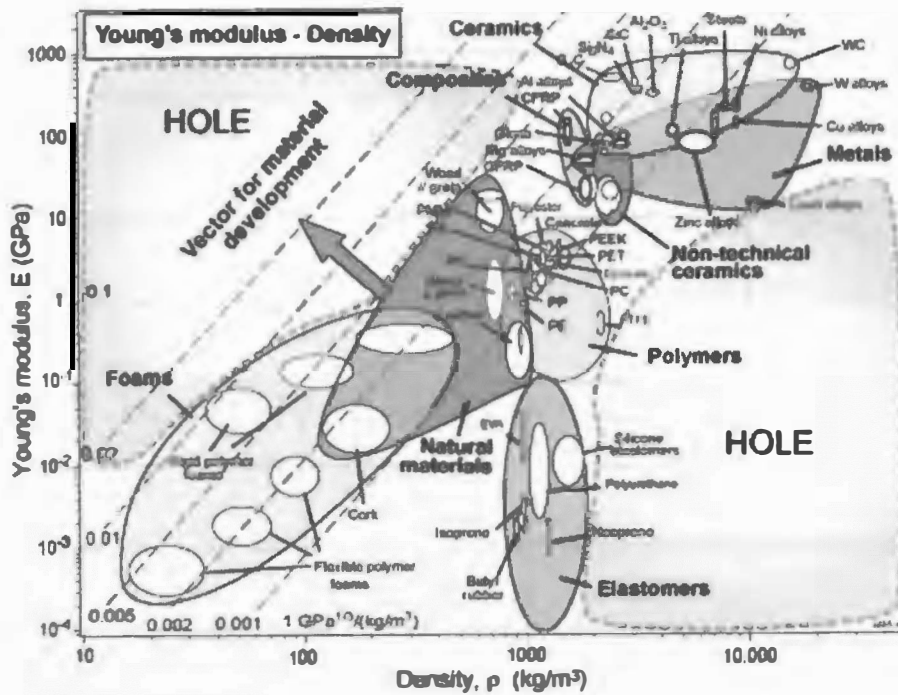


Figura 1.1: Mapas de Ashby, Módulo de Young VS Densidad, Tenacidad VS Limite Elástico.

Fuente: Biological materials: Structure and mechanical properties [3]

Esta es una valiosa herramienta que se ha extendido a los materiales biológicos, por lo tanto son un buen punto de partida y base para las investigaciones. En la Figura 1.1 se presentan dos mapas que presentan el Modulo de Young y la Fuerza en función de la densidad:

La densidad de los sistemas naturales (biológicos) es baja. Rara vez supera los 3, mientras que en la estructura de materiales sintéticos se encuentra en el intervalo de 4 a 10.

Hay una amplia gama de Módulos de Young desde 0,001 hasta 100 GPa. Este representa cinco órdenes de magnitud.

El rango de la Fuerza es casi tan amplio como los Módulos de Young, variando más de cuatro órdenes de magnitud: 0,1 a 1000 MPa.

En la figura 1.1 clasificamos a los materiales biológicos en cuatro grupos:

1. Cerámicos y compuestos cerámicos: se trata de materiales biológicos donde el componente mineral es prevalente como en conchas marinas, dientes, huesos, espículas de esponjas, etc.
2. Polímeros y compuestos poliméricos: ejemplos de ello son las patas o llamadas pezuñas de los mamíferos, los ligamentos y tendones, la seda y exoesqueletos de artrópodos.
3. Elastómeros: estos son característicamente materiales biológicos flexibles que pueden sufrir grandes deformaciones, por ejemplo: la piel, los músculos, los vasos sanguíneos, los tejidos blandos en el cuerpo, y las células individuales se incluyen en esta categoría.
4. Materiales celulares: son los materiales ligeros que se encuentran con frecuencia en las plumas, interior del pico en aves, hueso esponjoso, y la madera.

El campo de los materiales biológicos representa un componente cada vez mayor en la Ciencia e Ingeniería de los Materiales, ya que siempre se dedicó mayor interés al estudio e investigación de los metales, cerámicas, polímeros y sus compuestos. La expansión en materiales biológicos agrega un nivel de complejidad que es sin duda un reto para muchos investigadores.

El aumento de la disponibilidad de pruebas a nanoescala, caracterización, y métodos de modelado, ofrecen y seguirán ofreciendo las herramientas necesarias para avanzar en la comprensión del comportamiento de las estructuras en los materiales biológicos. Las principales herramientas experimentales y de análisis son las siguientes:

Pruebas a nanoescala: Nanoindentación, pinzas ópticas.

Caracterización a nanoescala: TEM, AFM, Emisiones de campo SEM.

Modelado a nanoescala: Dinámica molecular (MD).

Entonces, las características únicas que definen a los materiales biológicos son [4]:

El Auto-ensamblaje: Se montan por primera vez en el nivel molecular, luego las estructuras se construyen al formar la base.

Estructura Jerárquica: la estructura varía en su arquitectura con la escala, los diferentes niveles jerárquicos operan de manera sinérgica.

Los materiales biológicos son, en su mayoría, producidos en un medio acuoso y a temperatura ambiente.

Multi-funcionales: Muchos de los componentes de los sistemas biológicos deben tener más de una función, mientras que en los sistemas sintéticos a menudo se separa la estructura de la función del componente.

Auto-regeneración: La mayoría de los materiales biológicos tienen como función la capacidad de auto curarse, esto parece ser un resultado directo del auto-ensamblaje, debido a que el crecimiento no se dicta a partir de un esquema general, pero se produce a nivel local, de abajo hacia arriba, sintiendo cada molécula su entorno directo y respondiendo al mismo.

Los materiales y el diseño están íntimamente relacionados y son inseparables de los materiales biológicos, este no ha sido el caso de las estructuras hechas por el hombre, donde el proceso de diseño exige estándares, materiales, etc; donde el desarrollo de materiales y la evolución en el diseño han seguido diferentes cursos [5]. Otra diferencia que define a los sistemas biológicos es que son "*nacidas*", en lugar de "*fabricadas*", este es un resultado directo de su característica de auto-ensamblaje y está en contraste

con muchos procesos de fabricación sintéticos, en la que el conjunto de componentes está dictado desde un plano global, lo cual tiene un efecto profundo en su estructura, ya que pueden someterse a ajustes estructurales como el cambio de cargas; por ejemplo, un hueso se someterá a la deposición en las regiones donde las tensiones son más altas, lo mismo sucede en el crecimiento de los árboles: el tronco y las ramas se espesan donde las tensiones son mayores; esta función se denomina "*Diseño de adaptación mecánica*".

La naturaleza lleva a cabo la función de tener una amplia gama de propiedades mecánicas con un número limitado de materiales, la disponibilidad de los materiales en los sistemas biológicos es dictada por sus dos restricciones generales: temperatura ambiente y medio ambiente acuoso, por lo tanto, es el complejo e ingenioso diseño de los sistemas de materiales que produce la amplia gama de propiedades mecánicas disponibles para ellos.

Las propiedades a estas condiciones de un componente muy investigado como la seda de araña, también son de mucho interés para el estudio científico, y se ha tomado como tema para el presente trabajo. La propiedad mecánica de adhesión que tiene la seda de araña a través de las pequeñas gotas de adhesivo que se sitúan a lo largo del hilo, son estudiadas para desarrollar adhesivos y para diferentes usos, estas gotitas adhesivas son segregadas por una de las glándulas de la araña, estudiaremos entonces la propiedad de adhesión que tiene la seda de la araña gracias a estas gotas de pegamento.

CAPITULO 2.- REVISION DE LA LITERATURA

2.1. Concepto de Adhesividad

Según la sociedad americana de Mediciones y Materiales (ASTM) se denomina a un material como adhesivo si es necesario aplicar una fuerza para separarlo inmediatamente después de entrar en contacto con el; los materiales adhesivos son diseñados para resistir esfuerzos de separación normales y transversales, estos requerimientos son difíciles de conseguir simultáneamente y son de importancia en muchos campos de la industria.

Si al juntar dos cuerpos se necesita energía para separarlos entonces están adheridos, cuando se utiliza un buen adhesivo, la energía requerida para separarlos puede variar de 100 a 1000 J/m², mucho mayor que las energías de superficie normales que varían en el rango de 0,01-0,1 J/m², por lo general un adhesivo es un material blando que no es un fluido, hecho de polímeros cuya arquitectura molecular puede variar (Polímeros reticulados, Co-polímeros de bloque) [6]. En la escala molecular el contacto entre el adhesivo y el sustrato generalmente es el resultado de la llamada fuerza de Van der Waals, los enlaces químicos en la superficie y el alargamiento; sin embargo pueden aumentar significativamente la resistencia de la interfaz en pares específicos de sustratos adhesivos. En la industria es especial el tratamiento de las superficies porque influirán mucho en la unión de materiales adhesivos [7].

Las interacciones fuertes en la escala molecular no aseguran que el contacto sea bueno en escalas de longitud más grandes: sustratos sólidos usualmente presentan algún grado de rugosidad de la superficie lo que puede reducir el grado de intimidad del contacto con el adhesivo. Esto explica el criterio introducido empíricamente por Dahlquist como un límite superior en el módulo de elasticidad de un material ($G < 10^5$ Pa) para ser pegajoso: si el material es altamente deformable, puede haber un buen contacto a pesar de la rugosidad de la superficie a través de interacciones en la escala molecular, sin necesidad de aplicar presión; por el contrario, el contacto puede permanecer pobre incluso bajo una presión razonable si el material adhesivo es demasiado rígido. Para los adhesivos blandos, la rugosidad de la superficie del sustrato puede paradójicamente mejorar la fuerza de la interfaz.

El estudio de la adhesividad está lleno de paradojas y fenómenos aun sin conocer, un detalle importante es que una sustancia no es adhesiva por si misma, sino que depende también del espesor, rigidez, las propiedades mecánicas y superficiales del elemento usado para evaluar la adhesividad de la muestra, uno solo de estos parámetros no puede explicar las propiedades sino más bien la suma de todos ellos. La rugosidad de las superficies de contacto es muy importante, mientras mayor sea el área de contacto entre las superficies mayor será la interacción entre ellas y la adhesividad aumentará.

Otro factor importante son las heterogeneidades en la muestra que aparecen durante la separación o que están ya presentes inicialmente. La aparición de cavidades conocido como cavitación posibilita la deformación apreciable de la muestra manteniendo una fuerza no despreciable para producir la separación. Estas micro cavidades aumentan la fuerza de adhesión al momento de la separación hasta romperse, las micro cavidades interfaciales y la viscosidad retardan la propagación de fracturas del material desde sus bordes, produciendo una forma circular un instante antes de romperse; la interface durante la separación puede ser inestable permitiendo entrar aire al material adhesivo formando así filamentos o fibras que hacen perder estabilidad.

2.2. Punto de vista Biológico de la adhesión

Las interacciones adhesivas son complejas y no son aun completamente entendidas, los biólogos han identificado y aislado “adhesinas” moleculares responsables de la adhesión celular, estas moléculas se pueden agrupar en cuatro tipos: Integrinos: una familia de membranas de glicoproteínas, Selectinos: otro grupo de membranas de glicoproteínas, la familia “Ig” que son un diverso grupo de moléculas y los Cadherinos [8].

2.3. Punto de vista Físico de la adhesión

En el estudio físico se idealizan conceptos para dar una caracterización principalmente fenomenológica, se basan en que las superficies son suaves y que están en uniforme contacto (para asegurar la alta interacción entre las superficies) y que la energía ganada en el contacto (para poner las superficies juntas) es igual a la energía requerida para su separación, es decir el proceso es energéticamente reversible [9]. Esta física de la adhesión ideal se desarrollo el siglo XIX para estudiar el ángulo de contacto en gotas de líquidos sobre sustratos sólidos, este concepto clásico es útil para modelar la adhesión de membranas que poseen superficies microscópicamente suaves.

Las propiedades de cuasi fluido de las interfaces celulares han estimulado el desarrollo de modelos para la adhesión celular, que han servido para hacer distintas predicciones. En la aproximación de la adhesión clásica, se asume que las superficies son suaves y que las cinéticas se dan cerca del punto de equilibrio (por simplicidad en el uso del modelo); un importante resultado a partir de un modelo termodinámico es que la energía de ensanchamiento y energía de adherencia son directamente proporcionales a la densidad superficial de sitios de adhesión y a la temperatura, naturalmente las células biológicas se adhieren a otras por procesos completamente no ideales (las fuerza de atracción superficiales no son suficientes para mantenerlas juntas).

Entonces la mecánica de la adhesión es estudiada en los estados de equilibrio mecánico (cuando la celda esta estacionaria o moviéndose muy lento, esto por simplicidad); la adhesión es caracterizada macroscópicamente por el balance diferencial entre la energía ganada en su formación y la energía requerida para separarlas. Tanto la energía de adhesión como la energía de separación por unidad de área de contacto son proporcionales a la tensión de la membrana o corteza de la célula, y a un factor que depende del ángulo de contacto entre las superficies (esto en el caso de superficies suaves), cuando se trata de superficies rugosas existe un factor de corrección que depende de la variación del área de contacto, esto suele aparecer en células vivas que presentan fenómenos de contracción y forman rugosidades [10].

2.4. Adhesividad en Sistemas Biológicos

La mayor fuente de inspiración de los científicos para lograr adhesivos cada vez mejores, es la naturaleza, la Biomimética, que es la ciencia que estudia la naturaleza como fuente de inspiración, ha desarrollado materiales llamados “materiales biomiméticos”, que están diseñados para imitar compuestos de origen biológico. El campo de desarrollo biomaterial está trabajando activamente en el uso de proteínas sintéticas y naturales, así como en diversos compuestos que contienen carbohidratos; el interés clave en adhesivos biomiméticos es la interacción entre el material y una superficie, ya sea la superficie de origen biológico o no biológico.

Los estudios científicos en el campo interdisciplinario de la investigación de biomateriales incluyen áreas como: la caracterización de las superficies, la adsorción de proteínas, y el comportamiento de adherencia.

Muchas de las proteínas son escleroproteínas, que contribuyen a la resistencia mecánica en el soporte de las estructuras animales. Se han centrado estudios, por ejemplo, en la producción de un adhesivo submarino que imite las propiedades de los mejillones marinos, muchas de las proteínas adhesivas identificadas hasta la fecha en los mejillones son proteínas polifenólicas, las cuales no son tóxicas, son biodegradables y tienen bajas cualidades inmunogénicas que las hacen muy atractivas para fines ambientales, medicinales e industriales [11].

Los adhesivos producidos de manera natural son comunes en muchos sistemas biológicos y son conocidos por su mayor resistencia y durabilidad en comparación con los materiales hechos por el hombre, tenemos ejemplos de sistemas biológicos especializados que generan una gran cantidad de adhesivos, como bacterias, arañas, gusanos marinos, pepinos de mar y mejillones. Las bacterias pueden formar capas, o bio capas, en una variedad de superficies mediante la incorporación de células de exopolisacáridos. El disco adhesivo a base de polisacáridos de la bacteria acuática *Caulobacter crescentus* ha sido mostrado recientemente para demostrar la fuerza adhesiva más fuerte medida en bacterias [12]. Las arañas también desarrollan las proteínas de adhesión mediante la síntesis de diferentes tipos de seda, los cuales tienen alta resistencia a la tracción, extensibilidad, y una respuesta viscoelástica a la energía de disipación que no es igualada por polímeros sintéticos.

Muchos organismos marinos han desarrollado estrategias adhesivas para hacer frente al dinámico medio ambiente marino, en particular a las mareas, por lo tanto, los mecanismos de adhesión se han desarrollado para mejorar su capacidad de adherencia. El poliqueto marino *Phragmatopoma californica* es un gusano que construye “tubos” de protección segregando cemento proteico mezclados con conchas y partículas de arena del fondo del mar, adhiriéndose rápidamente a una variedad de materiales en agua de mar.

El pepino de mar *Holothuria forskali* reacciona a la defensiva a través de la formación de túbulos que atrapan a su amenaza, el análisis bioquímico de los túbulos indica una relación de proteínas y carbohidratos de tres a uno, con una alta proporción de proteína muy insoluble [13]. Los mejillones marinos, tales como el mejillón azul *M. edulis*, se unen a una variedad de superficies en un medio acuoso mediante el uso de un adhesivo natural que es increíblemente fuerte y duradero.

No hay pegamentos sintéticos que se puedan aplicar de manera similar en un entorno acuoso y que sean impermeables a las turbulentas fuerzas del agua. El comportamiento de los biomateriales naturales, tales como la respuesta del pegamento de la seda de araña a la humedad, o el comportamiento adhesivo bajo el agua, entre otros, nos proporcionan plantillas para el desarrollo de materiales sintéticos que cambien de dimensión, características y funciones en respuesta a estímulos externos, el resultado de las exhaustivas investigaciones de estos procesos podría dar lugar a nuevos adhesivos hechos por el hombre que puedan cumplir con las mismas propiedades adhesivas en presencia de agua o humedad.

Una medida cuantitativa de la rigidez de un material es el módulo elástico, el cual es un parámetro muy importante para la propiedad de adhesión. Se han realizado estudios en diferentes sistemas biológicos, obteniendo los siguientes resultados como ejemplo: el módulo de elasticidad medido en las almohadillas de las patas de las Ranas blancas de árbol o *Litoria caerulea*, se encuentra entre 4 y 25 KPa, consideradas una de las más suaves dentro de los materiales biológicos, siendo equivalente a la medusa o anémona de mar la cual tiene un módulo de 10 KPa. El módulo elástico de las almohadillas en las patas de los insectos como los grillos y saltamontes de cuernos largos se encuentran entre 25 y 100 KPa y pueden ser comparados con el de las ranas, mientras que el módulo de elasticidad en las langostas es mucho mayor, entre 250 y 750 KPa [14]. Estos módulos de elasticidad encontrados en sistemas biológicos nos ayudarán en nuestro estudio como un factor comparable al resultado de nuestra investigación en las gotas de adhesivo de la seda de araña.

2.5. Adhesividad en insectos

Los órganos adhesivos de los insectos disponen de una diversidad estructural y un gran rendimiento, algunos insectos son capaces de soportar fuerzas de desprendimiento sobre sustratos lisos equivalentes a más de 100 veces su propio peso corporal, y sin embargo son capaces de correr en estas superficies [15]. El mecanismo de cómo dominar estas tareas contrarias en su funcionamiento y de hacer contactos adhesivos estables es en gran parte desconocido. Para analizar los mecanismos de adhesión controlada en los insectos, es necesario estudiar no sólo el sistema de adhesivo en forma aislada, sino que también el diseño mecánico y su interacción con la función adhesiva.

Los órganos adhesivos de estos insectos son almohadillas adhesivas que son lisas y deformables, la superficie de contacto está mediada por un líquido adhesivo, este líquido parece ser segregado sobre la superficie de las almohadillas a través de poros, pero su vía exacta todavía tiene que ser investigada en muchos sistemas [16].

Una película de líquido entre dos objetos da lugar a fuerzas de adherencia debido a la tensión superficial y la viscosidad (Figura 2.1), la tensión superficial crea principalmente fuerzas estáticas perpendiculares a la superficie, mientras que las fuerzas paralelas a la superficie (debido a la histéresis del ángulo de contacto) son probablemente insignificantes, las fuerzas debidas a la viscosidad, por otro lado, pueden actuar tanto en la normal y en la dirección paralela, pero son cero en el caso estático.

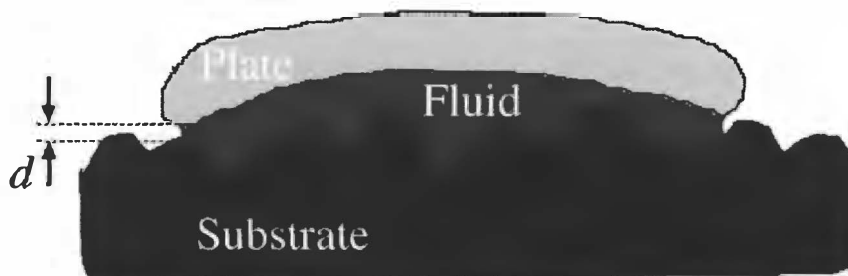


Figura 2.1.- Película de líquido entre superficies que da paso a la adherencia entre ambas, donde "d" es la altura de la película de líquido.

Fuente: *Biological adhesion for locomotion: basic principles* [16].

Existen predicciones para las fuerzas de unión o adherencia de los insectos siguiendo ciertas consideraciones [17]:

1. La fricción estática debe ser pequeña; una película de líquido típicamente actúa como un lubricante que permite el suave deslizamiento, sin embargo, la fricción estática suficiente parece ser necesaria para este comportamiento. Varios estudios informaron sobre las fuerzas de adherencia en los insectos, donde las fuerzas de fricción deben ser mucho mayores que las fuerzas adhesivas.
2. La fricción debe depender de la velocidad, debido a la cizalladura de la película del líquido, la fuerza de fricción debería ser más fuerte a altas velocidades de deslizamiento.
- 3.- Debido a la dependencia de la temperatura para la viscosidad y tensión superficial (la viscosidad disminuye mucho más fuertemente con la temperatura de tensión superficial), la fricción por deslizamiento debería ser menor a temperaturas más altas, pero las fuerzas estáticas deben ser casi independientes de la temperatura.

2.6. Propiedades Adhesivas en Insectos

Experimentos realizados con insectos, consistían en colocarlos sobre plexiglás liso (PMMA), a su vez sobre cilindros o placas giratorias montadas en un rotor para medir las fuerzas verticales o en paralelo, las fuerzas de fijación se calculan a partir del radio al que se encuentra el insecto y la velocidad de rotación. Una vez que la aceleración centrípeta supera un límite, las hormigas y muchos otros insectos dejaron de correr y mostraron una reacción de congelamiento, en la posición congelada, las seis patas están totalmente extendidas. En el plato giratorio liso las hormigas no se desprenden pero gradualmente se deslizan hacia el exterior y sus almohadillas adhesivas están continuamente en contacto con la superficie.

Se encontró una relación positiva y lineal entre la tensión de corte (que vendría a ser la fuerza centrífuga que actúa dividida por el área de contacto del adhesivo de la hormiga) y la velocidad de deslizamiento, en sentido con la aportación de una película de líquido viscoso. Todas las líneas de regresión obtenidas en el modelo tienen intercepciones positivas que indican la presencia de una fuerza estática de fricción significativa (Figura 2.2) la cual es la fuerza que realiza el líquido segregado sobre el sustrato [18]. Los estudios muestran que en la adhesión de la hormiga *Smaragdina*, como se sostuvo por un mecanismo de adhesión en húmedo, las fuerzas de rozamiento aumentan con la velocidad de deslizamiento, siendo fuertemente dependientes de la temperatura, sin embargo, la fricción estática no es despreciable, las dimensiones y la viscosidad estimadas de la película del líquido adhesivo indican que la secreción adhesiva por sí sola es insuficiente para explicar las fuerzas observadas; una gran parte de la fricción es probablemente causada por la deformación elástica de la cutícula de la almohadilla viscoelástica cuando se desliza sobre la superficie.

También se han estudiado las propiedades y dimensiones de la película de líquido adhesivo mediante imágenes por resonancia magnética, la cual mide la reflexión de una muestra bajo iluminación monocromática, mediante el análisis de imágenes de interferencia, es posible medir la distancia que reflejan las interfaces con resolución nanométrica y lograr una reconstrucción tridimensional de la superficie microtopográfica.

En la Figura 2.3 se muestra la imagen de la huella de una gotita de la especie *O. Smaragdina* sobre el vidrio, si el índice de refracción del líquido es conocido, el perfil de la altura de una gotita puede ser reconstruido a partir de franjas de interferencia visibles.

La naturaleza hidrofóbica de la huella de las gotas se demuestra fácilmente por su insolubilidad en agua, las gotitas todavía estaban presentes luego de la inmersión de la superficie de vidrio en agua durante cinco minutos, las imágenes por resonancia magnética mostraron que su volumen se mantuvo prácticamente sin cambios.

Por otra parte, el calentamiento de las superficies a 200°C inmediatamente antes de la observación no tuvo ningún efecto visible sobre la abundancia de las gotitas [18]. Las estimaciones para el espesor y la viscosidad de la película líquida se pueden utilizar para probar si la película del líquido adhesivo por sí sola es suficiente para poder explicar las fuerzas de fricción observadas en los experimentos de centrifugación mostrados.

Los hallazgos en este tipo de investigaciones centradas en experiencias, van de acuerdo con las predicciones de un mecanismo de adhesión en húmedo, como se predijo por los efectos diferenciales de tensión superficial y viscosidad, sólo las fuerzas dinámicas son dependientes de la temperatura, mientras que las fuerzas estáticas no lo son o sólo lo son débilmente, sin embargo, las fuerzas de fricción estáticas fueron mucho mayores de lo esperado para un contacto lubricado (coeficiente de fricción en relación con el peso corporal); una posible fuente de esta fricción estática es la superficie de contacto de las garras suponiendo que estas se presionan hacia abajo con una fuerza adhesiva máxima.

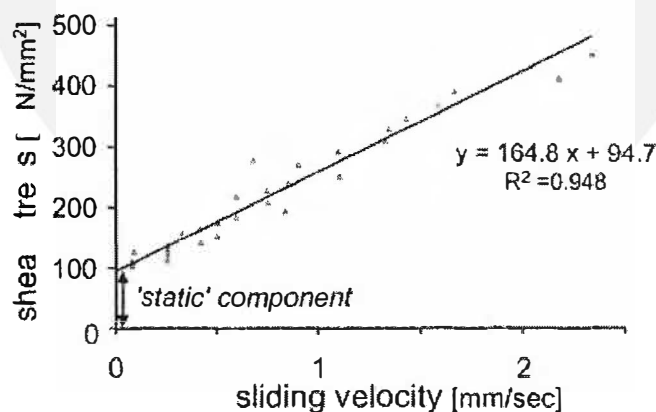


Figura 2.2.- Relación entre la velocidad y el esfuerzo producidos en el ensayo a la película de líquido mostrada en la figura 2.1.

Fuente: *An Integrative Study of Insect Adhesion: Mechanics and Wet Adhesion of Pretarsal Pads in Ants* [18].

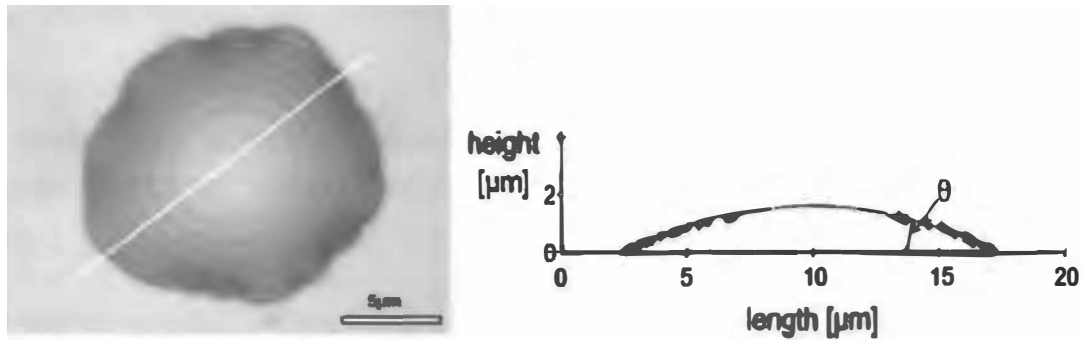


Figura 2.3.- Izquierda: Imagen IRM de huella de la gota de la especie *Smaragdina*.
Derecha: Perfiles de altura de la huella de la gota de la especie *Smaragdina*.

Fuente: *An Integrative Study of Insect Adhesion: Mechanics and Wet Adhesion of Pretarsal Pads in Ants* [18].

2.7. Adhesión en la seda de Araña

Las arañas utilizan las diferentes propiedades de su seda para diversas funciones, siendo una de las más importantes la captura de sus presas, lográndolo con la gran adhesividad e invisibilidad de sus redes. Los adhesivos utilizados en estas redes han evolucionado durante miles de años y se han convertido en una clase de material natural con excelentes propiedades, en la actualidad se conocen alrededor de 42 000 especies de arañas.

Las redes o telarañas son el medio para atrapar su comida, construir un refugio, e incluso un escenario para aparearse; estas telarañas se ensamblan a partir de varios tipos únicos de sedas que funcionan juntas como unidades integradas, que hacen de la araña un depredador eficiente y exitoso.

La telaraña es sobre todo una trampa para los insectos, estas redes tienen la función de atrapar a la presa y luego transmitir su ubicación, lo cual representa un gran reto debido a la alta energía cinética de las presas; sobre todo los insectos voladores, a los que las arañas deben reaccionar rápidamente y evitar que escapen, lo que refuerza la importancia de la propiedad adhesiva de su seda. Existen diversas formas de emplear esta propiedad adhesiva según la especie como lo mostramos a continuación.

2.7.1. Adhesión en la especie *Mastophora*

La araña de bolas (*Mastophora Spp*) o araña “cabeza de gato”, es una especie atípica de las arañas orbe, tienen una manera distinta de tejer su telaraña; su forma de cazar también es diferente, estas descargan un líquido pegajoso en el extremo de una fibra de su seda, como se observa en la Figura 2.4, a estas manchas llaman “bolas”.

Las arañas de bolas enganchan a sus presas al igual que un pescador lo hace con un pez en el anzuelo, este pegamento segrega una hormona que atrae a diferentes insectos [19], la adhesividad de estas bolas en esta especie de araña ha evolucionado, ya que es capaz de capturar insectos que, fácilmente pueden salir y no ser atrapados por telarañas comunes, esto debido a que las bolas de pegamento se adhieren alrededor de toda la presa impidiendo que escapen.



Figura 2.4.- Araña de bolas, se observa una bola de adhesivo al final de su seda la cual hace pivotar para atrapar a su presa.

Fuente: La Jolla, San Diego County, California, USA. May 4, 2009. Size: about 5/8"
<http://bugguide.net/node/view/275939>

2.7.2. Adhesión en la especie *Latrodectus Hesperus*

La telaraña de la viuda negra (*Latrodectus Hesperus*) forma una estructura en tres dimensiones a diferencia de otras, y ha sido adecuada para la captura de sus presas de la siguiente forma [20]: tiene en la parte superior los llamados hilos de captura (Figura 2.5) que pueden enredar a insectos voladores, y existe también otro mecanismo, que consta en una estructura de hilos de seda los cuales poseen gotas de pegamento al final

de la línea, llamadas "gotas de pie", que se adhieren a sus presas cuando entran en contacto. Estas gotas de pegamento son muy adherentes y pueden encontrarse y sostenerse bajo tensión, las presas pequeñas llegan a ser suspendidas en el aire sin poder liberarse con tan solo un hilo y estas gotas de pie, mientras que presas más grandes son capturadas con una mayor cantidad de hilos pero de la misma forma.

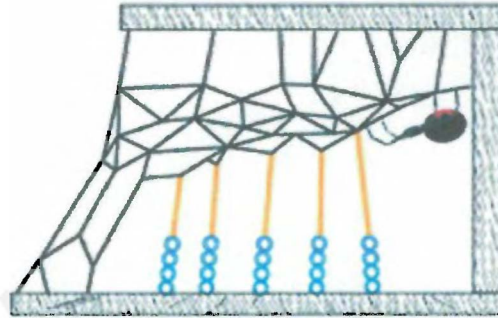


Figura 2.5. a) Esquema de la telaraña de la especie viuda negra. Observamos el adhesivo suspendidos en la parte inferior de los hilos.

Fuente: Gumfooted lines in black widow cobwebs and the mechanical properties of spider capture silk [20].

2.7.3. Adhesión en la especie Orbe

Esta especie, como la mayoría de las arañas, producen muchos tipos de seda, por lo general siete, cada una de las cuales tiene propiedades específicas que parecen ser optimizadas para llevar a cabo funciones orgánicas importantes: la seda dragline, producida por las principales glándulas ampolláceas, forma los radios de la rueda en la telaraña (Figura 2.6), también producen seda de la glándula ampollácea menor, la cual acompaña la seda dragline en la telaraña, así como la seda de la glándula flageliforme que forma los filamentos del núcleo en los hilos de captura de la telaraña orbe.

Los hilos de la telaraña están anclados a la vegetación y fijados unos a otros por el cemento de seda procedente de la glándula piriforme, las arañas tejedoras orbe utilizan dos tipos de hilos para capturar a sus presas: la seda cribellar y la seda viscosa. La seda de captura cribellar es relativamente antigua y utilizada por muchas especies en el hilado de sus telarañas, y la seda viscosa que ha evolucionado recientemente y es utilizado por tejedores orbe más modernos.

La seda cribellar fue sustituida en las telarañas por la evolución de las sedas de base acuosa, que son las sedas adhesivas en las modernas tejedoras orbe, las cuales dependen de una combinación de resistencia y rigidez a partir de la seda dragline para poder absorber la energía cinética de los insectos voladores en las redes de impacto.

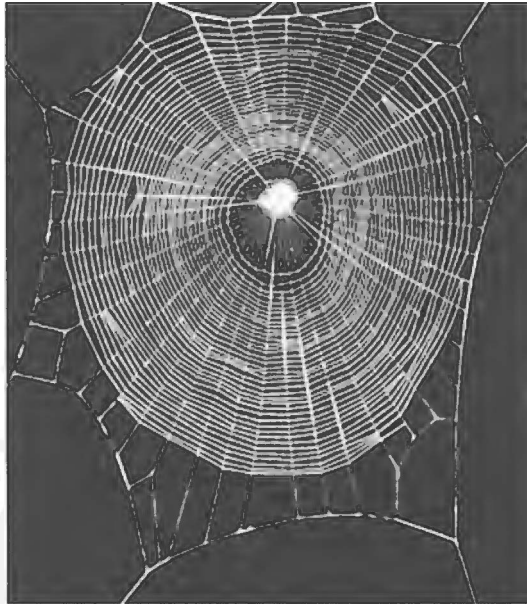
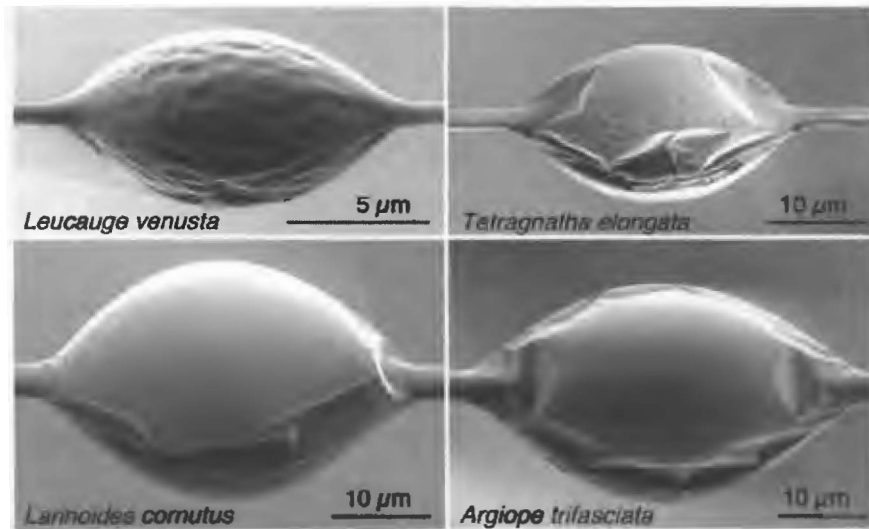


Figura 2.6.- Típica telaraña de la especie orbe.

Fuente: Changes in the mechanical properties of capture threads and the evolution of modern orb-weaving spiders [21].

La fuerza, elasticidad, y pegajosidad de los hilos viscosos de la seda de captura tienen un efecto mayor que supera a la seda cribellar en la captura de presas [21], estos hilos viscosos de las arañas tejedoras orbe consisten en dos suaves, pero altamente extensibles fibras axiales rodeadas de pegamento adhesivo acuoso como lo muestra la Figura 2.7 [22].

Estos hilos se produce a partir de tríadas de glándulas, cada tríada se compone de una glándula que produce una fibra axial (Glándula Flageliforme), y dos glándulas que secretan el pegamento (Glándula Agregada), la espiga de la glándula que produce la fibra está dispuesta entre las espigas de las glándulas de pegamento de tal manera que el pegamento y las fibras son simultáneamente extruidos (Figura 2.8). En el momento de segregarse la seda, el pegamento cubre las fibras uniformemente pero luego de manera espontánea se forman una serie de gotas más o menos distribuidas a lo largo de la seda [23].



|Figura 2.7.- Seda viscosa vista con SEM, de cuatro especies diferentes de araña.

Fuente: *The adhesive delivery system of viscous capture threads spun by orb-weaving spiders* [22]

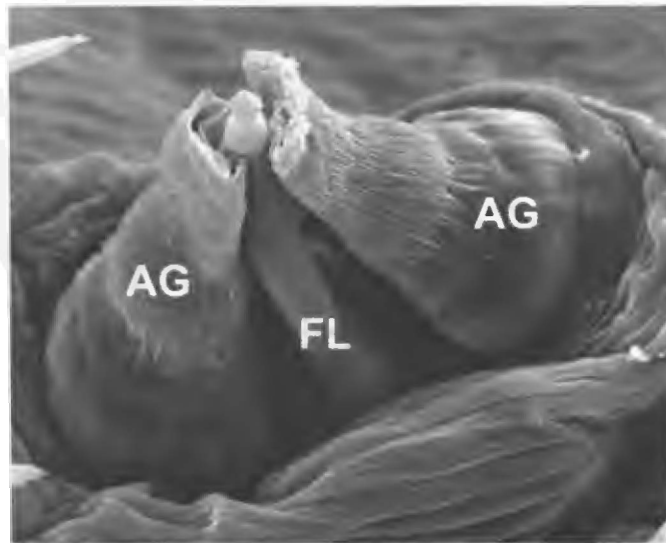


Figura 2.8.- Imagen SEM de las glándulas Flageliforme y Agregada que segregan la seda junto con las gotas de adhesivo.

Fuente: *Reconstructing web evolution and spider diversification in the molecular era* [23].

2.8. Caracterización del Adhesivo de la Seda de araña

Existen investigaciones que han caracterizado químicamente los componentes de estas gotas de adhesivo, la fracción soluble en agua de esta seda se encontró que contenía una solución concentrada de componentes higroscópicos relacionados con neurotransmisores como amida GAB, acetil taurina, colina, betaína, isetiónico, ácido cisteico, lisina, serina, nitrato de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, y pirrolidona; la fracción soluble en agua, sin embargo, no contiene ningún polímero.

La concentración de sales presentes determinan la capacidad de absorción de agua en este sistema, también, la alta concentración de sales da una presión muy cercana a la que encontramos a temperatura ambiente, son valores de humedad que prevalecen en el hábitat de estas especies. Los compuestos no reaccionan electrostáticamente con la glicoproteína porque están cargados positivamente, por otra parte, estas sales no cristalizan en un amplio intervalo de presiones, a diferencia de las sales como el NaCl.

Las imágenes mostraron que la gota en su interior es fibrosa y la hipótesis fue que las glicoproteínas se encuentran allí, luego se observó los hilos de la seda de captura con fluorescencia molecular que confirmaron la presencia de acetil galactosamina N, y por lo tanto, la presencia de las glicoproteínas en el interior de las gotas. Se planteó la hipótesis que las glicoproteínas, siendo el único componente en la gota del pegamento con ramificaciones largas, puede actuar como pegamento en sentido estricto.

2.9. Estructura de la Gota de Adhesivo

Las observaciones de un sector de las secciones transversales de estas gotitas mostraron la presencia de una densa capa, basándose en estas observaciones, se planteó un modelo de dos fases como hipótesis, que la región central de estas gotas eran las glicoproteínas y la región circundante transparente era la capa viscosa, sin embargo, debido a recientes observaciones, los cálculos de los tamaños relativos de la gotita interior y el grado de estiramiento de la gotita entera al separarla de una superficie, se planteó la hipótesis de que el pegamento de las gotas asume un modelo de tres fases (Figura 2.9) en su lugar [24], estas tres regiones son: un pequeño gránulo central de anclaje, la glicoproteína transparente en la región del pegamento, y una capa exterior más fluida, siendo esta organización capaz de generar la propiedad de adhesión en la seda.

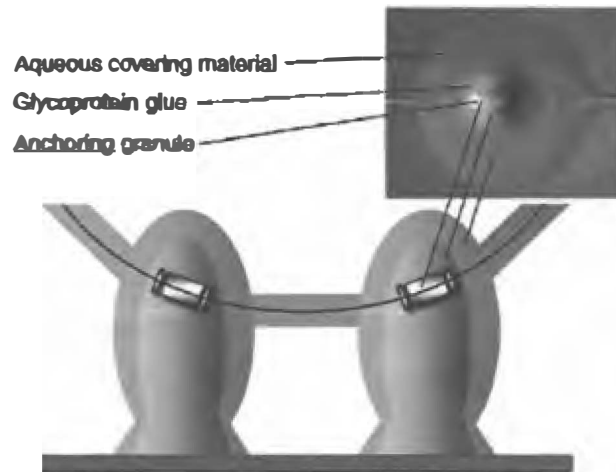


Figura 2.9.- Estructura de la gotita de adhesivo.

Fuente: *The role of granules within viscous capture threads of orb-weaving spiders [24].*

El papel del agua en el material acuoso y la composición de los hilos de captura se plantearon utilizando experimentos NMR (Nuclear magnetic resonance) en la seda, con la idea de que las moléculas móviles en sólidos producen espectros de alta resolución. Las muestras correspondientes a los componentes de la capa viscosa indicaron que el recubrimiento es móvil, estas muestras desaparecieron y reaparecieron en deshidratantes y, posteriormente, rehidrataron la seda. Cuando estas telas se lavaron con D₂O (Agua pesada) y se secaron, con el uso de NMR mostraron señales de baja proteína, las cuales se asociaron luego con las glicoproteínas.

En la presencia de agua, la adhesión de la seda viscosa es en parte móvil en función del tiempo, la intensidad del espectro en la seda de captura es aproximadamente comparable con la de una cantidad similar de una pequeña proteína soluble, y sugiere que una gran fracción de la seda es visible en estos espectros y es, por lo tanto, móvil. La seda de captura por lo tanto, actúa como un elastómero que está muy por encima de su temperatura de transición vítrea y tiene una cristalinidad muy baja.

Cuando la seda se secó se pudo observar que el agua actúa como un plastificante para esta misma, la diferencia en la composición de la seda radial en comparación con la seda de captura se pone de manifiesto por su falta de agua, el agua, por lo tanto, juega un papel muy importante en la elasticidad y adhesividad de la seda de captura.

2.10. Estudio de las Propiedades Adhesivas de la seda de araña

Se han realizado estudios basados en experiencias para determinar y medir la propiedad adhesiva en las sedas, al realizar estas investigaciones en la seda cribellar y viscosa, se encontraron diferencias que nos permiten compararlas. Las diferencias en las dimensiones del material adhesivo y las propiedades mecánicas de las fibras axiales sugieren que los hilos cribellar y viscosos de captura funcionan de manera diferente con respecto a valores de adhesión por unidad de volumen; entre estas diferencias tenemos la escala en la que un hilo interactúa con una superficie, la eficiencia con la cual las fuerzas adhesivas se transmiten a las fibras axiales del hilo, y la capacidad de un hilo para reclutar adhesión desde regiones interiores de contacto.

La seda cribellar interactúa a través de nanofibras que tiene un diámetro alrededor de los 20 nm, las nanofibras de los hilos cribellar están regularmente espaciados en nodos de 35 nm de diámetro que establecen alrededor de 170 puntos de contacto por milímetro cuadrado, por lo tanto, el hilo cribellar genera adhesión en muchos puntos de contacto pequeños y difusos, mientras el hilo de la seda viscosa genera adhesión en unos pocos puntos grandes de contacto; debido a la naturaleza difusa del contacto establecido por los hilos cribellar, la adhesión generada en estos puntos se transfiere a la fibra axial, el hilo de la seda viscosa, por otra parte, genera adherencia utilizando mucho menos gotas colineales que efectivamente transfieren dicha fuerza a las fibras axiales [25].

En los hilos cribellar se genera adhesión sólo en los bordes exteriores de contacto con una superficie, esto basado en la observación de no presentar ninguna diferencia significativa en los valores de fuerza cuando se adhieren a placas de diferentes anchos, la suavidad y capacidad limitada de ampliación de las fibras axiales cribellar podrían explicar este efecto.

En contraste, la gran extensibilidad de los hilos viscosos, y de las gotas visco elásticas del hilo, producen un sistema altamente extensible capaz de transferir más fuerza a lo largo de las líneas axiales, presentando mayor adhesión en la parte interna de las gotas al que se denomina un "mecanismo de suspensión de puente". En la Figura 2.10 se muestra la comparación de extensibilidad entre ambas sedas, la cual juega un papel muy importante en la adhesión, se muestra el esquema de la diferencia del comportamiento de la adhesión cuando un hilo cribellar y un hilo de seda viscosa son separados de una superficie.

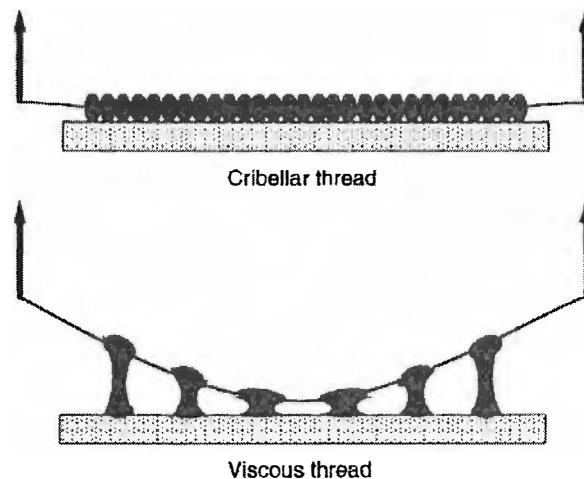


Figura 2.10.- Extensibilidad en la seda cribellar y seda viscosa.

Fuente: *A Review on Spider Silk Adhesion* [25].

Se realizaron mediciones empleando una técnica experimental, que mide la fuerza de adhesión en una única gota de pegamento, los hilos de captura se inmovilizan sobre un sustrato de vidrio y se ponen en contacto a las gotas de adhesivo con una micro sonda, que luego es retraída a velocidades constantes controladas, la fuerza es registrada en función de la distancia hasta alcanzar una fuerza crítica de desprendimiento (pull-off).

La respuesta de fuerza-distancia es altamente dependiente del arrancamiento, la fuerza pull-off aumentará de 60 mN a razón de 1 mm, hasta los 400 mN a 100 mm (Figura 2.11), se puede observar que la fuerza pull-off es de un orden más alto que para fuerzas capilares, confirmando que la glicoproteína es responsable de la adhesión.

Los experimentos de relajación de fuerza, después de estirar las gotas de pegamento hasta 100 mm, revelan que las fuerzas se mantienen a un valor constante que es independiente del desplazamiento, las fuerzas de régimen permanente, que son dos órdenes de magnitud superiores a los esperados para fuerzas capilares, indican claramente que el pegamento no responde ni como líquido viscoso ni como un líquido viscoelástico, en su lugar, el pegamento exhibe características de un sólido visco elástico (Figura 2.11). La elasticidad del pegamento también desempeña un papel importante en la forma que la seda viscosa es utilizada por las arañas para capturar sus presas, las glicoproteínas se deforman como una banda de goma elástica ideal, que es esencial en la retención de los insectos atrapados en la red el tiempo suficiente para ser sometidos por la araña.

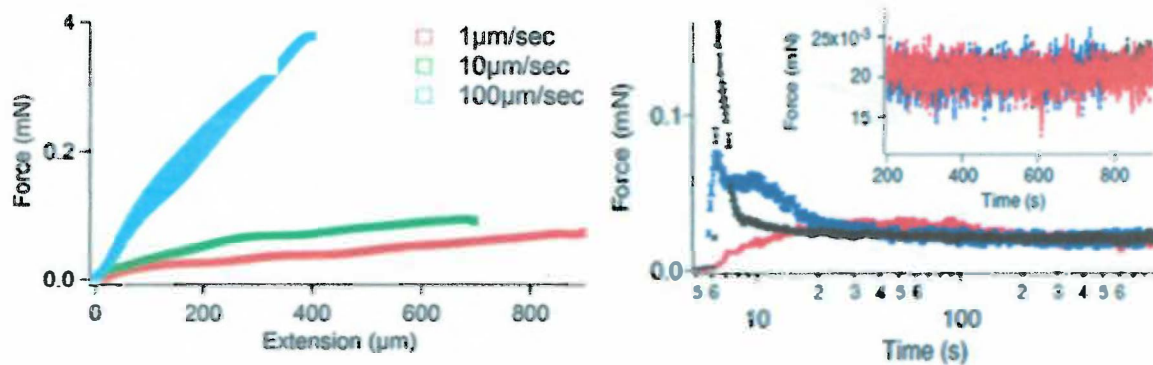


Figura 2.11.- Izquierda: Mediciones individuales de la adherencia del pegamento de la gota cuando se estiraron a diferentes velocidades hasta la separación de una sonda de vidrio.

Derecha: Curva de relajación de carga en la que las gotas de pegamento se extendían por 100 mm en tres tasas diferentes: 100 mm (negro), 10 mm (azul), 1 mm (rojo); después de lo cual la carga se le permite relajarse. Se muestra una vista ampliada de las regiones de la meseta para los tres casos. Todas las mediciones fueron tomadas a 40% de HR

Fuente: A Review on Spider Silk Adhesion [25].

A altas velocidades de extensión, las fuerzas adhesivas son considerablemente mejores debido a los altos efectos de la viscosidad, lo que facilita a los hilos de captura aferrarse a los insectos voladores rápidos al entrar en contacto con las redes de impacto. El uso elegante de la elasticidad para mejorar la fuerza de los adhesivos se produce en los mejillones marinos y sugiere un principio de diseño común en la evolución de los adhesivos naturales.

La viscoelasticidad en las gotas de adhesivo tiene profundas consecuencias en la función de los hilos de captura de las telarañas, un solo hilo de captura está cubierto con muchas de estas gotas de pegamento y el desprendimiento de un hilo de captura a partir de una superficie, depende de estas mismas y de la viscoelasticidad de las fibras de la seda. Las fuerzas de adhesión de los hilos a una superficie dependerán de los radios de separación, similar a los resultados obtenidos para la fuerza pull-off de una sola gota de pegamento.

En la Figura 2.12 se muestra los resultados para las mediciones del trabajo total para separar el hilo de la superficie (negro), la energía de deformación almacenada en la seda axial (azul), y la energía con la que contribuyen las gotas de adhesivo (verde) [26].

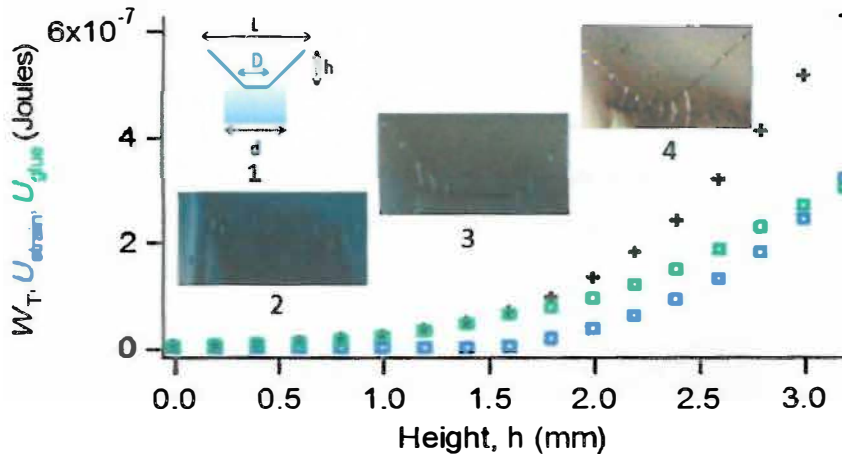


Figura 2.12.- Mediciones de la fuerza de arrancamiento de las gotas de adhesivo.

Fuente: *Viscoelastic solids explain spider web stickiness* [26].

2.11. Humedad en las gotas de adhesivo

La humedad es un factor relevante en la propiedad de adhesión de las gotas de la seda, estudios realizados revelan que a una humedad relativa intermedia (40% - 60% RH) las gotas de pegamento de la seda viscosa presentan una adhesión máxima, a una humedad relativa baja, las gotas son muy rígidas y densas y no establecen un contacto adecuado, por lo tanto se adhieren menos. A mayor humedad relativa, la lubricación provocada por el agua y una baja elasticidad reducen la adherencia, a pesar de que las gotas son más suaves y se extienden mucho mejor en la superficie.

El exceso de agua interrumpe el enlace de hidrógeno, reduce las interacciones electrostáticas (las glicoproteínas tienen carga negativa), y lubrica demasiado, causando así la reducción de adherencia; por otra parte, la adhesión en las gotas de pie, producida por la especie viuda negra, es resistente a la humedad. La evolución, en respuesta a la humedad, de las gotas de adhesivo de la seda probablemente refleja las adaptaciones funcionales de las nuevas sedas al medio en el que habitan.

Las diferencias en respuesta a la humedad, entre el adhesivo de la seda viscosa y el adhesivo de la seda de pie, son estructurales y consecuentemente en propiedades. Las gotas de la seda viscosa son heterogéneas con un núcleo denso polimérico rodeado de una mezcla dispersa y translúcida de glicoproteínas y una solución acuosa de sales como se observa en la Figura 2.14.a; en contraste las gotas adhesivas de la seda de pie aparecen en su mayoría homogéneas sin un núcleo denso visible Figura 2.14.b.

Estas gotas de adhesivo responden de manera muy diferente a la humedad, las gotas de pegamento de la seda viscosa se hinchan aumentando su volumen cerca en un orden de magnitud en comparación a su volumen en seco (Figura 2.15), mientras que las gotas de la seda de pie se unen entre sí para formar gotas más grandes, de tal manera que el aumento total de volumen es mucho menor que en las gotas de la seda viscosa (Figura 2.14. c y d).

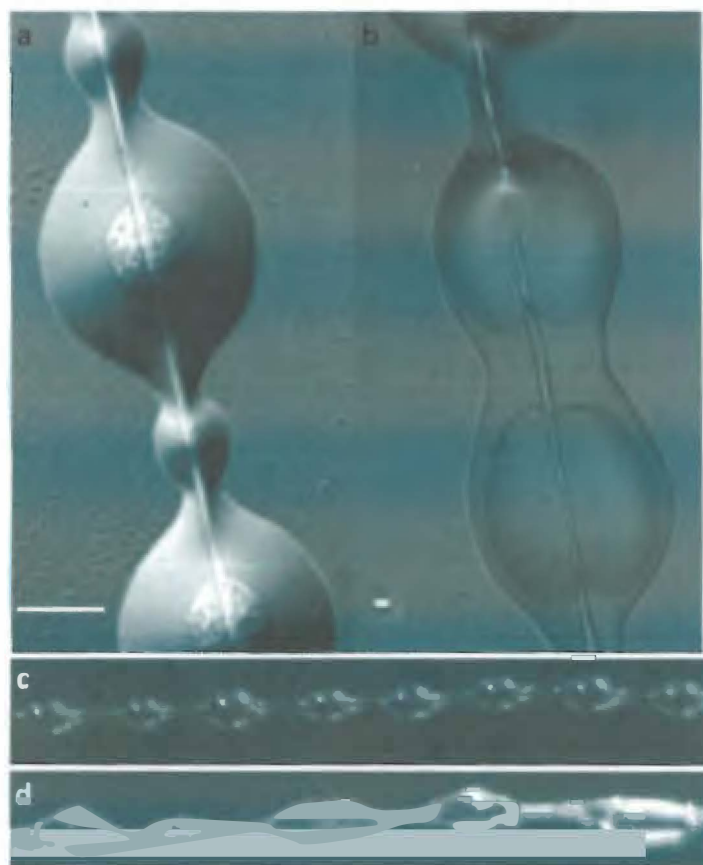


Figura 2.14.- a) Gotas de adhesivo de seda viscosa. b) Gotas de adhesivo de la seda de pie. c) Gotas de la seda de pie a 0% de HR. d) Gotas de la seda de pie a 90% de HR.

Fuente: Changes in the Adhesive Properties of Spider Aggregate Glue during the Evolution of Cobwebs [28].

El flujo y la coalescencia de las gotas de la seda de pie se da probablemente debido a la ausencia de un núcleo central denso, que se cree actúa como un ancla para las gotas de la seda viscosa, con lo que las mantiene firmemente unida a las fibras de la seda axial; la ausencia del núcleo probablemente explica la razón por la cual las gotas adhesivas se pueden quitar fácilmente de la seda de pie al adherirla a una superficie adhesiva, a diferencia de las gotas de la seda viscosa que se unen firmemente a las fibras axiales.

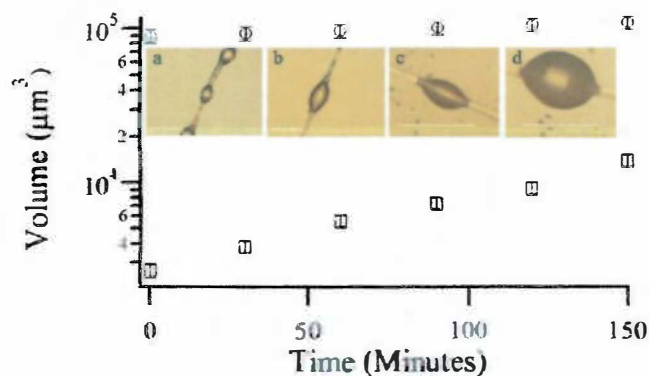


Figura 2.15.- Exposición a la humedad de las gotas de adhesivo de la seda viscosa. Cuadros a y b muestran el comportamiento de la seda de pie de 0% a 100% de HR; los cuadros c y d muestran el comportamiento de la seda viscosa de 0% a 100% de HR.

Fuente: Changes in the Adhesive Properties of Spider Aggregate Glue During the Evolution of Cobwebs [28].

El flujo y la coalescencia de las gotas de la seda de pie se da probablemente debido a la ausencia de un núcleo central denso, que se cree actúa como un ancla para las gotas de la seda viscosa, con lo que las mantiene firmemente unida a las fibras de la seda axial; la ausencia del núcleo probablemente explica la razón por la cual las gotas adhesivas se pueden quitar fácilmente de la seda de pie al adherirla a una superficie adhesiva, a diferencia de las gotas de la seda viscosa que se unen firmemente a las fibras axiales.

Las glicoproteínas en el pegamento de la seda viscosa se comportan como una red reticulada y tienen un comportamiento como sólido viscoelástico, mientras que la seda de pie contiene adhesivo soluble en agua y péptidos GAB, la presencia o ausencia de un alto peso molecular ramificado de polímeros adhesivos (proteínas) no se conoce todavía.

La absorción de agua en las gotas de la seda viscosa se da debido a la presencia de compuestos de bajo peso molecular higroscópicos presentes en el adhesivo, se determinó experimentalmente que no existe una histéresis en la absorción de agua con ciclos de humedad [27]; en el caso de la seda de pie, sin embargo, el cambio de humedad desempeña un papel importante, al absorber humedad por primera vez, las gotas de la seda de pie se unen para formar gotas más grandes produciendo un ligero cambio en el volumen total del adhesivo, posteriormente al reducir la humedad se restaura el volumen original de las gotas pero obviamente no es el número original de las gotas iniciales, los ciclos posteriores de humedad son completamente reversibles en términos de volumen de gotas y número de gotas adhesivas.

2.12. Dependencia de la Humedad en la Adhesión

Las gotas de adhesivo en la seda se hinchan cuando son expuestas a humedades altas, el agua es absorbida y diluye las gotas de pegamento, lo que mejora su humectabilidad, el efecto de la humedad en la adherencia de estas gotas es investigado equilibrando hilos a diferentes niveles de humedad antes de realizar mediciones individuales de las gotas.

Para las siguientes experiencias realizadas, el hilo de captura se equilibra a cierta condición de humedad, luego es inmovilizado sobre un sustrato de vidrio y una sonda cónica de vidrio, luego se pone en contacto con las gotas, todo el conjunto se observa a través de un microscopio óptico y se encierra en una cámara de humedad controlada, luego la sonda es retraída a una velocidad constante mientras que la fuerza se registra como una función de la distancia. Para tener en cuenta el cambio con la humedad y poder comparar objetivamente los dos adhesivos, la normal pre-fuerza para poner la sonda en contacto con una gota individual se mantiene constante para cada valor de humedad, luego de llegar a la fuerza crítica pull-off. Las fuerzas críticas de desprendimiento dependen de la velocidad de estiramiento de las gotas, el comportamiento de estas fuerzas según el desplazamiento para gotas individuales se muestra en la Figura 2.16.

El efecto de la humedad en el comportamiento adhesivo de estas gotas puede entenderse al comparar la carga durante el desplazamiento a la misma velocidad de estiramiento ($50 \mu\text{m} / \text{s}$) a diferentes valores de H.R. (Figura 2.17), para esta seda viscosa, las gotas de pegamento son más suaves con el aumento de la humedad relativa (el módulo elástico inicial disminuye con el aumento de la H.R.); debido a que la adhesión entre la sonda y las gotas es usado para estirar la gotita, la extensión de las gotas de pegamento a la rotura es también dependiente de la humedad, en contraste a la seda viscosa, los resultados en la seda de pie también se muestran en la Figura 2.16 y se observa que la humedad no tiene ningún efecto significativo sobre su adhesión. Las fuerzas de desprendimiento para el adhesivo de la seda de pie dependen solamente de la velocidad de estiramiento y son independientes de la humedad circundante, además, a pesar de los tamaños más grandes de las gotas de la seda de pie, los valores de su extensión de rotura son mucho menores que en las gotas de pegamento de la seda viscosa, esto podría ser debido a la absorción reducida de agua en la seda de pie en comparación con el adhesivo de la seda viscosa.

Cuando las fuerzas pull-off del adhesivo de ambas sedas se compararon con los inducidos por el efecto capilar-fuerza de dos líquidos viscosos (modelo sin entrelazar PDMS, $\gamma = 20 \text{ mN / m}$, y una solución similar a la capa acuosa del pegamento de la seda viscosa, $\gamma = 40 \text{ mN / m}$, respectivamente), ambas fuerzas del adhesivo de la seda fueron dos órdenes de magnitud mayor que cualquier líquido, incluso a 90% de HR estirados a una velocidad de $1 \mu\text{m / seg}$ (Figura 2.18) [28].

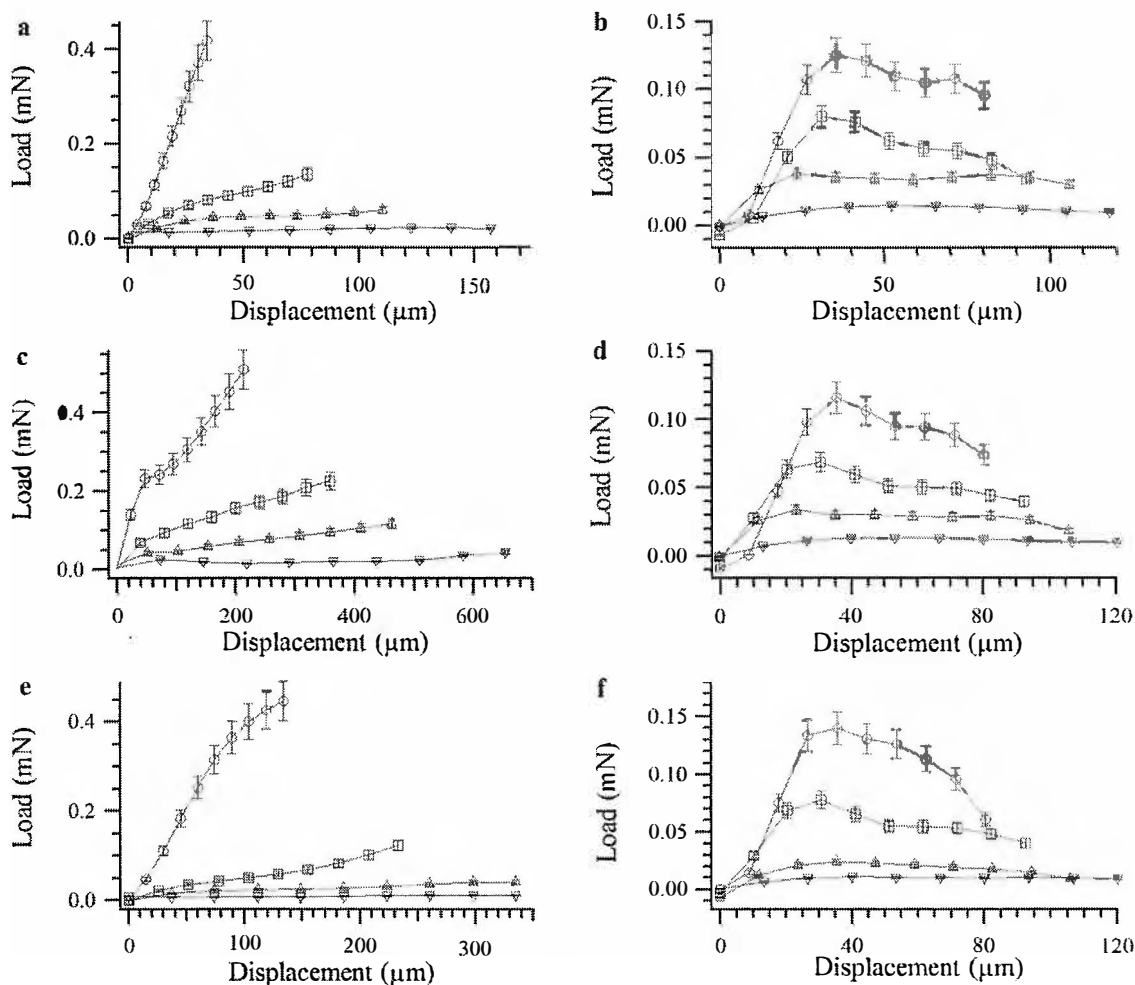


Figura 2.16.- Fuerza VS Desplazamiento. Comportamiento cuando las gotas de adhesivo de Seda viscosa (Seda de pie), se encuentran a 15% de HR: a (b), a 40% de HR: c (d), y a 90% de HR: e (f), se estira a $1 \mu\text{m / s}$ (triángulos invertidos), $10 \mu\text{m / s}$ (triángulos verticales), $50 \mu\text{m / s}$ (cuadrados), y $100 \mu\text{m / s}$ (círculos).

Fuente: Changes in the Adhesive Properties of Spider Aggregate Glue During the Evolution of Cobwebs [28].

Además, las fuerzas pull-off del adhesivo dependen de la tasa de estiramiento, mientras que las fuerzas de los líquidos viscosos son independientes, esto implica que el pegamento de la seda de pie exhibe viscoelasticidad, que, como el pegamento de seda viscosa, indica la presencia de entrecruzamientos físicos o químicos causados probablemente por alto peso molecular como en polímeros adhesivos; también, dependientemente de las fuerzas de desprendimiento se demuestra que el adhesivo de la seda viscosa no pierde su carácter viscoelástico, incluso cuando se diluye y se hincha hasta en un orden de magnitud (es decir a un 90% de humedad relativa HR).

En la Figura 2.18 el adhesivo de la seda de pie está representado por las cajas sin relleno en color rojo (15% H.R.), azul (40% H.R.), y verde (90% H.R.), mientras que el adhesivo de la seda viscosa está representado por las cajas llenas de color en las mismas condiciones, las soluciones acuosas están representadas por cajas con y sin relleno de color morado.

El área bajo la curva de la gráfica Fuerza-Desplazamiento representa la energía necesaria para separar la punta del pegamento (llamada energía de adhesión), la energía del adhesivo es mayor para mayores velocidades de estiramiento, esto debido a las fuerzas disipativas viscosas; curiosamente, el pegamento de la seda de pie no se adhiere tan fuertemente como el pegamento de la seda viscosa a cualquier humedad; para la seda de pie la energía adhesiva no se ve afectada por el nivel de humedad relativa, al igual que sus fuerzas adhesivas.

Sorprendentemente, toda adherencia de la seda viscosa, al igual que la adhesión de la gota de pegamento viscoso, es máxima en los niveles intermedios de humedad, este patrón es algo contrario a la intuición, ya que los hilos de la seda viscosa demuestran un incremento monótono en la suavidad y la extensibilidad con el aumento de la humedad relativa, que debería promover la adhesión.

La naturaleza de sólido viscoelástico de estas gotas de adhesivo podría ser debido a la reticulación física o química, si se trata de reticulación física, como enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas, las gotas de pegamento deberían comportarse como un líquido a alta humedad relativa; si se trata de reticulación química por otro lado, las gotas de pegamento deberían comportarse como un sólido con independencia de la humedad.

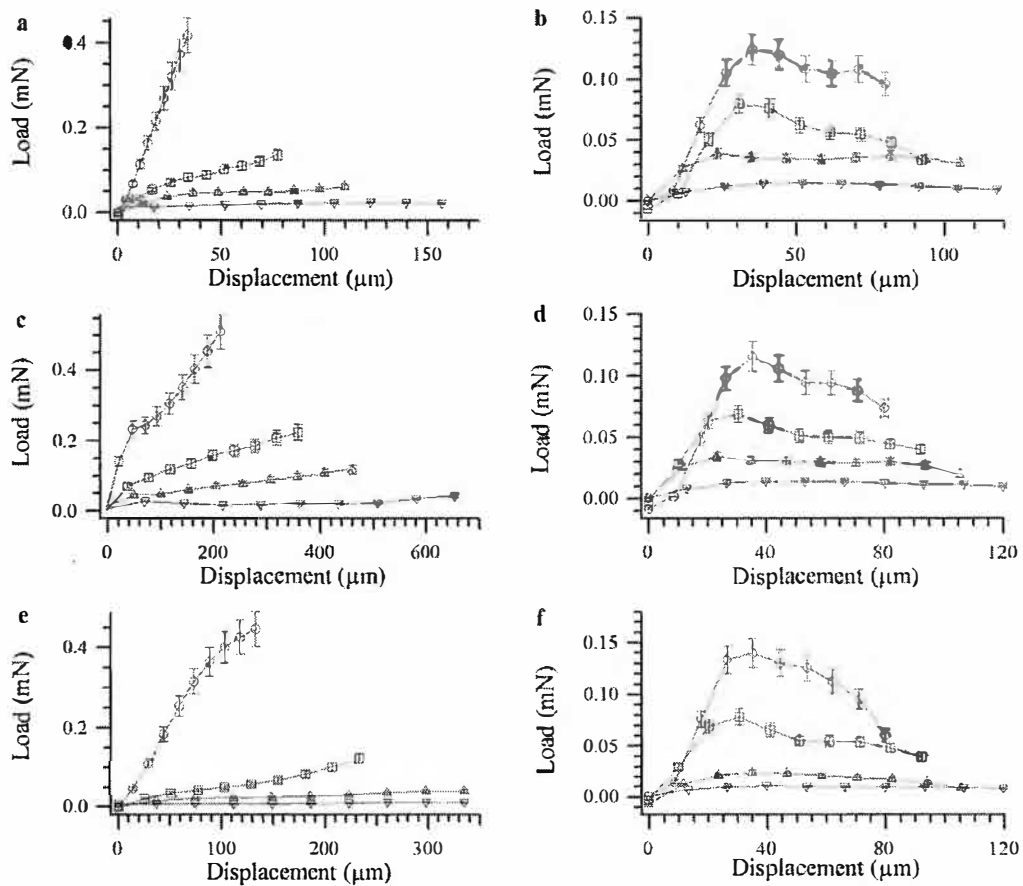


Figura 2.16.- Fuerza VS Desplazamiento. Comportamiento cuando las gotas de adhesivo de Seda viscosa (Seda de pie), se encuentran a 15% de HR: a (b), a 40% de HR: c (d), y a 90% de HR: e (f), se estira a $1 \mu\text{m} / \text{s}$ (triángulos invertidos), $10 \mu\text{m} / \text{s}$ (triángulos verticales), $50 \mu\text{m} / \text{s}$ (cuadrados), y $100 \mu\text{m} / \text{s}$ (círculos).

Fuente: Changes in the Adhesive Properties of Spider Aggregate Glue During the Evolution of Cobwebs [28].

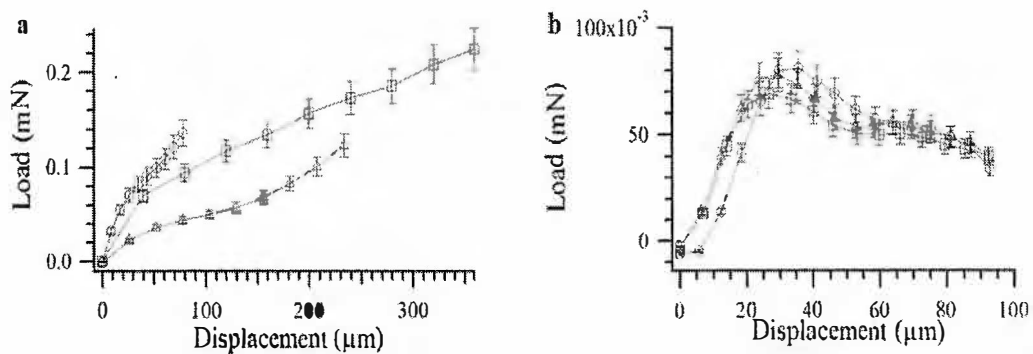


Figura 2.17.- Comparación entre el pegamento de seda viscosa y seda de pie. Comportamiento Fuerza VS desplazamiento bajo condiciones a) 15% de HR (círculos), 40% HR (cuadrados), y 90% de humedad relativa (triángulos verticales), se estiran a $50 \mu\text{m} / \text{s}$.

Fuente: Changes in the Adhesive Properties of Spider Aggregate Glue during the Evolution of Cobwebs [28].

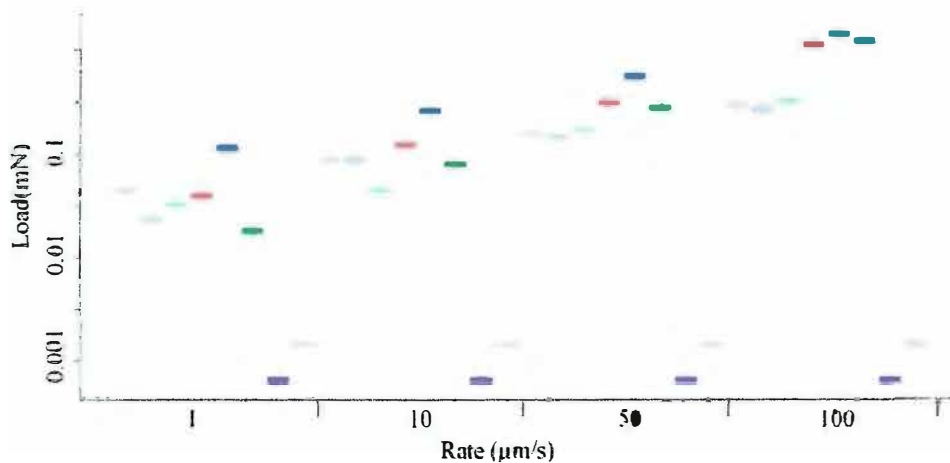


Figura 2.18.- Comparación de la fuerza de desprendimiento obtenida de la Figura 2.27 a y b, con las fuerzas de capilaridad ejercidas por entrelazar PDMS ($\gamma \sim 20 \text{ mN / m}$) y una solución acuosa de composición similar a la capa viscosa utilizada por las modernas arañas orbe para recubrir sus hilos de captura ($\gamma \sim 40 \text{ mN / m}$). La seda de pie es representada en colores claros: rojo (15% R.H.), azul (40% R.H.), y verde (90% R.H.), La seda viscosa representada por colores fuertes con la misma denominación que en la seda de pie. PDMS es representado en morado claro y la solución acuosa en un morado fuerte.

Fuente: *Changes in the Adhesive Properties of Spider Aggregate Glue During the Evolution of Cobwebs* [28].

Para probar estas predicciones, se muestran mediciones de relajación de carga en los que las gotas de pegamento, equilibradas a una humedad deseada, se estiran una distancia constante y la carga se deja relajar (Figura 2.19), para el adhesivo de la seda viscosa la magnitud de la meseta de carga disminuye a medida que aumenta la humedad, esto implica una reducción en la densidad de reticulación, y por ende en la elasticidad de las gotas (a, c y e), aunque esto sugiere la presencia de reticulación física, la reticulación química no puede ser completamente descartada debido a que la magnitud relativa de la meseta de carga a 90% de humedad relativa en comparación con la fuerza pull-off (medidos anteriormente) no se conoce debido a la resolución limitada de las medidas de fuerza. La hinchazón de las gotitas de pegamento viscoso a una humedad alta, se mantienen en su forma, así como la presencia de secuencias de aminoácidos similares a la elastina y la seda flageliforme de la araña, sugieren también reticulación química. Las gotas de adhesivo de la seda de pie, por otra parte, se comportan como un líquido viscoelástico en todos los niveles de humedad (b, d y f), cualquier meseta de carga es menor que la resolución del equipo, lo que sugiere la presencia baja de reticulación.

La fácil separación de las gotas de adhesivo de la seda de pie en cualquier sustrato contrasta con la formación de un puente colgante y eventual liberación de las gotas, además, los flujos de la seda de pie se fisuran y llegan a ser tan largos que las gotas pierden su forma, a diferencia de las gotas de pegamento de la seda viscosa que permanecen intactas, todas estas observaciones apoyan la naturaleza líquida viscoelástica del adhesivo la seda de pie.

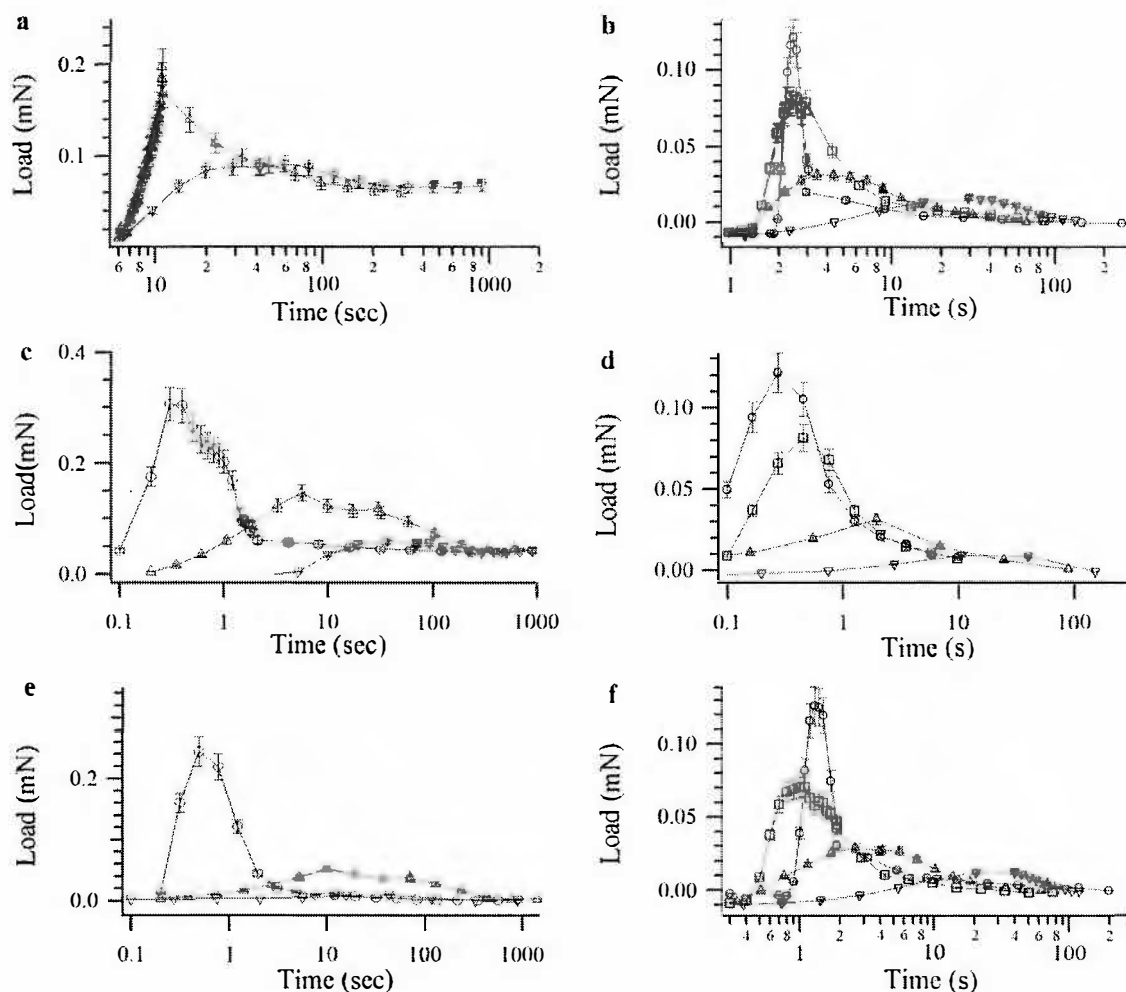


Figura 2.19.- Comportamiento de carga-relajación de las gotas de pegamento de Seda viscosa (Seda de pie): a un 15% de HR: a (b), 40% HR: c (d), y 90% HR: e (f); se extienden a una tasa de longitud constante de $1 \mu\text{m} / \text{s}$ (triángulos invertidos), $10 \mu\text{m} / \text{s}$ (triángulos verticales), $50 \mu\text{m} / \text{s}$ (cuadrados) y $100 \mu\text{m} / \text{s}$ (círculos).

Fuente: *Changes in the Adhesive Properties of Spider Aggregate Glue during the Evolution of Cobwebs* [28].

A bajas concentraciones de agua, la viscosidad y la elasticidad son muy altas, lo que tiende a aumentar la contribución del trabajo irreversible de adhesión, sin embargo, las tasas de propagación son muy lentas en estas concentraciones bajas, reduciendo así el área de contacto; a altas concentraciones de agua, las tasas de propagación son rápidas, pero las fuerzas viscosas y elásticas son más bajas, además, la eficacia del contacto interfacial de las glicoproteínas se reduce a altas concentraciones de agua debido a la lubricación.

Se plantea que los polímeros (probablemente glicoproteínas) en el adhesivo, no están reticulados, lo que se traduce en la ausencia del núcleo central denso visto en las gotas de la seda viscosa, también, mientras las gotas de la seda viscosa mantienen fluidez debido al agua absorbida por las sales higroscópicas, la seda de pie mantiene la fluidez debido a la presencia de los péptidos solubles en agua de bajo peso molecular que se encuentran en el recubrimiento. Estas diferencias explican por qué la adhesión de la seda de pie y la elasticidad son resistentes a los cambios de humedad, el adhesivo se hincha ligeramente, lo que provoca un aumento en la fluidez, suficiente para crear el flujo de gotas de adhesivo, pero no significativamente lo suficiente como para causar un cambio en su estructura o adhesión. Esta estrategia resistente a la humedad funciona muy bien para las arañas viuda negra ya que están obligadas a mantener su adhesividad del pegamento en una amplia gama de entornos, algunos de los cuales son bastante áridos.

La incapacidad del pegamento de la seda viscosa para adherirse a bajas humedades es la razón por la cual las mediciones individuales de estas gotas se realizaron a 15% HR y no a 0% de HR, la rigidez del adhesivo no permite que la sonda de vidrio del microscópico penetre en su interior en el intervalo de pre-fuerza usado para las mediciones.

Los estudios realizados han demostrado que la humedad juega un papel muy importante en la propiedad de adhesión en las sedas de las diferentes especies de araña, esta respuesta a la humedad se ha desarrollado de acuerdo al hábitat en el que existen y la necesidad de supervivencia que les proporcionan sus telarañas.

2.13. Criterio de Dahlquist

Los adhesivos sensibles a la presión o PSA, son ampliamente utilizados en la industria actual, tales como cintas, etiquetas, películas protectoras, etc. gracias a las investigaciones realizadas por Carl Dahlquist de la compañía 3M, quien plantea que la resistencia de una unión adhesiva se determina mediante las contribuciones termodinámicas de la energía interfacial (Fuerzas de Van der Waals) y las contribuciones reológicas en la capa de adhesivo en sí.

Para determinar mediante ensayos las propiedades adhesivas y poder medirlas, las investigaciones realizadas por C. Dahlquist y el criterio planteado por el mismo, son una base sólida de comparación. De acuerdo al accionar que tienen las gotas de adhesivo en su ambiente natural y por lo estudiado en investigaciones citadas anteriormente, consideramos a estas gotas de la seda de araña como adhesivos sensibles a la presión (PSA, Pressure Sensitive Adhesión). La naturaleza viscoelástica de los PSA les permite exponer tanto comportamientos sólidos y líquidos en función de variables tales como temperatura y la frecuencia de la tensión aplicada, este comportamiento de los adhesivos sensibles a la presión se describe por los parámetros viscoelásticos tales como el módulo elástico (E) y el módulo viscoso (G)[29].

Carl Dahlquist fue el primero en proponer un criterio reológico, en el cual plantea que la adhesión no se produce cuando el módulo de elasticidad (E) es mayor que 10^5 Pa, esto fue confirmado por Kraus (1979), Foley y Chu (1986), Dale (1989) y Han (1989) formando así la base para el estudio del mecanismo de control reológico de los adhesivos sensibles a la presión, entonces consideramos como un buen adhesivo cuando el módulo elástico se encuentre en el orden de los 100 KPa [30]. Las propiedades reológicas de los PSA se han discutido por muchos investigadores, por ejemplo, Takemura hizo el estudio de los adhesivos sensibles a la presión (PSA) desde el punto de vista de las propiedades viscoelásticas y estructuras de fase de polímeros [31].

El criterio de Dahlquist para adhesivos, así como los diversos estudios e investigaciones que existen para caracterizar la propiedad de adhesión en estas especies, nos ayudarán a estudiar el comportamiento adhesivo y elástico de otra especie de araña encontrada en el medio local, la especie *Argiope Argentata*, que utiliza este tipo de sistema adhesivo para la captura de sus presas, compararemos el resultado de nuestros ensayos para verificar la adherencia que posee nuestra muestra y poder definirla.

CAPITULO 3.- PARTE EXPERIMENTAL

El equipo utilizado para desarrollar la parte experimental, es un Microscopio de Fuerza atómica o AFM por sus siglas en inglés (Atomic Force Microscope), con este equipo desarrollamos el ensayo de nanoindentación sobre nuestras muestras con el objetivo de estudiar las propiedades elásticas de nuestro material biológico.

3.1. Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)

La Microscopía de Fuerza Atómica se utiliza para estudiar materiales y dar respuestas a preguntas necesarias para resolver problemas relacionados con los mismos, por ejemplo su procesado, además se ha empleado en el estudio de materiales relacionados con una amplia variedad de tecnologías como las de las industrias electrónica, telecomunicaciones, biológicas, químicas, aeroespaciales, energéticas, etc. Los materiales que se investigan suelen ser recubrimientos finos y gruesos, cerámicas, materiales compuestos, vidrios, membranas sintéticas y biológicas, metales, polímeros y semiconductores; el AFM también se está utilizando para realizar estudios de abrasión, adhesión, limpieza, corrosión, fricción, lubricación, enchapado y pulido. Mediante la utilización de AFM no sólo se pueden obtener imágenes a escala atómica sino que también se pueden medir las fuerzas aplicadas sobre un material a una escala de nanonewtons.

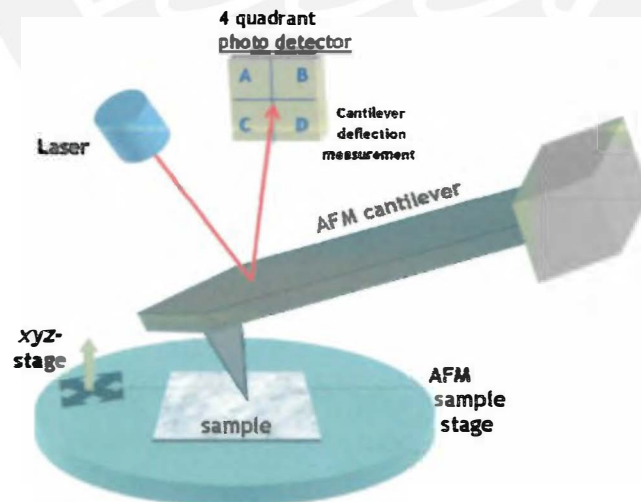


Figura 3.1.- Esquema del Microscopio de Fuerza Atómica

Fuente: Imagen extraída de <http://nano-tech.blogspot.com/>

3.2. Principios Básicos del AFM

Los principios básicos por los que se rige el trabajo de un AFM son muy sencillos, una punta muy fina se barre de manera automática sobre una superficie mediante un mecanismo de retroalimentación, que permite que unos scanners piezoeléctricos mantengan la punta interactuando con la superficie, a una fuerza constante (de esta manera se obtiene información de alturas, topografía), o a una altura constante (para obtener información de fuerza) respecto de la superficie de la muestra. Las puntas se fabrican normalmente de silicio o nitruro de silicio y se extienden hacia abajo desde el final del cantiléver o viga en voladizo.

Los cabezales de AFM poseen un sistema óptico de detección en el cual incide el haz del láser reflejado por el cantiléver (Figura 3.1). Un láser de diodo se focaliza sobre la parte trasera del cantiléver reflectante, a medida que la punta barre la superficie de la muestra, moviéndose hacia arriba o hacia abajo según el contorno superficial, el haz láser se refleja con un determinado ángulo en función de la deflexión sufrida por el cantiléver, e incide en una posición concreta de un fotodiodo de dos o cuatro elementos.

El fotodetector mide la diferencia en intensidad de luz entre los fotodetectores superiores y los inferiores así como entre los fotodetectores de la derecha y los de la izquierda. Una retroalimentación a partir de la señal diferencial relativa del fotodiodo a través del control mediante un programa de ordenador, permite que la punta se mantenga a fuerza constante o a una altura constante sobre la muestra. En el modo de fuerza constante el transductor piezoeléctrico da lugar en tiempo real a una desviación de altura; en el modo de altura constante lo que se recoge es la fuerza de deflexión sobre la muestra, este último modo de operación requiere que se inserten parámetros de calibración de la punta de barrido en la sensibilidad del cabezal del AFM durante la calibración de fuerza del microscopio.

Algunos AFM pueden trabajar con obleas de 200 mm, el primer propósito de este instrumento es medir cuantitativamente la rugosidad superficial con una resolución nominal lateral de 5 nm y vertical de 0.01 nm en todo tipo de muestras. Dependiendo del diseño del AFM, los scanners se utilizan para trasladar tanto la muestra bajo el cantilever como el cantilever sobre la muestra, barriendo de cualquiera de las dos maneras, se mide la altura local de la muestra, de esta manera se obtienen mapas tridimensionales de la topografía de la superficie representando la altura local de la muestra frente a la posición horizontal y vertical de la punta.

3.3. Resolución del Microscopio de Fuerza Atómica

El concepto de resolución en AFM es diferente de los microscopios basados en algún tipo de radiación, debido a que las imágenes obtenidas por AFM son tridimensionales. En cuanto a resolución se considera para microscopía la capacidad para distinguir dos puntos separados en una imagen, pero en el caso de AFM esto va a ser la denominada resolución lateral, ya que al ser imágenes tridimensionales las que se obtienen, será necesario considerar además una resolución vertical.

Existe una distinción importante entre imágenes obtenidas mediante ondas y las obtenidas mediante técnicas de barrido de una sonda: la primera está limitada por problemas de difracción y las últimas principalmente por la geometría de la sonda y de la muestra. Normalmente la anchura de una molécula de ADN se utiliza como medida de la resolución porque se conoce un diámetro de 2.0 nm en la forma B. Algunos de los mejores valores para AFM son de 3.0 nm para una forma de DNA en propanol. Desafortunadamente, esta definición de resolución puede no ser propia ya que la altura de la muestra y la geometría de la punta pueden afectar con claridad, de hecho, muchos autores han visto que es el radio de curvatura de la punta el que influye de manera significativa en la capacidad de resolución del AFM.

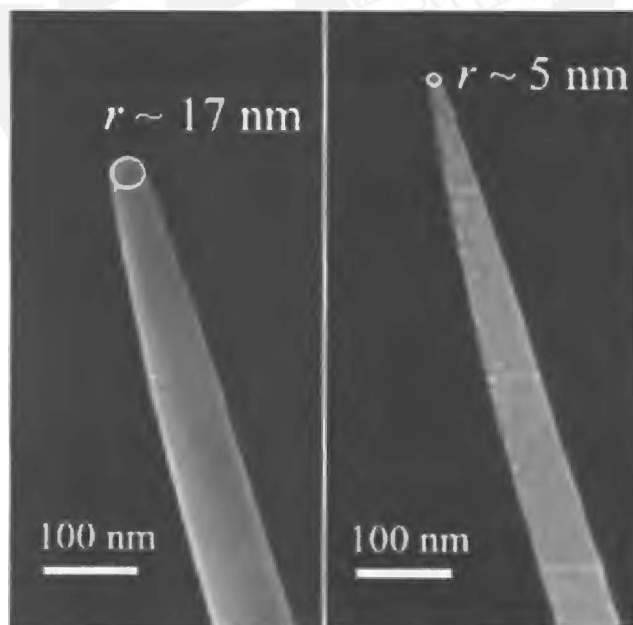


Figura 3.2.- Radio de la punta en la resolución de un AFM

Fuente: *Modelling the AFM Images of Colloidal Particles*. <http://adsorption.org/awm/afm.htm>

3.4. Tipos de puntas en un AFM

Las puntas de AFM se elaboran mediante procesos de microfabricación, pudiéndose obtener puntas con radios de curvatura de entre 1 y 20 nm. Las dimensiones de la viga en voladizo o cantiléver, varían entre 50 y varios centenares de micras determinando esta longitud su rigidez final, es decir la constante de fuerza del cantiléver (k o constante de la sonda) y por tanto, dependiendo de la aplicación o la superficie a analizar se elegirá una sonda u otra existiendo múltiples combinaciones entre la geometría, dimensiones de la punta y la longitud del cantiléver o viga en voladizo.

Las micropalanca pueden ser de diferentes formas, por ejemplo, las de forma triangular se pueden utilizar para las medidas de fricción y en medio líquido debido a su mayor estabilidad, y las de forma rectangular se suelen utilizar para realizar experimentos al aire. En la Figura 3.3 se muestran algunos ejemplos de puntas.



Figura 3.3.- Imágenes de puntas empleadas en AFM

Fuente: Wikimedia Commons, the free media repository, <http://commons.wikimedia.org>

La elección de la punta más apropiada para cada tipo de experimento es uno de los pasos previos más importantes, la circunstancia que limita en gran medida la elección son las condiciones de alta temperatura (hasta 145°C). A veces las puntas se fabrican con recubrimientos finos de un material reflectante, lo que permite un aumento de la reflectividad (muy importante en medios donde la reflectividad disminuye, por ejemplo agua). Las puntas de Si₃N₄ no pueden ser utilizadas en ensayos a alta temperatura debido a los diferentes coeficientes de expansión térmica entre el material de la punta y el del cantilever ya que se generarían tensiones en la punta, provocando un momento de torsión sobre ella que puede llegar a partirla.

Por este motivo, las puntas utilizadas en este tipo de experimentos serán de un único material, generalmente de Silicio. Mayormente, las casas comerciales proporcionan valores aproximados de los parámetros de la punta (las dimensiones, la constante de fuerza de la punta y la frecuencia de resonancia), sin embargo, a veces es mejor escoger un tipo de punta cuyo fabricante proporcione estos datos concretos de cada una, debido a la necesidad de una correcta caracterización, para evitar y minimizar los errores de cálculo en medidas de adhesión o fuerza.

3.5. Aislamiento Vibracional para Ensayos

Con el objetivo de obtener buenos resultados en experimentos con AFM, es necesario un aislamiento para evitar las vibraciones, el aislamiento vibracional ideal consiste en utilizar una gran masa sujeta por cuerdas ancladas a la estructura del edificio donde se encuentre el equipo. En nuestro procedimiento, el AFM posee una base amortiguada que evitará la transmisión de vibraciones durante el ensayo.

3.6. Modos de Ensayo en AFM

3.6.1. Modo contacto

El modo de contacto es aquél en el que la punta barre la muestra en contacto cercano con la superficie, es el modo con el que trabaja el microscopio de fuerza desde sus inicios. La fuerza en la punta es repulsiva con un valor medio de 10^{-9} N, esta fuerza se ajusta presionando el cantilever contra la superficie de la muestra con un elemento piezoeléctrico de posicionamiento. En el modo de contacto la deflexión del cantilever es detectada y comparada en un amplificador de retroalimentación respecto a algún valor concreto de deflexión, si la deflexión medida es diferente del valor elegido el amplificador de retroalimentación aplica un voltaje al elemento piezoeléctrico para bajar o subir la muestra en relación al cantilever de manera que se restablezca el valor de deflexión deseado. El voltaje que el amplificador de retroalimentación aplica al piezo es una medida de la altura asociada al contorno de la superficie de la muestra pues tiene una correspondencia directa con la deformación sufrida por el piezoeléctrico en el eje Z.

Esta altura se almacena en función de la posición lateral de la muestra (ejes: x, y) obteniéndose así una imagen topográfica o de alturas de la superficie de la muestra. Algunos instrumentos operan en alto vacío (Ultra High Vacuum, UHV) pero la mayoría lo hacen a atmósfera ambiente o en líquidos. Los problemas que pueden surgir con el modo

de contacto son debidos a las elevadas fuerzas aplicadas a la punta sobre la muestra, estos efectos se pueden minimizar disminuyendo dichas fuerzas pero existen límites prácticos en la magnitud de la fuerza que pueden controlarse por el operador durante una medida en atmósfera ambiente.

Algo que es necesario tener muy en cuenta cuando se trabaja con el modo de contacto, es que en atmósfera ambiente, las superficies de las muestras están recubiertas por una capa de gases adsorbidos que consisten en vapor de agua y nitrógeno, con espesores que oscilan entre 10 y 30 monocapas; cuando la punta toca esta capa contaminante, se forma una pequeña fuerza y el cantiléver es estirado hacia abajo por la tensión superficial hacia la superficie de la muestra. La magnitud de la fuerza depende de los detalles de la geometría de la muestra, pero es típicamente del orden de 100 nN, esta pequeña fuerza y otras fuerzas atractivas se pueden neutralizar trabajando con la punta o toda la muestra totalmente sumergidas en un líquido.

Existen muchas ventajas de trabajar con AFM teniendo la muestra y el cantilever sumergido en un líquido. Estas ventajas incluyen la eliminación de fuerzas capilares, la reducción de fuerzas de Van der Waals y la capacidad para estudiar procesos tecnológicamente y biológicamente importantes en interfaces sólido-líquido. Sin embargo, hay también algunas desventajas cuando se trabaja en ambiente líquido, como pueden ser escapes en el dispositivo de medida, degradación de muestra, etc. Además, una gran cantidad de muestras, que incluyen semiconductores y aislantes, pueden atrapar carga electrostática (parcialmente disipada en líquidos), esta carga puede contribuir a una fuerza adicional atractiva entre la punta y la muestra.

Todas estas fuerzas se combinan para definir una fuerza mínima normal que puede ser aplicada de manera controlada entre la punta y la muestra, esta fuerza normal crea una importante fuerza de fricción a medida que la punta barre la muestra; en la práctica, se observa que estas fuerzas de fricción pueden causar daños sobre la muestra, incluso mayores que la fuerza normal, provocando falta de sensibilidad en la sonda del cantilever distorsionando por tanto los datos resultantes. Un intento para evitar estos problemas es utilizar el modo de no-contacto.

3.6.2. Modo No Contacto

Se utiliza en situaciones en las que el contacto con la punta puede alterar la muestra, en este modo de trabajo la punta se sitúa a 50 – 150 Angstrom por encima de la superficie de la muestra, lo que se detectan son las fuerzas atractivas de Van der Waals entre la punta y la superficie de la muestra, construyéndose imágenes topográficas barriendo la punta sobre la superficie de la muestra. Desafortunadamente, las fuerzas atractivas que ejerce la muestra son sustancialmente más débiles que las utilizadas en el modo de contacto, por tanto, es necesario generar una pequeña oscilación en la punta de manera que se puedan detectar las pequeñas fuerzas entre la punta y la muestra, mediante la medida de cambios en la amplitud, fase o frecuencia de la oscilación del cantilever en respuesta a gradientes de fuerza procedentes de la muestra. En general la capa fluida de contaminante es sustancialmente más gruesa que el rango de fuerzas de Van der Waals y por tanto, los intentos de obtener verdaderas imágenes con el método de no-contacto fallan en el momento que la punta oscilante se ve atrapada en la capa fluida o se encuentra situada más allá del rango efectivo de fuerzas que intenta medir.

3.6.3. Modo de Contacto Intermitente o "Tapping"

El modo "tapping" o contacto intermitente es la herramienta más avanzada en AFM, este método tan potente permite una alta resolución en imágenes topográficas de superficies de muestras que pueden dañarse con facilidad. El modo "Tapping" está libre de problemas asociados a fricción, adhesión, fuerzas electrostáticas y otras dificultades.

El modo de "Tapping" trabaja en atmósfera ambiente mediante oscilación del cantilever a su frecuencia de resonancia o cercana a ella utilizando un cristal piezoeléctrico, el movimiento del piezo provoca que el cantilever oscile con una elevada amplitud (en general mayor de 20 nm) cuando la punta no está en contacto con la superficie. La punta oscilante entonces se mueve hacia la superficie hasta que comienza a tocar ligeramente o golpear la superficie. Durante el barrido, la punta con oscilación vertical contacta y se eleva de manera alternativa generalmente a una frecuencia de 50 a 500 KHz, durante el contacto intermitente de la punta con la superficie, la oscilación del cantilever se ve reducida debido a la pérdida de energía causada por el propio contacto. La reducción en la amplitud de oscilación se utiliza para identificar y medir las características superficiales.

3.6.3.1. *Imágenes topográficas*

Durante una operación con modo de trabajo “tapping”, la amplitud de oscilación del cantilever se mantiene constante mediante un bucle de retroalimentación, la selección de la frecuencia óptima de oscilación se realiza mediante la ayuda de un programa de ordenador y la fuerza sobre la muestra se ajusta automáticamente y se mantiene al menor nivel posible. Cuando la punta pasa sobre una montaña en la superficie, el cantilever tiene menos espacio para oscilar y la amplitud de oscilación disminuye; por el contrario, cuando la punta pasa por un bache, el cantiléver posee más espacio para oscilar y la amplitud aumenta.

La amplitud de oscilación de la punta se mide con el detector óptico y se introduce en el controlador del equipo, entonces el bucle digital de retroalimentación ajusta la separación punta-muestra de manera que se mantenga constante la amplitud y la fuerza sobre la muestra. Cuando la punta toca la superficie, la alta frecuencia utilizada en la oscilación (50 KHz– 500 KHz) da lugar a una respuesta de la muestra con carácter rígido (elástico) de manera que las fuerzas de adhesión se ven enormemente reducidas. El modo “tapping” previene por tanto que la punta se quede en cierta manera “adherida” a la muestra causando daño durante el barrido.

Al contrario que los modos de contacto y no contacto, cuando la punta toca la superficie posee suficiente amplitud de oscilación como para que no afecten las fuerzas de adhesión, no se producen desgarros o arrastre de muestra debido a fuerzas de cizalla ya que las fuerzas aplicadas son siempre verticales. Otra ventaja del modo “tapping” es su amplio intervalo lineal de trabajo, esto hace muy estable el sistema de retroalimentación vertical, permitiendo medidas altamente reproducibles. El modo de “tapping” en fluidos tiene las mismas ventajas como las que tiene cuando se trabaja a atmósfera ambiente o a vacío, sin embargo, los fluidos tienden a disminuir la frecuencia normal de resonancia del cantilever.

3.6.3.2. *Imágenes de contraste de fase*

Mediante el trabajo con un AFM en el modo de “tapping” se pueden obtener un tipo de imágenes particularmente útil, cuando se quieren analizar sistemas poliméricos heterogéneos con dominios de distintas propiedades mecánicas. Aprovechando la característica viscoelástica de los sistemas poliméricos o inelasticidad de los materiales

en general, es posible analizar la diferencia de fase entre la señal perturbadora de la muestra, es decir, la deformación cíclica del cantilever sin interactuar con la muestra, y sus deformación cíclica al interactuar la punta con la muestra. Es sabido que los materiales viscoelásticos sufren deformaciones que dependen del tiempo ante una perturbación mecánica y que esa dependencia temporal es función del tipo de material.

Por este motivo, el desfase existente entre la señal perturbadora y la señal respuesta debe ser distinto en un sistema polimérico heterogéneo al pasar de un dominio, con unas determinadas características mecánicas, a otro con otras diferentes, en principio, se espera que las fases blandas den lugar a mayores desfases que las fases duras.

3.6.4. Ventajas y desventajas de los modos Contacto, No-contacto y Tapping

Modo Contacto

Ventajas

- Alta velocidad de barrido
- Es el único modo de trabajo que permite obtener imágenes con resolución atómica
- Muestras muy rugosas con cambios extremos en su topografía vertical a veces se pueden barrer con más facilidad en el modo contacto.

Desventajas

- Las fuerzas laterales (cizalla) pueden distorsionar las características de la superficie en la imagen.
- Las fuerzas normales de interacción punta-muestra pueden ser altas en aire debido a las fuerzas de capilaridad desde la capa de fluido sobre la superficie de la muestra (agua y nitrógeno).
- La combinación de fuerzas laterales y elevadas fuerzas normales pueden dar lugar a una reducción en la resolución espacial y pueden dañar muestras blandas como por ejemplo, muestras biológicas, polímeros, silicio.

Modo “Tapping”

Ventajas

- Mayor resolución lateral en la mayoría de las muestras (1 – 5 nm)
- Menores fuerzas y menos daño en muestras blandas al trabajar al aire
- Las fuerzas laterales son virtualmente eliminadas, de manera que no deberían producirse ralladuras.

Desventajas

- Ligeramente menores velocidades de barrido que en el modo contacto.

Modo no-contacto

Ventajas

- No se ejercen fuerzas sobre la superficie de la muestra

Desventajas

- Menor resolución lateral, limitada por la separación punta-muestra
- Menor velocidad de barrido que en los dos modos de trabajo considerados anteriormente para evitar contacto con la capa de fluido adsorbida sobre la superficie de la muestra que podría causar que la punta se quedase pegada.
- El modo no-contacto generalmente sólo se utiliza para estudiar muestras muy hidrofóbicas donde la capa de fluido adsorbida es mínima. Si la capa es demasiado gruesa la punta puede quedar atrapada causando inestabilidad en el sistema de retroalimentación.

3.7. AFM en Líquidos

La obtención de imágenes por AFM cuando la muestra está en contacto con un líquido es una tecnología con un crecimiento extraordinario, probablemente una de las razones de su advenimiento es la necesidad de: i) minimizar las fuerzas superficiales en muestras delicadas; ii) estudiar muestras biológicas en su ambiente natural y iii) observar en tiempo real muestras en las que tienen lugar reacciones electroquímicas como por ejemplo estudios de corrosión.

La obtención de imágenes de una muestra en un entorno líquido elimina las fuerzas atractivas debido a la tensión superficial, esto permite que se puedan obtener imágenes de la superficie de la muestra utilizando una fuerza sobre la punta del cantilever mínima, algo que es imprescindible cuando se quieren estudiar muestras tan delicadas como las biológicas.

3.8. Evaluación de Propiedades Mecánicas

Elasticidad del material

Es posible obtener información relacionada a la elasticidad del material mediante el estudio de las curvas de fuerza, en un experimento para obtener una curva de fuerza con un AFM, la cantidad flexionada (deformada) de la viga en voladizo o cantiléver para una cantidad dada de movimiento hacia debajo de la punta o hacia arriba del piezo, nos da una idea de la elasticidad del material. Por ejemplo, si el material es extremadamente rígido, un ligero desplazamiento del piezo debe dar lugar a una gran deflexión por parte del cantiléver mientras que si el material es blando, el cantilever flexionará menos durante su descenso.

La forma y la pendiente de la porción en la que existe contacto punta-muestra nos dará una información detallada sobre la elasticidad de la superficie de la muestra, incluso, en estos casos es posible obtener medidas cuantitativas sobre la elasticidad superficial del material, como sucede en nuestros ensayos, hallamos el modulo de elasticidad de estas muestras a partir de la deflexión que obtenemos de la viga en voladizo.

3.9. Procedimiento Analítico en los Ensayos

Módulo de Elasticidad

El Módulo de Elasticidad o Módulo de Young es el coeficiente de elasticidad para materiales, puede variar desde 100 GPa para materiales duros (vidrio, acero, etc) a 100 MPa para polímeros típicos (poliestireno) , y 1 MPa para materiales blandos tipo gel. Los valores esperados para el adhesivo de la seda están entre 20 y 100 KPa.

Con el fin de obtener con precisión el módulo de Young (E), las características de la punta como el radio de la punta , el ángulo del cono y la constante de fuerza deben ser estimados cuidadosamente, además, la deformación de la punta debe ser insignificante. El material de la punta para el ensayo es Si₃N₄ y su módulo de Young es de 150 GPa, de acuerdo al equipo el Módulo de Elasticidad del cantiléver es de 169 GPa, tenemos entonces que ambos módulos de elasticidad son considerablemente mayores a los que esperamos obtener en el adhesivo, podemos despreciar a estos elementos como fuentes de error debido a la magnitud de sus coeficientes.

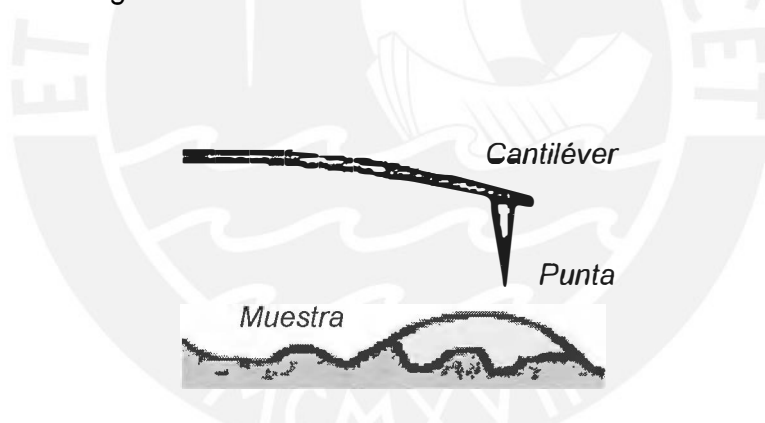


Figura 3.4.- Esquema del ensayo de nanoindentación a realizarse en las muestras del adhesivo

Fuente: JPK Application Report. Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy. www.jpk.com

Para obtener el módulo de Young o módulo elástico de las gotas del adhesivo de la seda de araña se realizan ensayos de nanoindentación con un AFM. La información que se recoge se grafica en una curva donde el eje horizontal corresponde a la posición vertical (Z) de la punta del cantiléver, mientras que el eje vertical corresponde a la deflexión del cantiléver provocada por las fuerzas de interacción entre la punta del cantiléver y la superficie de la muestra.

Fuerza de Contacto

Para calcular la fuerza de contacto obtenemos la curva de fuerza del ensayo mediante AFM, que muestra su relación respecto al diferencial del cantiléver, la fuerza de contacto en la viga del AFM se define por la ecuación:

$$F = K \cdot d \dots\dots\dots (3.1)$$

Donde

- *K* : Constante de la Viga en voladizo o cantiléver
- *d* : Deflexión del cantiléver

Modelo de Hertz

Un modelo para describir la respuesta elástica de un ensayo de indentación con AFM es el Modelo de Hertz o Modelo Hertziano, el cual relaciona la Fuerza de contacto existente y el módulo de elasticidad de la muestra, conjuntamente con las propiedades del ensayo. La geometría más apropiada para la punta del AFM, en nuestro ensayo, es la de un cono cilíndrico con un ángulo de contacto “ α ” respecto de la muestra, el Modelo de Hertz es empleado para una punta infinitamente rígida y una muestra plana y suave, empleamos la siguiente relación para nuestro ensayo:

$$F = \delta^2 \frac{\pi}{2} \frac{E}{(1-\nu^2)} \tan(\alpha) \dots\dots\dots (3.2)$$

Donde

- *F*: Fuerza de Contacto
- *E*: Módulo Elástico
- *ν* : Relación de Poisson
- *α* : Ángulo de abertura del cono
- *δ* : profundidad de indentación (deflexión)

El Modelo Hertziano también predice el área de contacto, entre la punta del AFM y la muestra del adhesivo, como una función de la fuerza de carga, con la siguiente relación:

$$r = \sqrt{F \frac{2}{\pi \cdot \tan(\alpha)} \frac{(1 - \nu^2)}{E}} \dots\dots\dots (3.3)$$

Donde

- r : Radio del área de contacto

En la curva de fuerza, que obtendremos del ensayo de indentación con AFM, sobre una muestra que es muy rígida en comparación con la constante del cantiléver, la deflexión “d” de la viga en voladizo será igual a la profundidad en la muestra

$$z = d \dots\dots\dots (3.4)$$

En el ensayo de indentación con AFM sobre una muestra suave, la profundidad de indentación sobre la muestra será causada por la deflexión del cantiléver y profundidad de penetración, de esta forma la ecuación 3.4, deberá modificarse de la siguiente forma:

$$z = d + \delta \dots\dots\dots (3.5)$$

Usamos la ecuación de Fuerza de contacto (3.1) para reformular e introducirla en el Modelo de Hertz (3.2), y obtenemos:

$$K \cdot d = \delta^2 \frac{\pi}{2} \frac{E}{(1 - \nu^2)} \tan(\alpha) \dots\dots\dots (3.6)$$

La ecuación 3.6 puede variar de manera que obtengamos una expresión en función de la indentación, la cual puede ser usada en la ecuación 3.5 para reemplazar δ :

$$\delta = \sqrt{\frac{K}{\left(\frac{\pi}{2}\right) \cdot \left[\frac{E}{(1 - \nu^2)}\right] \cdot \tan(\alpha)} \sqrt{d}} \dots\dots\dots (3.7)$$

$$z = d + \sqrt{\frac{K}{\left(\frac{\pi}{2}\right) \cdot \left[\frac{E}{(1-\nu^2)}\right] \cdot \tan(\alpha)}} \sqrt{d} \dots\dots\dots (3.8)$$

Esta es finalmente la función matemática que describe la curva de fuerza tal como se mide en una muestra blanda, para obtener los valores de las propiedades elásticas tenemos primero que determinar de forma independiente la constante K del cantiléver y su ángulo de contacto. Luego podremos usar la ecuación 3.8 para el montaje de los datos medidos y obtener un valor para el módulo de elasticidad.

Sabemos que el módulo de elasticidad de la punta es mucho mayor que el módulo de elasticidad de la muestra que esperamos obtener, el Modelo de Hertz plantea la siguiente expresión para despreciar el error causado por este valor:

$$\frac{1-\nu}{E} = \frac{1-\nu_{punta}^2}{E_{punta}} + \frac{1-\nu_{muestra}^2}{E_{muestra}} \dots\dots\dots (3.9)$$

El módulo de Elasticidad de la punta es mucho mayor al de la muestra de adhesivo:

$$E_{muestra} \ll E_{punta}$$

Al simplificar la ecuación 3.9 de acuerdo a esta consideración, obtenemos:

$$\frac{1-\nu}{E} = \frac{1-\nu_{muestra}^2}{E_{muestra}} \dots\dots\dots (3.10)$$

Entonces reemplazamos la relación obtenida (3.10) dentro del modelo de Hertz (3.2), de manera que obtenemos la relación de la fuerza de contacto, hallada en el ensayo con AFM, según el módulo de elasticidad de la muestra del adhesivo:

$$F = \delta^2 \frac{\pi}{2} \frac{E_{muestra}}{(1-\nu_{muestra}^2)} \tan(\alpha) \dots\dots\dots (3.11)$$

Los ensayos con AFM nos muestran la curva de relación entre la fuerza de contacto y el desplazamiento del cantiléver, debemos ajustar esta función para compararla con el modelo de contacto de Hertz y obtener los valores correspondientes. Con la siguiente forma podremos comparar el resultado de nuestros ensayos con el modelo:

$$F = A \delta^2 + B \dots\dots\dots (3.12)$$

Donde:

$$A = \frac{\pi E_{muestra}}{2 (1 - \nu^2)} \tan(\alpha) \dots\dots\dots (3.13)$$

Según las curvas de Fuerza vs Desplazamiento, obtenidas de los ensayos, podremos hallar la fuerza de contacto de la punta con la muestra, usaremos la expresión de la ecuación 3.13 para obtener por semejanza valores de “A”, y consecuentemente encontrar el módulo de elasticidad para la curva de cada ensayo realizado.

3.10. Muestra Experimental

Para obtener las muestras del adhesivo de la seda de araña, y realizar los ensayos de nanoindentación con AFM, se capturó a ocho ejemplares de la especie de araña *Argiope Argentata* o araña plateada, estas arañas fueron encontradas en las afueras de Lima, cerca de los pantanos de Villa en Chorrillos, donde se encuentran en forma masiva debido a la naturaleza y condiciones del ambiente. Las arañas con mayor posibilidad de tejer la telaraña son las hembras adultas, las cuales se diferencian por su tamaño, llegan a medir entre 4 y 6 centímetros.

Los ejemplares capturados para el estudio fueron puestos en lugares especiales “jaulas” (dimensiones: 40 x 30 x 15 cm) con el suficiente espacio para que puedan tejer su telaraña y poder extraer la muestra. Fueron alimentadas con larvas de gusano (tenebrio molitor) de 2 a 3 veces por semana. En la Figura 3.5 se muestran los lugares donde permanecieron las arañas durante el estudio, dentro del laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales; y en la Figura 3.6 se ve a la especie *Argiope Argentata* alimentándose sobre su telaraña.



Figura 3.6 .- Arañas de la especie Argiope Argentata criadas en el laboratorio de nanomateriales para su proxima toma de muestras.

Fuente: Foto tomada en el laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Facultad de Ingeniería Mecánica.



Figura 3.5 .- Especie Argiope Argentata

Fuente: Foto tomada en el laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Facultad de Ingeniería Mecánica.

Las muestras de adhesivo para el ensayo, fueron extraídas luego que las arañas tejieran sus redes, y son sacadas con mucho cuidado de las fibras circunferenciales de la telaraña, en la Figura 3.7 y 3.8 se muestran imágenes de las gotas del adhesivo ubicadas de manera casi uniforme a lo largo de la fibra.



Figura 3.7.- Muestra tomada por medio de Microscopia Electrónica de Barrido

Fuente: Nanomecánica de materiales biológicos [37].

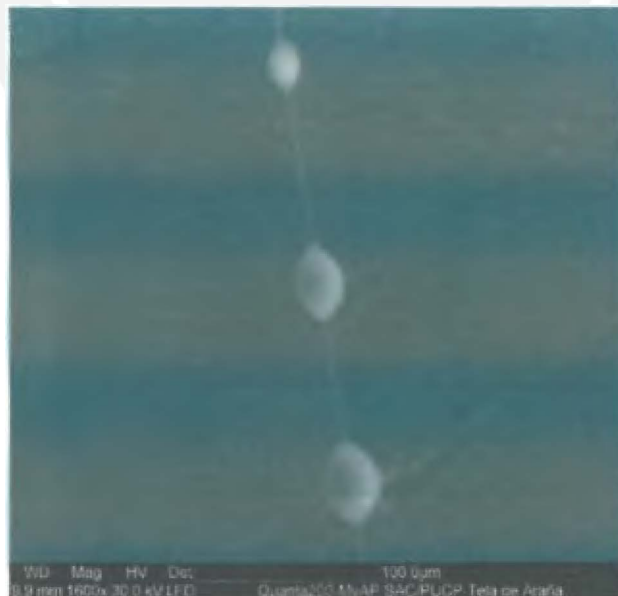


Figura 3.8.- Muestra tomada por medio de Microscopia Electrónica de Barrido

Fuente: Nanomecánica de materiales biológicos [37].

3.11. Equipo Experimental AFM

Para realizar el ensayo de nanoindentación en el bioadhesivo de la seda de araña se usó un Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) de marca Nanosurf 2 EasyScan, equipo que fue facilitado por el Laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica. (Figura 3.9).

El Nanosurf 2 EasyScan es un AFM que puede medir la topografía y varias otras propiedades de una muestra con resolución nanométrica, estas mediciones se realizan, se muestran y calculan utilizando el software de control de SPM. El EasyScan 2 es un sistema de escaneo con sonda modular que se puede ampliar para obtener más capacidades de medición. Las partes principales del sistema básico son: el cabezal de escaneo, el escenario de muestra AFM, el controlador EasyScan 2 con AFM en módulo básico, y el software SPM de control. El software está instalado en una computadora donde se controla el proceso del ensayo, desde el posicionamiento de la punta sobre la muestra, hasta las curvas y datos obtenidos de la experiencia.

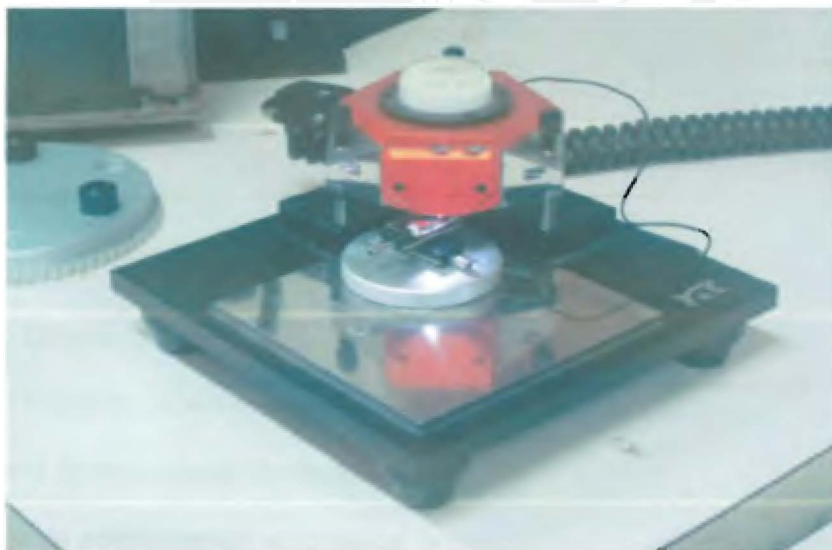


Figura 3.9.- AFM en modo de escaneo simple.

Fuente: Foto tomada en el laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

Los datos y Especificaciones del equipo según el fabricante son las siguientes:

- Medidas / Peso: 470x120x80 mm / 2.4 kg.
- Fuente de poder: 90 - 240 V~ / 30 W 50/60 Hz.
- Escaneo: 16 bit D/A
- Velocidad de escaneo: mayor a 60ms/linea, 128 puntos/linea
- Canales de medida: 16bit A/D, mayor de siete señales dependiendo del modo.
- Area de escaneo: mayor a 2048 x 2048 puntos.
- Rotación de imagen: 0 - 360°
- Modo de Spectroscopia: Medida de puntos individuales o a lo largo de un vector.
- Promedio de medida en Spectroscopia: 1 - 1024 veces.
- Puntos en Spectroscopia: mayor a 2048.

Cabezal de Escaneo:

Cabezal de Escaneo	10 μm	70 μm	110 μm
Rango máximo de escaneo	10 μ m	70 μ m	110 μ m
Rango máximo del eje Z	2 μ m	14 μ m	22 μ m
Resolución - Eje Z	0.027 nm	0.21 nm	0.34 nm
Resolución - XY	0.15 nm	1.1 nm	1.7 nm
Error lineal en XY	< 0.6 %	< 1.2 %	< 0.6 %

Características de Escaneo

- Modo Dinámico: NCLR, ZEHR, EFM, MFMR ACLA, MAGT, FORTA.
- Modo Estático: CONTR, LFMR, ZEILR SICONA
- Tamaño de la muestra: Ilimitado
- Rango de aproximación automática: 5 mm.
- Velocidad máxima de aproximación: 0.1 mm/s.
- Alineamiento del cantilever: Ajuste automático
- Peso del cabezal de escaneo: 350 g.

3.12. Desarrollo de los Ensayos

Para el desarrollo de los ensayos con AFM se usó un cantiléver, o viga en voladizo Tipo CTRN en Modo Estático (modo de muestreo), la muestra es colocada sobre un sustrato: Mica TO-220.

Para tener una mejor manipulación de las muestras y poder realizar la nanoindentación de una manera mas fácil y efectiva, nos ayudamos de un microposicionador Suter MM-1 y colocamos el sustrato con la muestra sobre este (Figura 3.10), el cual tiene grados de libertad en los ejes X e Y, de esta forma podemos manejar mejor la muestra al momento de indentar en la gota y hacer que esta coincida bajo la punta del cantiléver.

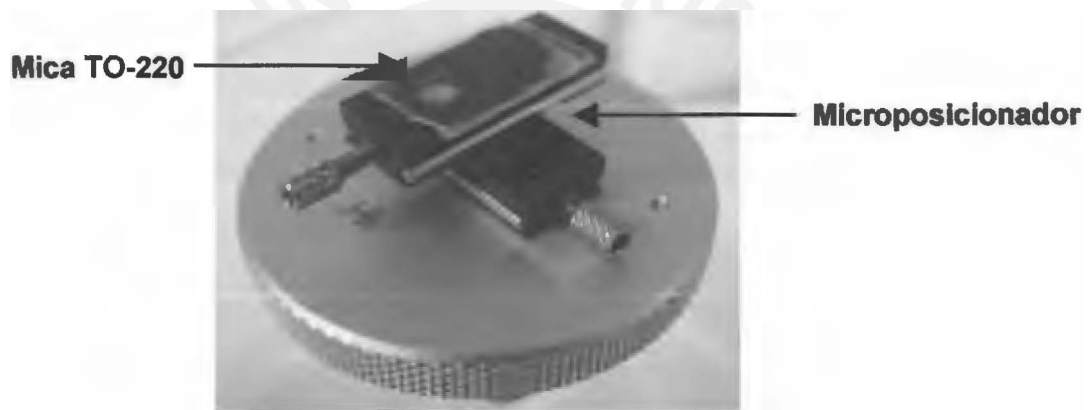


Figura 3.10.- Microposicionador Suter MM-1.

Fuente: Foto tomada en el laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

El sustrato con la muestra del adhesivo es colocado bajo el cabezal del AFM con ayuda del microposicionador, para obtener un correcto escaneo de nuestra muestra es preferible empezar por escanear la fibra sobre la que va unida la gotita, de esta manera podremos visualizar, durante el barrido (escaneo), el momento en que la punta del cantiléver se posiciona sobre la gota y empieza a barrerla. Como es de esperarse, por ser un material no sólido, la figura que obtendremos durante el escaneo del adhesivo con AFM puede distorsionarse, debido a que estamos haciendo contacto con una superficie líquida y adhesiva, entonces no obtendremos una topografía clara de la muestra.

Con el AFM EasyScan 2 es posible observar el momento del barrido sobre la gota mediante unos lentes de aumento ubicados en el cabezal del AFM, el lente izquierdo nos brindara una vista de referencia del cantiléver sobre el plano XY como lo muestra la **Figura 3.11**, y así mismo, el lente derecho nos dará una vista del cantiléver en el plano Z, **Figura 3.12**, donde podemos calcular su proximidad a la muestra, así podremos observar mejor el momento del contacto entre la gota y la punta del cantiléver, entendiendo el motivo por el que se distorsiona la figura durante el muestreo.

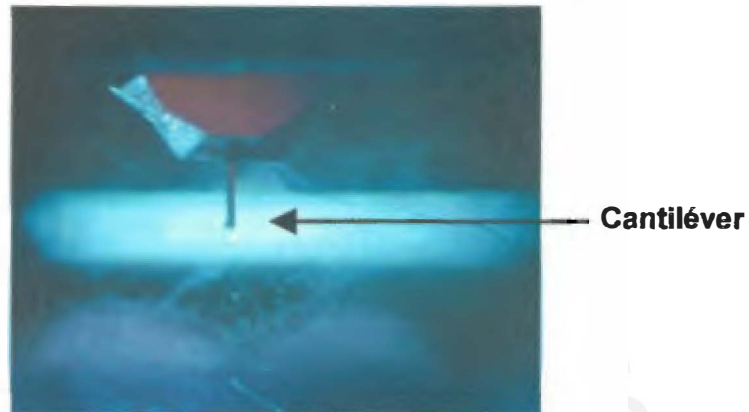


Figura 3.11.- Foto tomada del lente izquierdo del cabezal del AFM – referencia del plano XY.

Fuente: Foto tomada en el laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

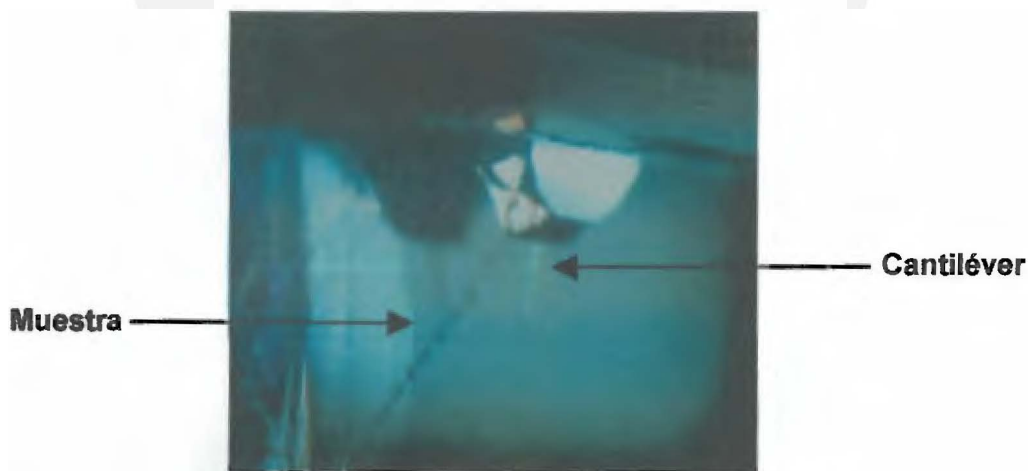


Figura 3.12.- Foto tomada del lente derecho del cabezal del AFM – referencia en el plano Z.

Podemos observar el cantiléver sobre el hilo y las gotas del adhesivo

Fuente: Foto tomada en el laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

Ensayos sobre Muestras

Una vez ubicado el cantiléver a una distancia aproximada sobre la muestra de la fibra y el adhesivo, procedemos a realizar el barrido o escaneo con el cantiléver, con el objetivo de obtener un esquema donde podamos visualizar la posición de nuestra muestra. Observamos a continuación las muestras que se obtuvieron con mejor resolución y detalle, están debidamente identificadas con una etiqueta que nos indica las condiciones del ensayo.

Muestra E.3.1.

MUESTRA	E.3.1.
Especie	Argiope Argentata
Equipo	AFM Nanosurf easyScan 2
Viga (tipo)	CTRN
Angulo de contacto (α)	50°
Temperatura	22°C
HR	81%

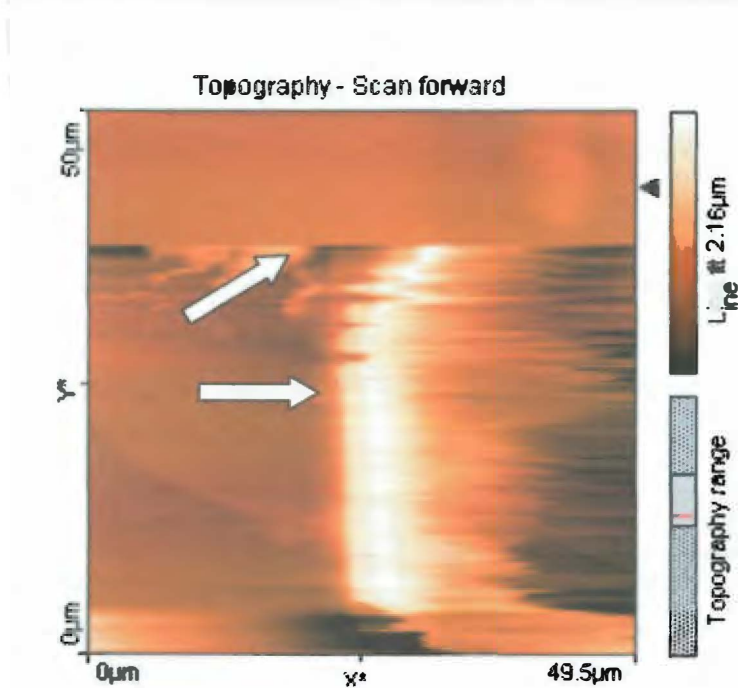


Figura 3.13.- Muestra E-3.1.

Fuente: Imagen obtenida del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

Podemos ver en la Figura 3.13 la fibra de seda vertical con un tono blanco y más claro que el resto de la pantalla, en la parte superior a esta hilera blanca observamos que la señal del cantiléver en un determinado momento empieza a distorsionarse y lo que queda del escaneo se ve de un color uniforme, esto sucede porque la punta del cantiléver se pone en contacto con el adhesivo, se puede observar esto por el lente derecho del cabezal, veremos como el cantiléver arrastra la gota durante lo que le resta de barrido.

A partir de este punto podemos saber que escaneamos sobre el adhesivo de la seda, entonces los ensayos de nanoindentación que haremos por medio de la función de espectroscopia del AFM, se realizarán dentro del rango de la gota. Para la muestra E.3.1. es difícil ubicar los límites exactos del adhesivo porque no tenemos una buena guía de los límites, esto podría llevarnos a realizar la indentación sobre el sustrato o mica donde se monta la muestra.

Muestra E.3.2.

En esta muestra no podemos observar la fibra axial de seda porque el escaneo con el cantiléver se posiciona de frente sobre la gota, podemos ver en la parte blanca y clara de forma circular lo que vendría a ser la gota del adhesivo (indicado por la flecha), pero no estamos seguros de estar escaneándola porque la imagen debería estar un poco distorsionada, entonces al no tener la certeza de que vamos a realizar la indentación sobre la gota, decidimos que esta muestra no sería un buen referente para el ensayo de nanoindentación y estimación de valores.

Tanto las muestras E.3.1 y E.3.2 fueron ensayadas inmediatamente después de haber sido extraídas de la telaraña y colocadas sobre el sustrato, no fueron guardadas en recipientes especiales para ensayarlas después de un tiempo determinado como sucedió con otras muestras.

MUESTRA	E.3.2.
Especie	Argiope Argentata
Equipo	AFM Nanosurf easyScan 2
Viga (tipo)	CTRN
Angulo de contacto (α)	50°
Temperatura	22°C
HR	81%

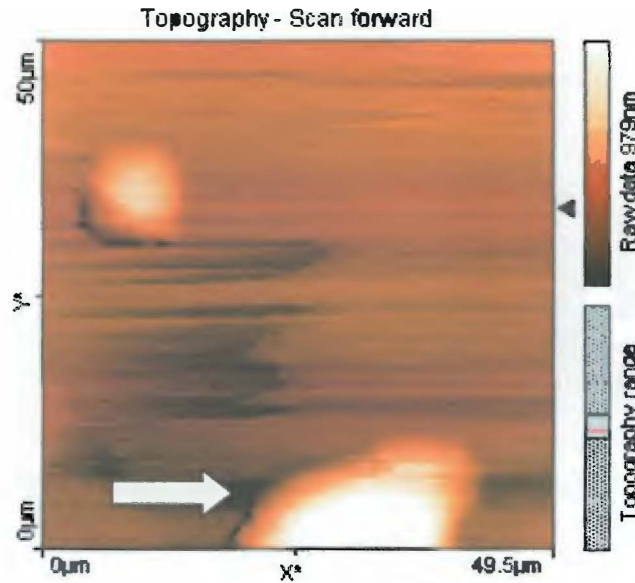


Figura 3.14.- Muestra E-3.2.

Fuente: Imagen obtenida del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

Muestra E.3.3.

La siguiente muestra es una referente de los ensayos realizados durante el desarrollo de esta Tesis, podemos ver la fibra de un color blanco en la parte inferior del cuadro. Cuando el escaneo se produce desde abajo hacia arriba se logra barrer la gota del adhesivo (señalado con flechas blancas), esto podemos verificarlo si nos acercamos por el lente del cabezal del AFM y observamos a la punta del cantiléver en contacto directo con la gota que arrastra según su avance, esta acción es verificada mediante la figura del escaneado por la distorsión que sufre la imagen.

MUESTRA	E.3.3.
Especie	Argiope Argentata
Equipo	AFM Nanosurf easyScan 2
Viga (tipo)	CTRN
Angulo de contacto (α)	50°
Temperatura	22°C
HR	81%

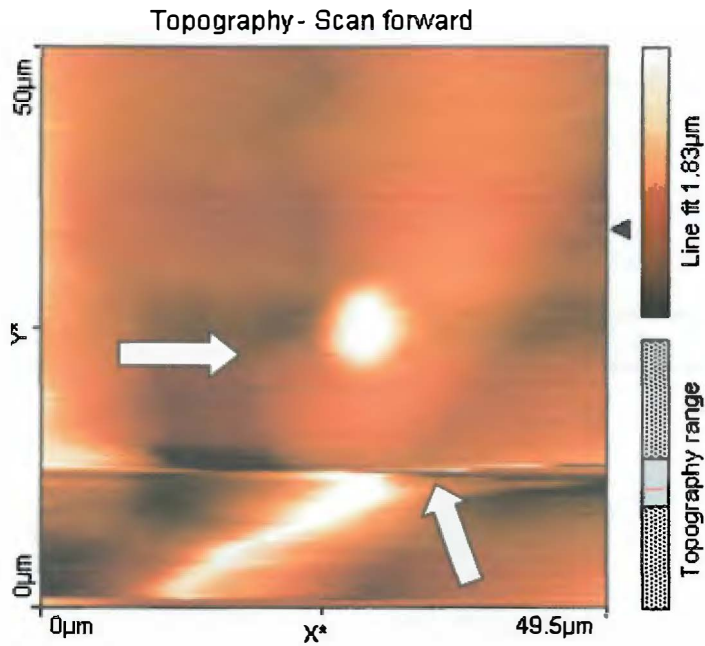


Figura 3.15.- Muestra E-3.3.

Fuente: Imagen obtenida del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

Muestra E.3.4.

La muestra E.3.4 tiene una particularidad, fue extraída de la telaraña de un ejemplar y guardada en un recipiente, aislado de la suciedad del ambiente, y ensayada tres días después de haber sido separada de su red. Al observar esta muestra (Figura 3.16) podemos confirmar la literatura de nuestro segundo capítulo respecto a la humedad en el adhesivo: a medida que las gotas se encuentren en un ambiente más húmedo irán aumentando su volumen, por lo tanto, empezaran a juntarse unas con otras a lo largo de la seda axial, llegando a parecer incluso parte de ella.

Podemos ver en la Figura 3.16 que la fibra es más gruesa que en las muestras anteriores, este es el resultado de su exposición a la humedad. También observamos pequeños aglutinamientos a lo largo de la fibra, estas son las gotas de adhesivo que al ganar volumen a causa del ambiente, fueron creciendo y juntándose.

En esta muestra se distingue con mayor exactitud el inicio de la gota a partir de la seda (marcada con flechas blancas), entonces vamos a tener la seguridad de estar realizando el ensayo de nanoindentación sobre el adhesivo y por lo tanto obtener valores reales.

MUESTRA	E.3.4.
Especie	Argiope Argentata
Equipo	AFM Nanosurf easyScan 2
Viga (tipo)	CTRN
Angulo de contacto (α)	50°
Temperatura	22°C
HR	81%

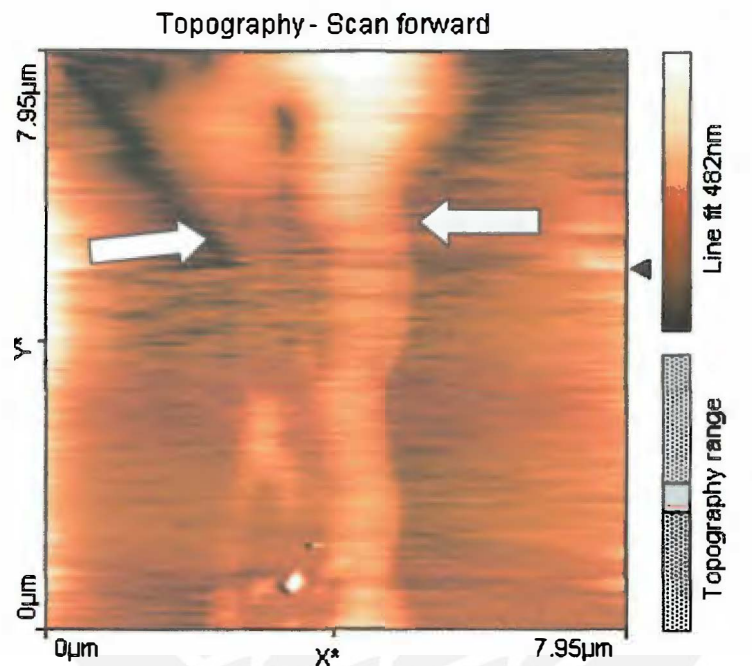


Figura 3.16.- Muestra E-3.4.

Fuente: Imagen obtenida del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

No se pretende tener una imagen clara de la gota del adhesivo debido al tipo de funcionamiento que tiene el AFM y al tipo de material ensayado, lo que debemos obtener y en lo que se basa nuestra tesis y resultados, son las curvas de indentación, de las cuales obtenemos datos de deflexión del cantiléver y fuerza de contacto con la muestra. Las curvas y sus datos son interpretadas para aplicarlas a las ecuaciones de la parte analítica y obtener los módulos de elasticidad.

Con el Microscopio de Fuerza Atómica es posible obtener el relieve de la muestra escaneada, así podremos determinar: i) Los rangos en el eje vertical (profundidad) para el ensayo de indentación, ii) La distancia que debemos bajar nuestro cantiléver para la aproximación y los límites que debemos considerar.

En la siguiente figura tenemos la muestra E.3.4, que es una imagen obtenida en 3D por el AFM, en la cual podemos ver el relieve exacto que tiene esta muestra

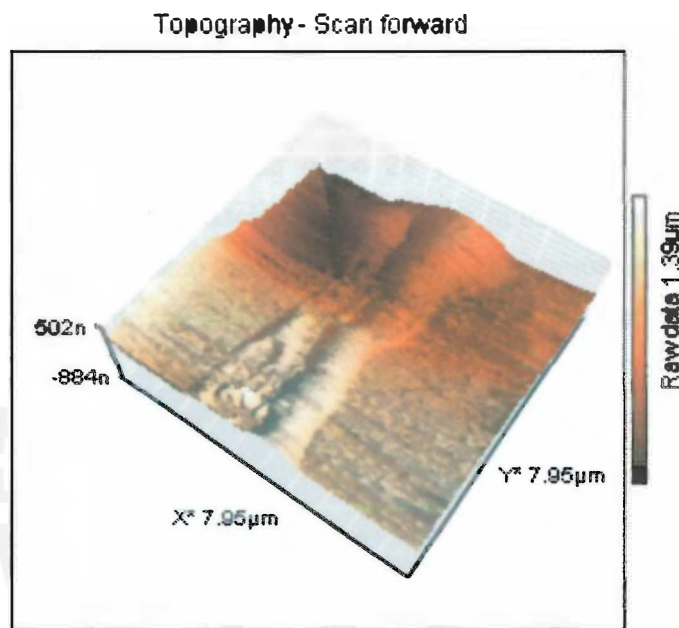


Figura 3.17.- Vista en 3D de la muestra E-3.4.

Fuente: Imagen obtenida del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

Nanoindentación sobre Muestras

Luego de haber realizado el escaneado topográfico de las muestras del adhesivo, lo siguiente es proceder con el ensayo de nanoindentación, para este ensayo usaremos el equipo AFM en modo de Espectroscopia. Los resultados de estos ensayos serán curvas que relacionan datos de flexión del cantiléver (punto inicial de la viga – punto final de la viga), y por ende la fuerza de contacto entre ambos cuerpos (punta de la viga – muestra) podrá ser estimada. Los datos de estas curvas son descargados en hojas de cálculo para proceder con su análisis.

Los ensayos de nanoindentación son desarrollados a lo largo de rectas que nosotros definimos según los límites que tenemos para el adhesivo, a lo largo de esta recta definida el equipo AFM puede realizar entre 24 y 256 indentaciones en un estimado determinado de tiempo. A continuación presentamos nuestras muestras con las líneas indicadas sobre las que se realizó la indentación (24 y 32 puntos según la muestra), cada muestra va acompañada de la gráfica que muestra la deflexión del cantiléver en su ensayo.

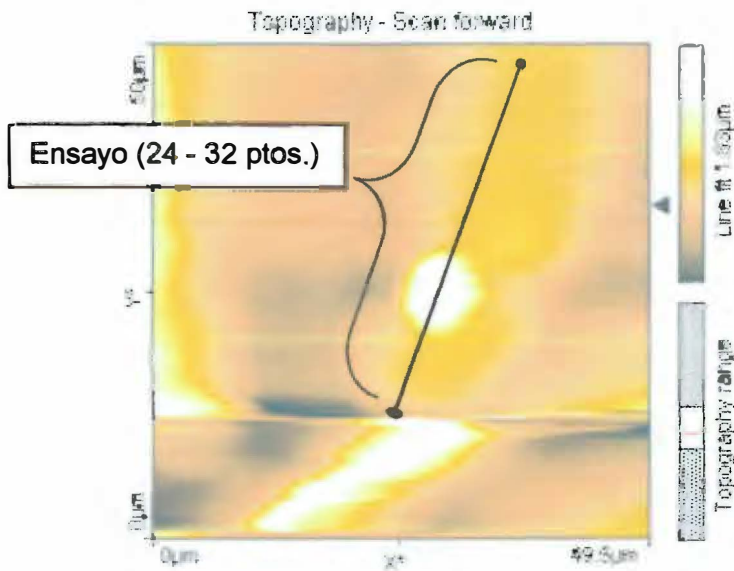


Figura 3.18.- Ensayo N°1 en la Muestra E.3.3

Fuente: Imagen obtenida del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

Ensayo N°1

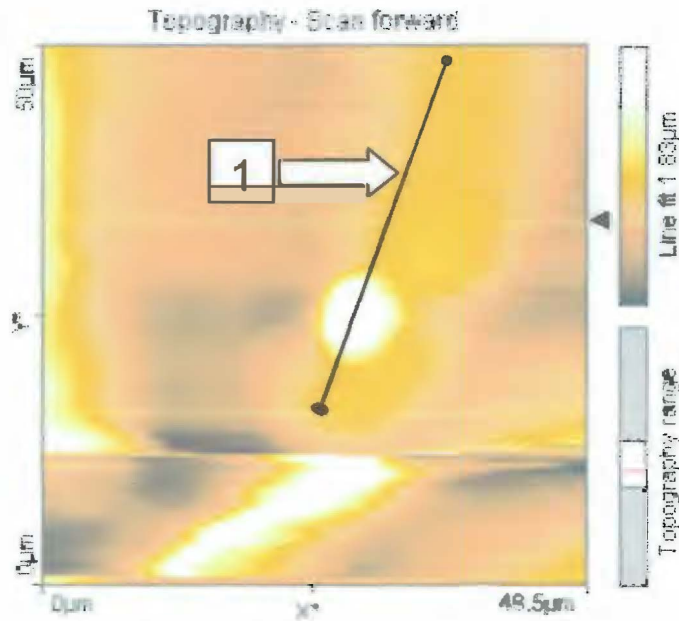


Figura 3.19.- Ensayo N°1 en la Muestra E.3.3

Fuente: Imagen obtenida del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

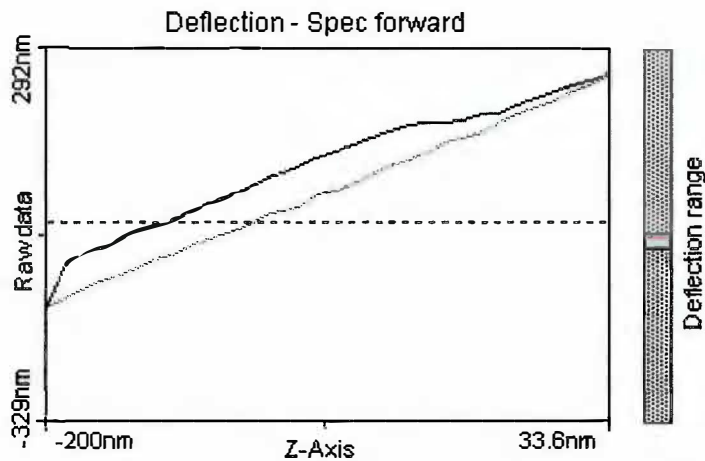


Grafico 3.1. Deflexión del cantiléver, Ensayo N°1 en la Muestra E.3.3.

Fuente: Gráfico obtenido del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Facultad de Ingeniería Mecánica.

Ensayo N°2

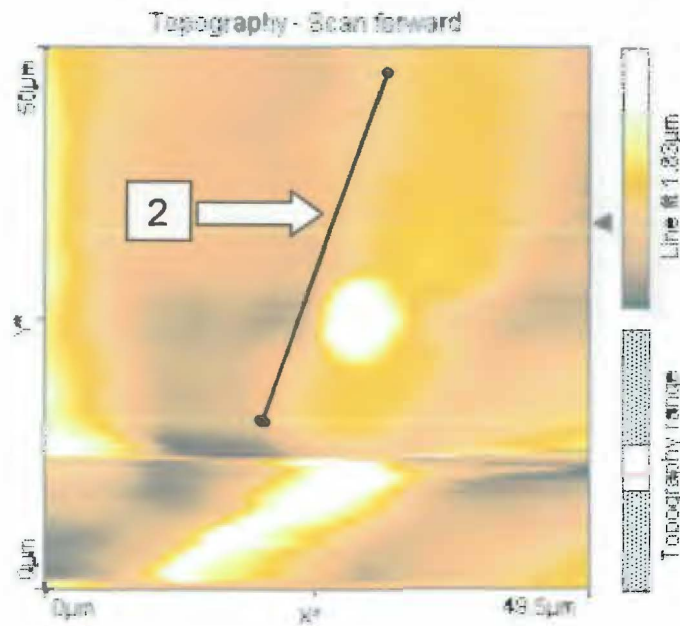


Figura 3.20.- Ensayo N°2 en la Muestra E.3.3

Fuente: Imagen obtenida del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

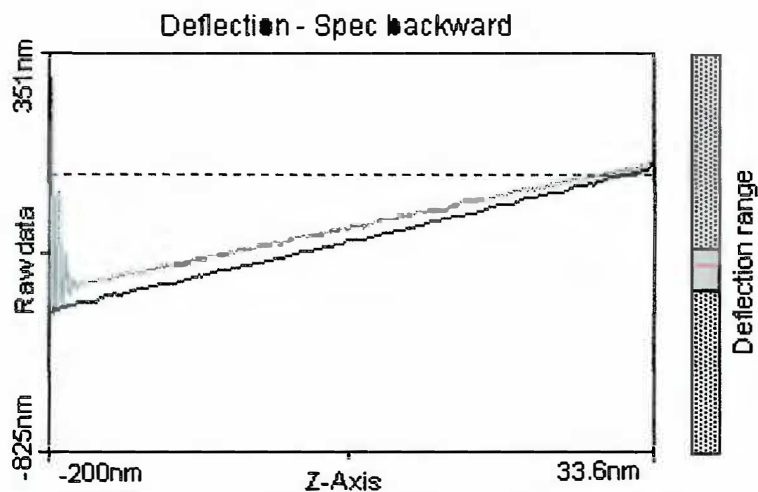


Grafico 3.2. Deflexión del cantiléver, Ensayo N°2 en la Muestra E.3.3.

Fuente: Gráfico obtenido del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Facultad de Ingeniería Mecánica.

Ensayo N°3

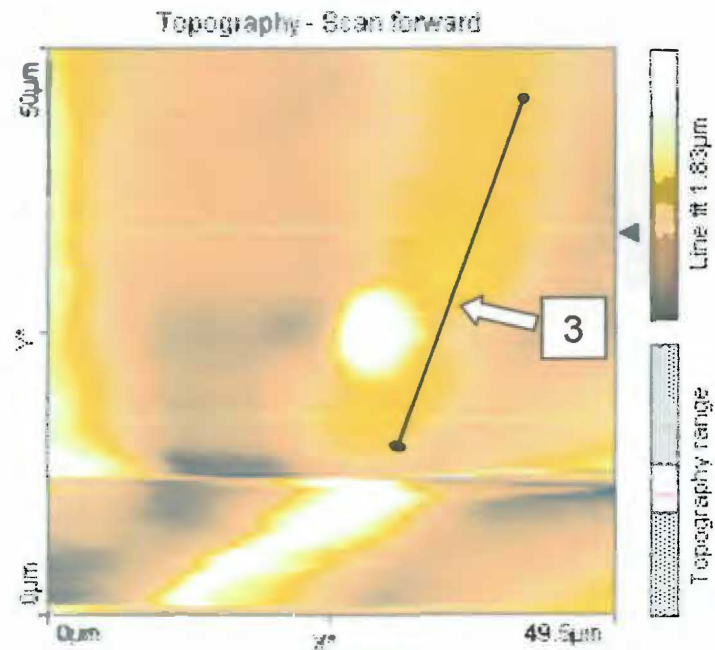


Figura 3.21.- Ensayo N°3 en la Muestra E.3.3

Fuente: Imagen obtenida del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

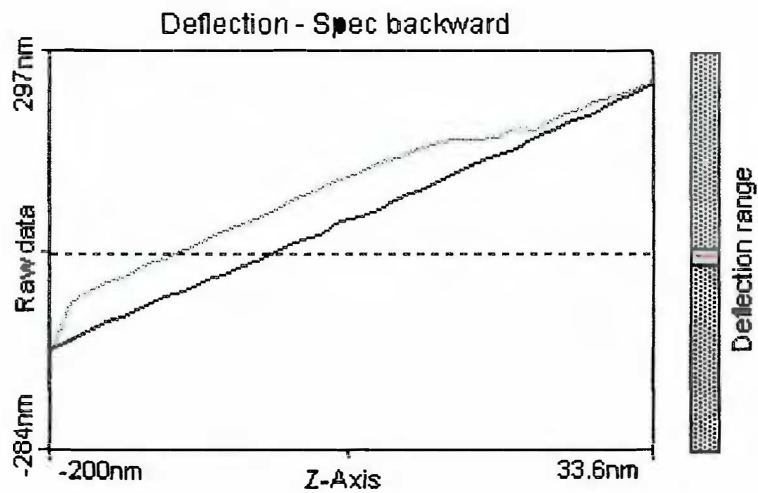


Grafico 3.3. Deflexión del cantiléver, Ensayo N°3 en la Muestra E.3.3.

Fuente: Gráfico obtenido del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Facultad de Ingeniería Mecánica.

Ensayo N°4

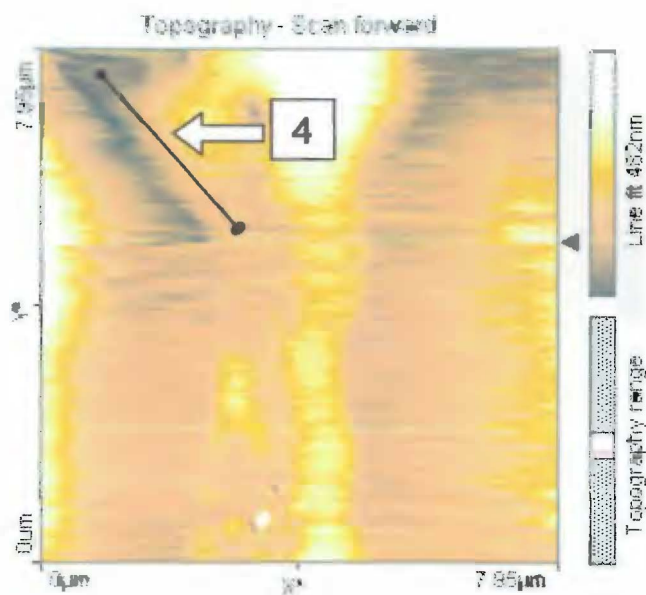


Figura 3.22.- Ensayo N°4 en la Muestra E.3.4

Fuente: Imagen obtenida del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

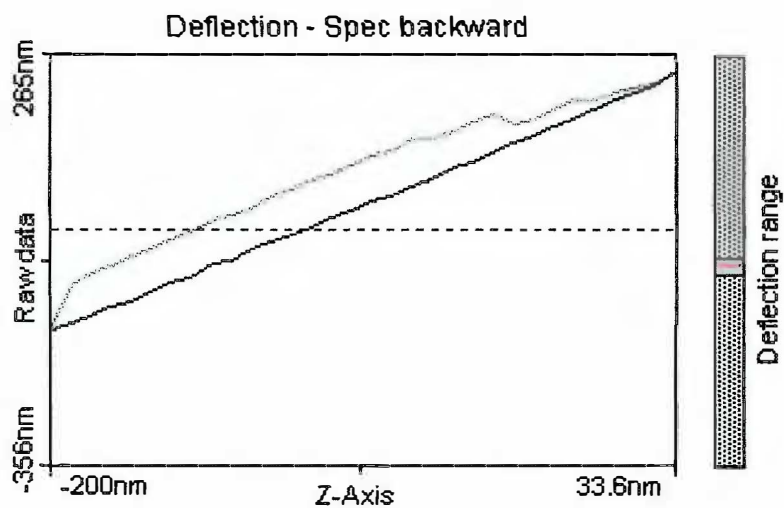


Grafico 3.4. Deflexión del cantiléver, Ensayo N°4 en la Muestra E.3.4.

Fuente: Gráfico obtenido del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Facultad de Ingeniería Mecánica.

Ensayo N°5

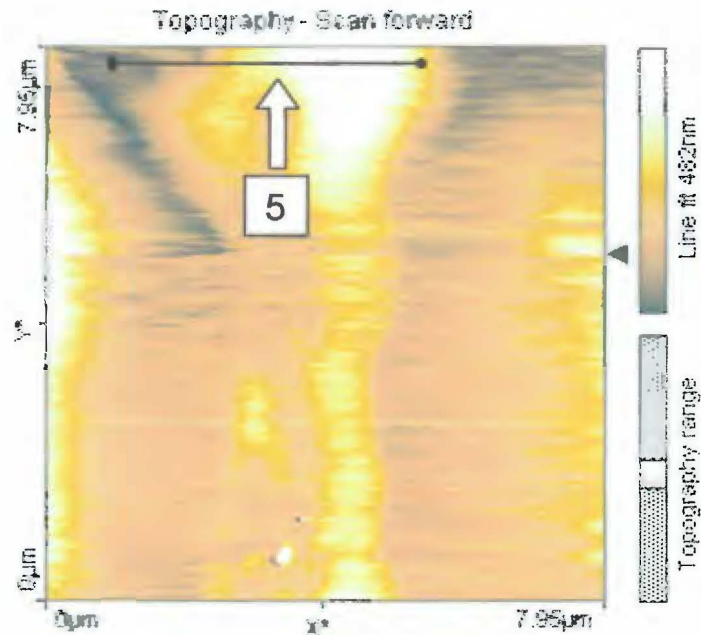


Figura 3.23.- Ensayo N°5 en la Muestra E.3.4

Fuente: Imagen obtenida del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

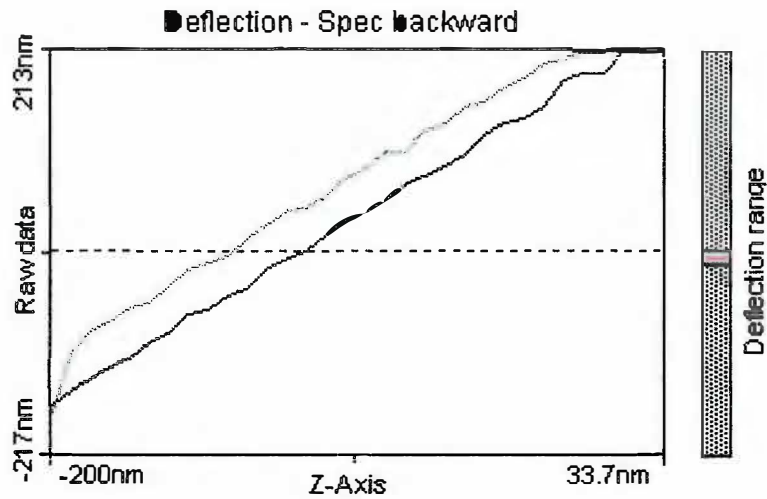


Grafico 3.5. Deflexión del cantiléver, Ensayo N°5 en la Muestra E.3.4.

Fuente: Gráfico obtenido del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Facultad de Ingeniería Mecánica.

Ensayo N°6

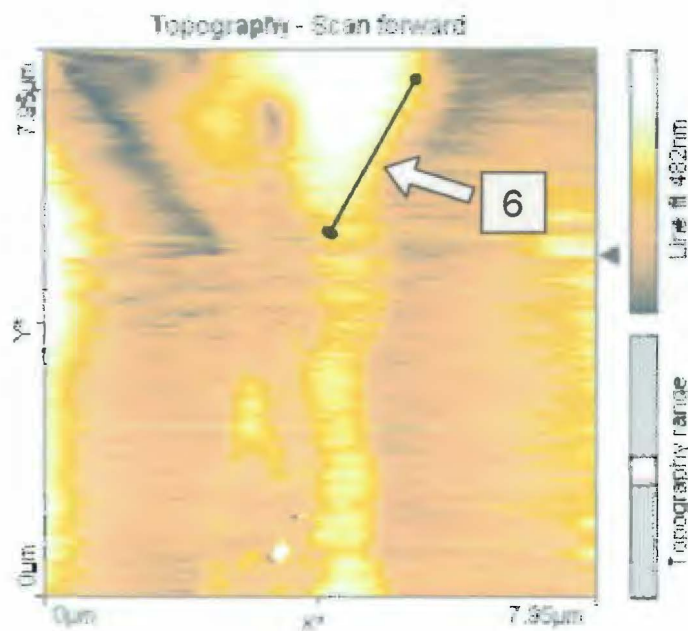


Figura 3.24.- Ensayo N°6 en la Muestra E.3.4

Fuente: Imagen obtenida del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

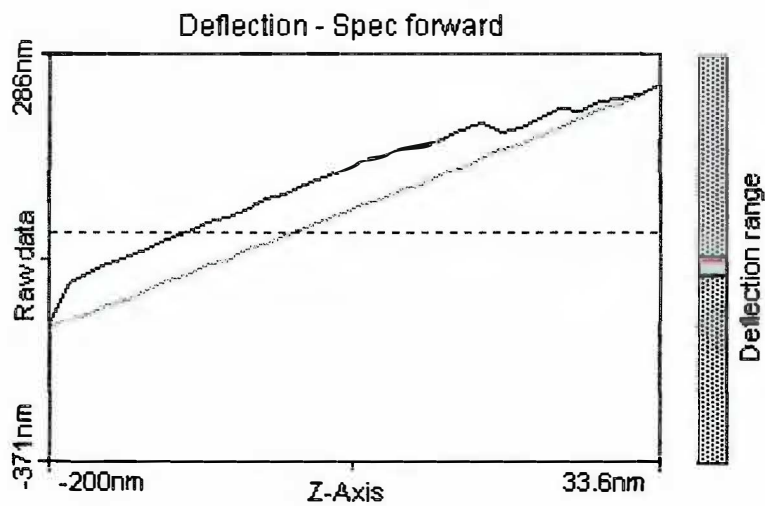


Grafico 3.6. Deflexión del cantiléver, Ensayo N°6 en la Muestra E.3.4.

Fuente: Gráfico obtenido del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Facultad de Ingeniería Mecánica.

Ensayo N°7

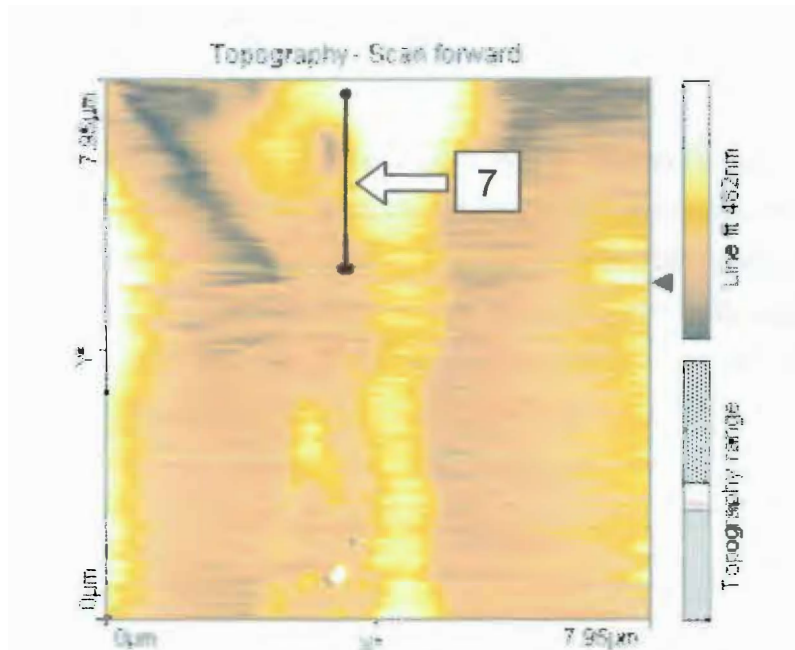


Figura 3.25.- Ensayo N°7 en la Muestra E.3.4

Fuente: Imagen obtenida del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

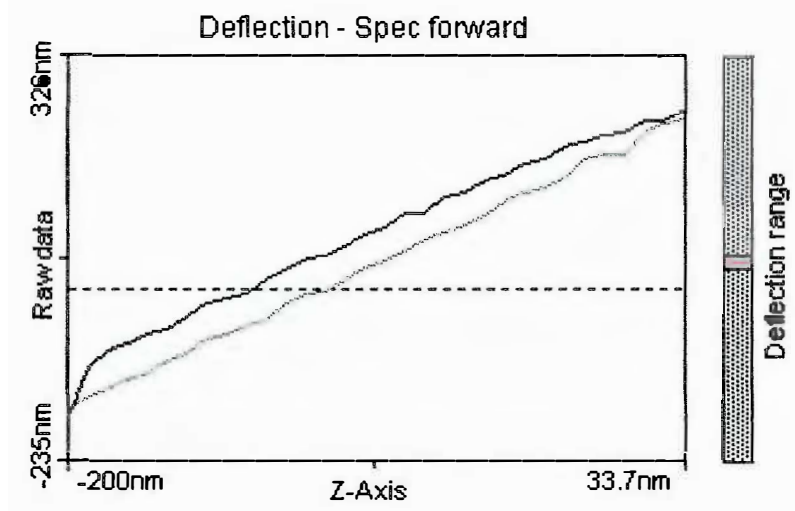


Grafico 3.7. Deflexión del cantiléver, Ensayo N°7 en la Muestra E.3.4.

Fuente: Gráfico obtenido del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Facultad de Ingeniería Mecánica.

Los datos de deflexión del cantiléver en los ensayos de nanoindentación podemos descargarlos en hojas de cálculo en formato .csv para analizarlos según el procedimiento y obtener el **Modulo de Elasticidad**.

En cada ensayo se realizó entre 24 y 32 indentaciones a lo largo de las rectas señaladas, para cada indentación tenemos los datos de deflexión del cantiléver, estos datos serán útiles para estimar el modulo de Young en cada punto de indentación siguiendo el modelo Hertziano. Los ensayos fueron realizados en las muestras donde se pudo distinguir los límites de la gota, por eso solo se realizó la nanoindentación en dos muestras de las cuatro ya escogidas, entonces tenemos la seguridad que los valores de las propiedades elásticas que estimaremos serán los del adhesivo estudiado. Seguiremos el procedimiento analítico para hallar el **Modulo de Elasticidad** en cada ensayo para las diferentes muestras.

3.13.- Procedimiento para el cálculo del Módulo de Elasticidad

Tomamos como ejemplo para el cálculo del módulo de Elasticidad el primer ensayo hecho en la muestra E.3.3, a lo largo de la línea indicada (Figura 3.19) se realizaron 32 indentaciones por lo cual obtendremos 32 módulos de elasticidad. La etiqueta para nuestro primer análisis es la siguiente:

MUESTRA	E.3.3.
Ensayo	1
Especie	Argiope Argentata
AFM	Nanosurf EasyScan 2 - Version 1.6.
Viga (tipo)	CTRN
K (cte Viga)	0.28 N/m
Angulo de contacto (α)	50°
Puntos p/recta	32
Temperatura	22°C
HR	81%

Etiqueta del Ensayo N°1, Muestra E.3.3.

La fuerza de contacto entre la punta del cantiléver y la muestra, está determinada por la expresión 3.1.

$$F = K \cdot d \dots\dots\dots (3.1)$$

Donde "K" es la constante elástica de la viga ($K = 0.28 \text{ N/m}$), entonces:

$$F = 0.28 * d$$

Del ensayo de indentación obtenemos la deflexión que tuvo el cantiléver durante la experiencia, es decir: la posición inicial y posición final.

$$z = d + \delta \dots\dots\dots (3.5)$$

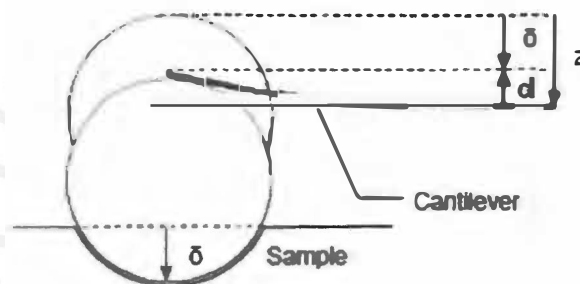


Figura 3.26.- Esquema de deflexión de la Viga en Voladizo.

Cada punto de indentación nos proporciona un conjunto de datos de deflexión, es decir, la indentación se puede realizar entre 32 y 256 veces en cada punto, de lo que obtendríamos la misma cantidad de deflexiones para una misma ubicación sobre la recta, este parámetro lo determinamos nosotros antes de empezar el ensayo.

En nuestro caso, hemos realizado 32 indentaciones para cada punto sobre la recta de cada ensayo, teniendo la misma cantidad de datos de deflexión; obtenemos entonces 32 datos de fuerza de contacto para un mismo punto. Para poder comparar por semejanza los datos obtenidos de cada indentación (Ecuación 3.12), graficamos los datos 32 datos de deflexión en función de los valores para fuerza de contacto, aproximamos nuestro gráfico a una ecuación de segundo orden y comparamos los coeficientes "A", luego vamos al modelo de Hertz y podremos hallar el modulo de elasticidad para este punto sobre la recta.

Entonces graficamos la curva F vs d (Grafico 3.8), nos muestra la relación entre las deflexiones tomadas como referencia, en función de la fuerza de contacto que calculamos para cada deflexión, todos esto para un solo punto de indentación sobre la recta mostrada en el Ensayo N°1 de la muestra E.3.3.

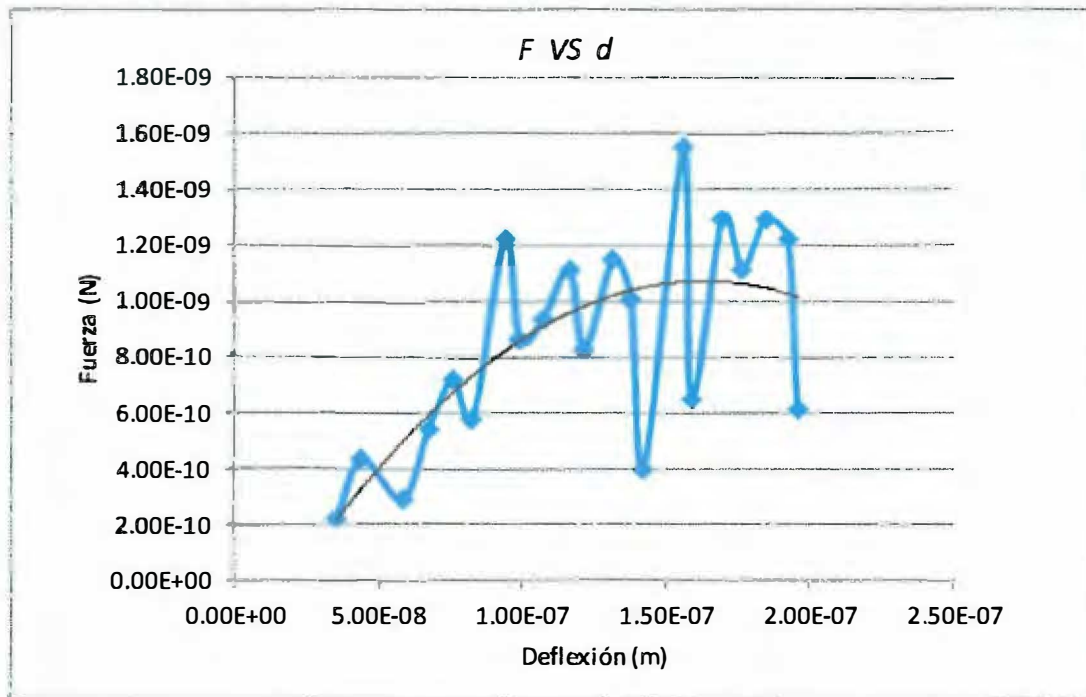


Grafico 3.8.- F vs d

De la curva logramos la siguiente ecuación:

$$y = -52735 x^2 + 0,0172 x - 3E - 10$$

Para analizar por semejanza debemos comparar la función alcanzada de la curva, con la expresión 3.12 del procedimiento analítico:

$$F = A \delta^2 + B \dots \dots \dots (3.12)$$

El valor de "A" es estimado por semejanza:

$$A = - 52735.28$$

Luego reemplazamos el valor de "A" en la ecuación 3.13 deducida del modelo de Hertz:

$$A = \frac{\pi E_{muestra}}{2(1-\nu^2)} \tan(\alpha) \dots\dots\dots(3.13)$$

Dónde:

- $\nu=0.5$: Relación de Poisson para un material incompresible.
- $\alpha=50^\circ$: Ángulo de abertura de contacto con el cono

Calculamos la ecuación y obtenemos el valor del módulo de elasticidad para este primer punto de indentación sobre la recta del Ensayo N°1 en la muestra E.3.3:

$$E = 21\,127,79 \text{ Pa}$$

Realizamos el mismo ejercicio para hallar el módulo de elasticidad de los 32 puntos de indentación en el Ensayo N°1 de la muestra E.3.3. A continuación mostramos los resultados obtenidos en una tabla con los valores de "A", y el modulo de Young en Pascales y en Kilo Pascales:

Punto	"A"	E (Pa)	E (KPa)
1	52735	21127.79	21.1
2	206587	82767.16	82.8
3	174658	69975.1	70
4	102014	40870.96	40.9
5	83331	33385.79	33.4
6	79199	31730.34	31.7
7	66282	26555.27	26.6
8	62481	25032.43	25
9	124598	49919.03	49.9
10	187419	75087.67	75.1
11	99779	39975.53	40
12	103123	41315.27	41.3
13	233452	93530.37	93.5
14	130973	52473.11	52.5
15	124981	50072.47	50.1
16	119335	47810.46	47.8

Punto	"A"	E (Pa)	E (KPa)
17	117960	47259.57	47.3
18	98215	39348.92	39.3
19	115139	46129.37	46.1
20	50260	20136.2	20.1
21	213682	85609.7	85.6
22	144867	58039.61	58
23	222627	89193.43	89.2
24	107334	43002.37	43
25	164382	65858.12	65.9
26	64941	26018.01	26
27	200963	80513.95	80.5
28	225471	90332.85	90.3
29	189178	75792.4	75.8
30	212608	85179.41	85.2
31	120410	48241.14	48.2
32	54432	21807.67	21.8

Tabla 3.1.- Módulos de Elasticidad, Ensayo N°1, Muestra E.3.3.

En el Anexo N°1 mostramos las 32 gráficas de la curva Fuerza de Contacto vs Deflexión para el Ensayo N°1 de la muestra E.3.3, cada curva involucra el resultado de los datos tomados en un punto de indentación sobre la recta señalada en el primer ensayo. Estas 32 curvas fueron tomadas en cuenta para hallar los resultados mostrados en la Tabla 3.1.

CAPITULO 4.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1.- Resultados

Los siete ensayos de nanoindentación realizados en las gotas del adhesivo de la seda de araña con AFM fueron en condiciones normales: una temperatura ambiente de 22°C y humedad relativa de 81%, mediante estos ensayos hemos determinado el módulo de elasticidad del adhesivo, que se compara con los módulos de otros tipos de bioadhesivos provenientes de otras especies de la naturaleza.

De la misma forma como realizamos el procedimiento para el ejemplo de cálculo del módulo de elasticidad en el Ensayo N°1 de la muestra E.3.3, procedemos a calcular los módulos de elasticidad en los seis ensayos faltantes, luego procederemos a analizar los resultados y realizar un recuento de las propiedades elásticas de las muestras.

Resultados de Ensayos de Nanoindentación sobre muestras

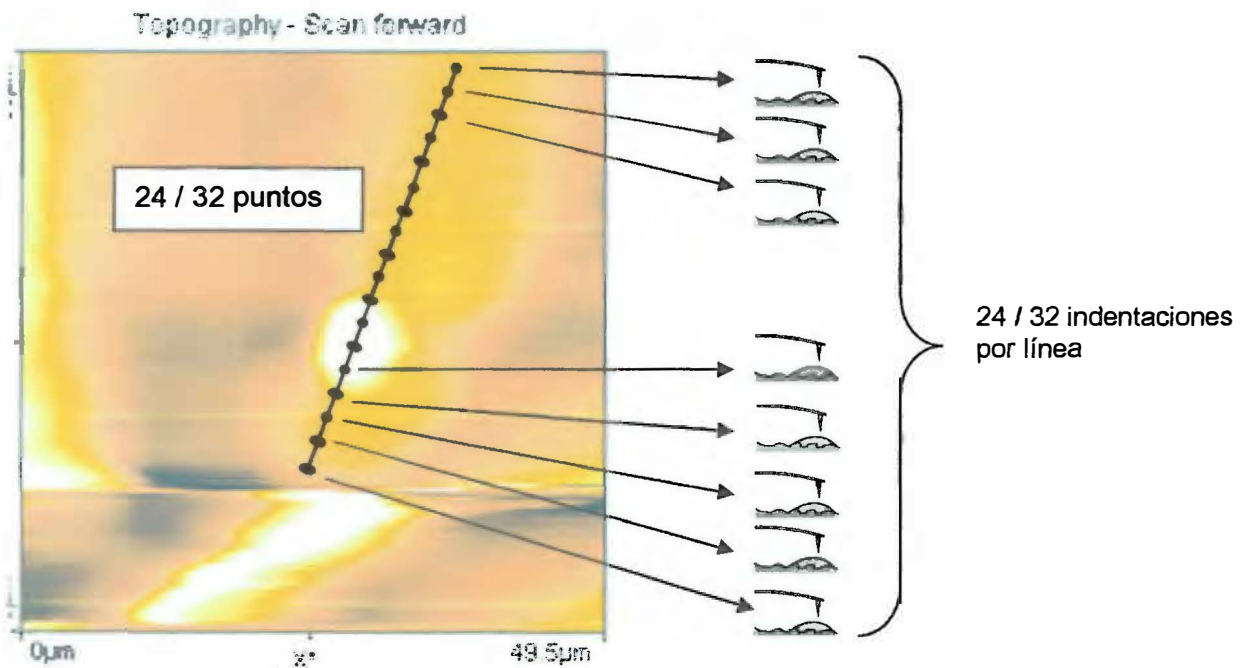


Figura 4.1.- Esquema para Indentaciones por Ensayo

Muestra E.3.3.

Los Resultados de los Ensayos N° 1, 2 y 3 realizados sobre la muestra E.3.3, se encuentran en los Anexos 2, 3 y 4 respectivamente:

Muestra	E.3.3
Especie	Argiope Argentata
AFM	Nanosurf easyScan 2 Version 1.6.
Viga (tipo)	CTRN
K (cte Viga)	0.28 N/m
Angulo de contacto (α)	50°
Puntos de indentación	32 (Ensayo N°1), 24 (Ensayo N°2)
Temperatura	22°C
HR	81%

Tabla 4.1. Etiqueta para Ensayos en Muestra E.3.3.

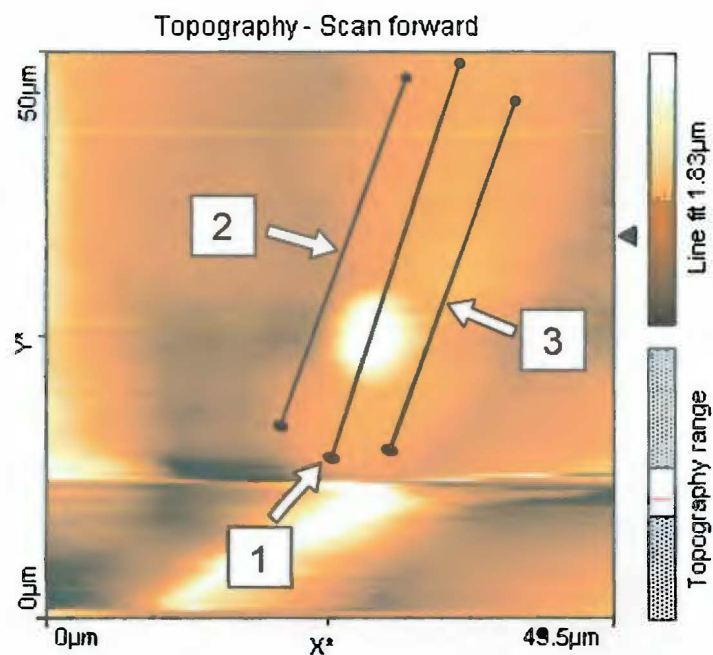


Figura 4.2.- Ensayos 1, 2 y 3, Muestra E.3.3

Fuente: Imagen obtenida del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

Muestra E.3.4.

Los Resultados de los Ensayos N° 4, 5, 6 y 7 realizados sobre la muestra E.3.4, se encuentran en los Anexos 5, 6, 7 y 8 respectivamente:

Muestra	E.3.4
Especie	Argiope Argentata
AFM	Nanosurf easyScan 2 Version 1.6.
Viga (tipo)	CTRN
K (cte Viga)	0.28 N/m
Angulo de contacto (α)	50°
Puntos de indentación	32
Temperatura	22°C
HR	81%

Tabla 4.2. Etiqueta para Ensayos en Muestra E.3.4.

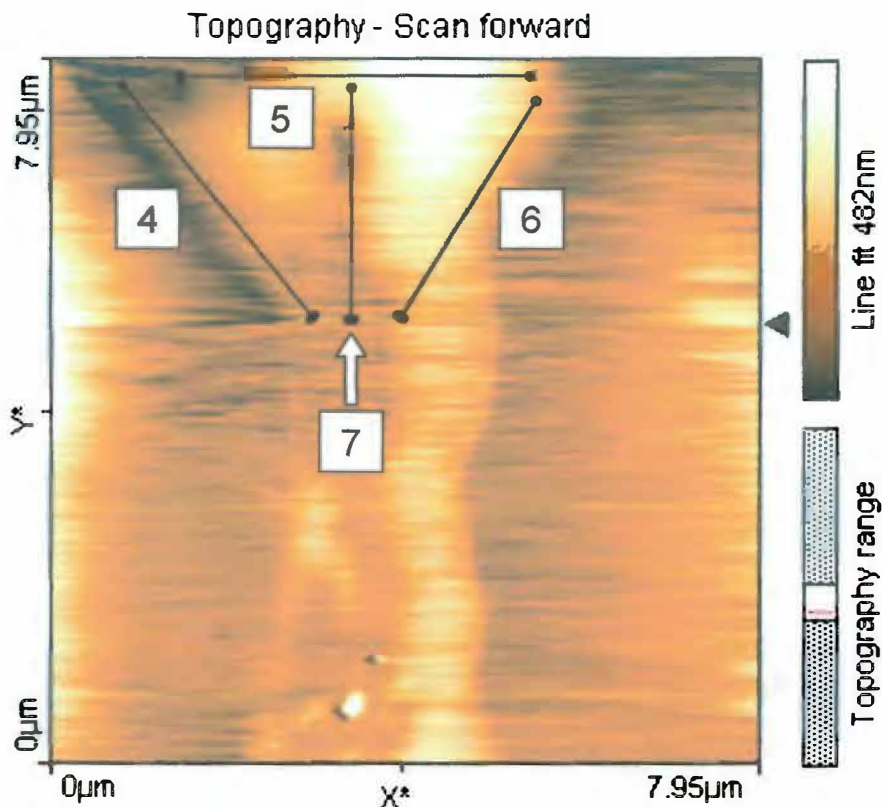


Figura 4.3.- Ensayos 4, 5, 6 y 7, Muestra E.3.4

Fuente: Imagen obtenida del equipo AFM Nanosurf 2 EasyScan, Laboratorio de Polimeros y Bionanomateriales de la Sección de Ingeniería Mecánica.

4.2.- Resumen de Resultados

Mostramos un resumen y una frecuencia de los resultados calculados en los siete ensayos de nanoindentación sobre las muestra del adhesivo, obteniendo los valores dentro de un rango con una desviación estándar de 37.21 Kpa.

Rango de "E" (KPa)	# Valores
0-20	15
20-40	37
40-60	49
60-80	51
80-100	32
100-120	8
120-140	7
140-160	7
160>	2
TOTAL	208

Tabla 4.3. Resumen de Resultados de los Ensayos de Nanoindentación

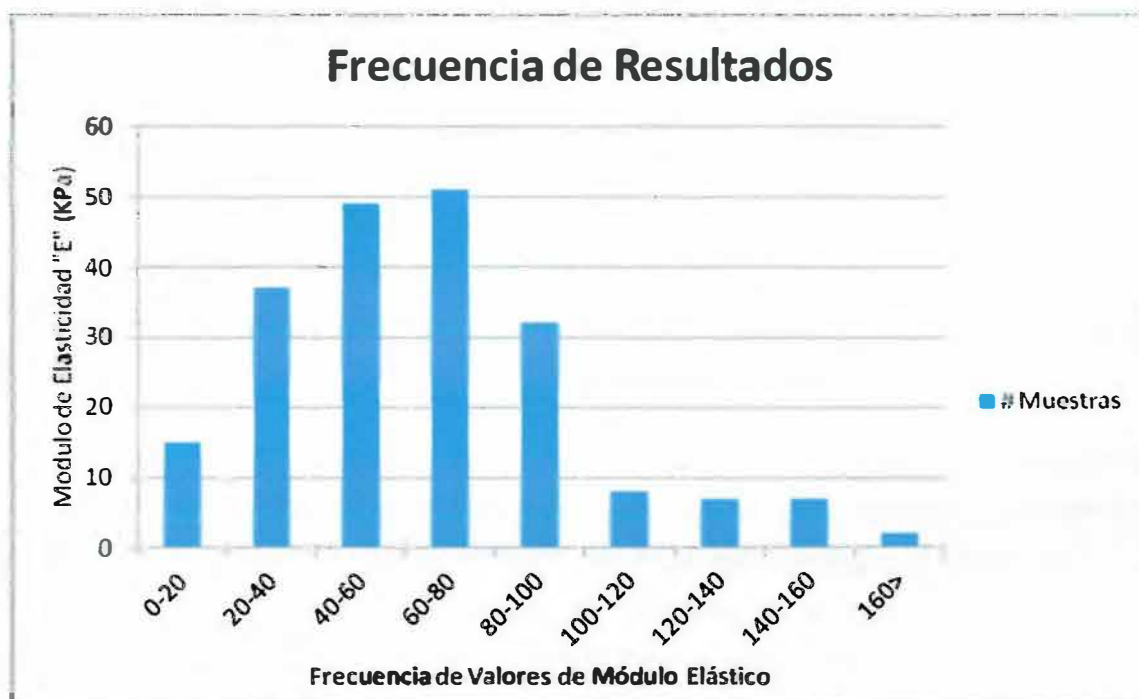


Gráfico 4.1. Frecuencia de Resultados de Ensayos de Nanoindentación

4.3.- Discusiones

El módulo elástico proporciona una medida cuantitativa de la rigidez del material, el cual es un parámetro importante para la adhesión, como nuestros resultados lo demuestran la mayoría de nuestras mediciones se encuentra en el rango de 20 a 100 KPa, entonces podemos considerar a las gotas del adhesivo de la seda de esta especie de araña, como un material biológico blando, lo que equivale a las medusas jalea o anémona de mar mesogloea ($E = 10$ KPa), aunque no es tan blando como el tejido adiposo ($E = 3$ KPa), pero sus valores son mucho menores que para la aorta ($E = 500$ KPa), un cartilago ($E = 20$ MPa) o para el caucho de silicona ($E = 1$ MPa); como estudios lo indican para la buena adhesión entre dos superficies, una de ambas debe ser blanda de lo contrario no tendrían una buena adherencia.

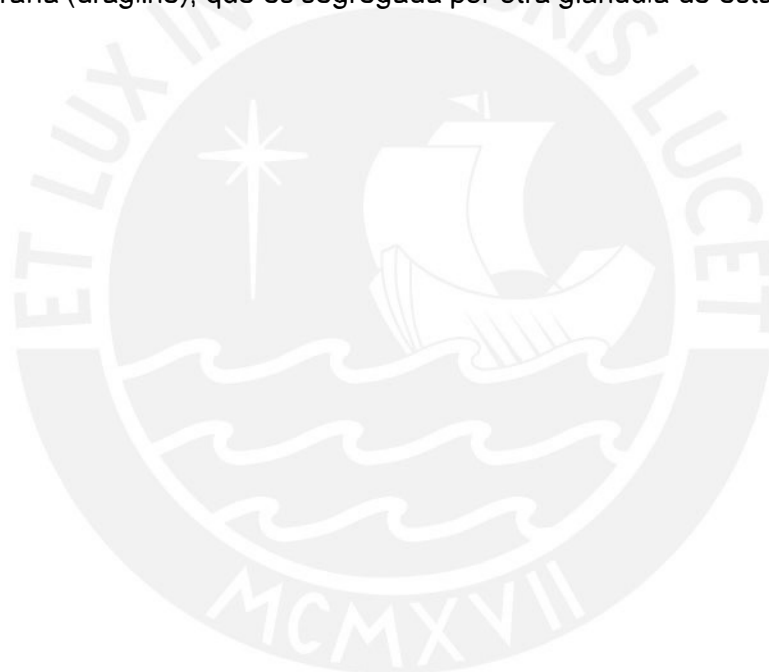
Los módulos elásticos de las almohadillas adhesivas en insectos como los grillos o saltamontes de cuernos largos son comparables con los obtenidos para las gotas del adhesivo de la seda de araña (25-100 KPa), mientras que los módulos de insectos como las langostas (saltamontes cuerno corto) son mucho mayores (250-750 KPa) [14].

Los valores estimados del módulo de elasticidad están en el rango de 20-110 KPa, y se encuentran de acuerdo con el criterio de Dahlquist, que afirma que los buenos adhesivos deben tener un módulo de elasticidad menor que 100 kPa [30,31], la desviación estándar relativamente alta podría ser debido a la variación intrínseca de las propiedades mecánicas de los materiales biológicos, como lo informó Ashby [32] de las propiedades mecánicas de una variedad de materiales naturales tales como la madera, músculos, huesos, etc. Ellos concluyeron que los materiales biológicos muestran una gran variabilidad en sus propiedades mecánicas y alega que el valor de una propiedad específica varía según el organismo.

Los factores experimentales de las pruebas de nanoindentación con el AFM también pueden ser otra fuente de error. Tan y Lim [33] han revisado algunos de los temas en relación a las pruebas de nanoindentación con AFM, estos incluyen el efecto del sustrato subyacente, rugosidad de la superficie, la curvatura de la superficie y la carga no perpendicular. Algunos autores, entre ellos Clifford y Seah [34] sugieren que los errores experimentales observados en las pruebas de indentación con AFM dependen en gran medida de la incertidumbre en la determinación de ciertas constantes, tales como la rigidez en voladizo del AFM, o la constante del resorte y del radio de la punta.

Creemos que la variación que encontramos entre nuestros datos podría ser más debido a la variación intrínseca de las propiedades adhesivas en lugar a errores experimentales, serían necesarios más estudios para confirmarlo. Los datos obtenidos para el módulo de elasticidad de las gotas de adhesivo de la seda de la araña que se dan en esta tesis [35], es la primera estimación reportada en la literatura de las propiedades elásticas para este tipo de adhesivos. En lo que refiere a la revisión de la literatura de otros autores, no hay información sobre el módulo de Young para este adhesivo de otras especies de arañas

Estos resultados contribuirán con futuros estudios que se realicen en este campo de la ciencia de los materiales, incluso existen investigaciones realizadas por profesores de la facultad donde se estudian otras propiedades mecánicas, como la resistencia y rigidez de la seda de la araña (dragline), que es segregada por otra glándula de esta especie.



CONCLUSIONES

- Se determinó el módulo de Elasticidad en las gotas del adhesivo de la seda de la araña *Argiope Argentata*, con el uso de un Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) mediante la técnica de Nanoindentación. Se obtuvo un rango de resultados para el modulo elástico que pueden definir a nuestro material como un material blando, indispensable para la adhesión.
- Las gotas del adhesivo se encuentran ubicadas uniformemente a lo largo de la fibra y en cantidades similares. Al observar esta forma podemos pensar en futuros proyectos con este adhesivo: Realizar ensayos para determinar la fuerza de desprendimiento de una cierta longitud de hilo cuando este se adhiere a un sustrato por medio de varias gotitas, de esta forma los resultados podrán ser comparados con las fuerzas de contacto obtenidas en el desarrollo de esta tesis.
- Siguiendo el criterio de Dahlquist para adhesivos sensibles a la presión, encontramos que el Módulo de Elasticidad de este adhesivo se encuentra en el rango menor a los 100 KPa por lo que sería considerado un buen adhesivo de origen biológico, servirá para futuros estudios y su posible futura producción industrial.
- Se pudo comparar, de manera factible, los resultados obtenidos del módulo elástico del adhesivo de la seda, con otros adhesivos de origen natural encontrados en insectos, obteniendo valores que reflejan la gran funcionalidad que tienen estas gotas en su ambiente.
- Al no encontrar bibliografía sobre estudios anteriores, donde afirmen el módulo elástico de las gotas del adhesivo de esta especie de araña, podemos considerar que el módulo de elasticidad para la especie *Argiope Argentata* se encuentra entre los 20 y los 100 KPa, dándole la atribución de buen adhesivo (según el criterio de Dahlquist) para diferentes fines.
- Como se estudió en el segundo capítulo, se observó que las gotas sobre la seda de araña al estar mucho tiempo en contacto con el ambiente, a una humedad y temperatura cotidianas, empiezan a perder su forma y se juntan entre sí, formando una fibra más gruesa, lo que demuestra su adherencia al hilo, que morfológicamente debería ser más adhesivo.

RECOMENDACIONES

- El uso de un microposicionador es esencial para realizar estos ensayos debido a la escala de nuestras muestras, este objeto es muy útil para posicionar de manera adecuada la punta de la viga sobre la gota, de lo contrario se haría de manera manual lo que no es recomendable por la precisión necesaria.
- El cantiléver es un instrumento muy pequeño y a su vez muy sensible, es recomendable manipular el equipo con mucho cuidado, ya que al menor contacto con el sustrato, la punta podría romperse. Entonces es preferible aislar el mueble que va a sostener al AFM mientras se realizan los ensayos, cualquier movimiento va a alterar los resultados obtenidos.
- Las muestras extraídas de las telarañas para los ensayos, no deben ser conservadas más de una semana sobre el sustrato, pues lo que conseguiremos es que se unan entre si y adhieran al hilo, esto no es recomendable para nuestro estudio debido a que nuestro objetivo es hallar el módulo de Elasticidad solo del adhesivo sin la fibra, además poco a poco van perdiendo su forma circular inicial por expandirse en el sustrato y a lo largo de la seda.
- Si vamos a conservar la muestra para no más de tres días, es necesario evitar cualquier tipo de suciedad y polvo sobre la muestra, pues en el momento de realizar el ensayo vamos a escanear esa partícula de polvo o suciedad, lo que podría confundirnos en el momento de la espectroscopia y distorsionar nuestros resultados.
- Al realizar los primeros ensayos tenemos cierta dificultad, porque tenemos que posicionar con mucha exactitud el cantiléver encima o muy próximo a la gota del adhesivo. Para poder realizar un buen primer escaneo debemos estar al tanto de los visores que tiene el cabezal, que nos darán una visión frontal y lateral de lo que sucede en nuestro ensayo.
- La fibra de la seda junto a la gota de adhesivo son transparentes, para tener una mejor visibilidad del lugar donde realizamos el ensayo, es recomendable pintar el sustrato de un color oscuro por la parte trasera, así identificaremos con más facilidad la muestra en el momento de la aproximación.

BIBLIOGRAFIA

1. P.Y. Chena, A.Y.M. Lina, Y.S. Linb, Y. Sekia, A.G. Stokesb, J. Peyrasa, E.A. Levskyc, M.A. Meyersa, J. McKittricka. Structure and mechanical properties of selected biological materials. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Volume 1, Pages 208-226, July 2008.
2. Baohua Ji, Huajian Gao, Max Planck. Mechanical properties of nanostructure of biological materials. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, Volume 52, Pages 1963-1990, September 2004.
3. M. A. Meyers, Po-Yu Chen, Albert Yu-Min Lin, Yasuaki Seki. *Materials. Biological materials: Structure and mechanical properties. Progress in Materials Science*, Volume 53, Pages 1-206, January 2008.
4. Vincent Julian F. V. *Structural biomaterials. Volume 1*, Princeton University. Princeton, Pages 108, 2004.
5. Rober E. Maier. Surface Behaviour of biomaterials, *Journal of Materials Science*. Volume 17, Pages 1057-1062, November 2006.
6. Cyprien Gay. Stickiness - Some Fundamentals of Adhesion. *Integrative and Comparative Biology*, Volume 42, Pages 1123-1126, 2002.
7. N.G. Van Kampen, B.R.A. Nijboer, K. Schram. On the macroscopic theory of Van der Waals forces. *Physics Letters A*, Volume 26, Pages 307–308, February 1968.
8. T.F Tedder, D.A. Steeber, A. Chen, P. Engel. The selectins: vascular adhesion molecules. *The FASEB Journal*, Volume 9, Pages 866-873, July 1995.
9. C. Creton, P. Fabre. *Adhesion science and Engineering. Volume 1*, 2002.
10. G. Gierenz , W. Karmann, Weinheim. *Adhesives and adhesive tapes. Volume 1*, 2001.
11. H.G. Silverman, F.F. Roberto. Understanding Marine Mussel Adhesion. *Marine Biotechnology*, Volume 9, Pages 661-681, November 2007.
12. D. Bodenmiller, E. Toh, Y.V. Brun. Development of Surface Adhesion in *Caulobacter crescentus*. *Journal Bacteriol*, Volume 186, Pages. 1438-1447, March 2004.
13. E. Evansa. Physical actions in biological adhesion. *Handbook of Biological Physics*, Volume 1, Pages 723–754, 1995.

14. B. N. J. Persson. On the mechanism of adhesion in biological systems. *Journal of Chemical physics*, Volumen 118, Num 16, January 2003.
15. G. Walker. Adhesion to smooth surfaces by insects. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, Volume 13, Pages 3-7, January 1993.
16. B.N.J. Persson. Biological adhesion for locomotion: basic principles. *Journal of Adhesion Science and Technology*, Volume 21, Pages 1145-1173, August 2007.
17. W.J.P. Barnes, Pérez-Goodwyn P., Gorb S.N. The mechanical properties of the toe pads of the *Litoria caerulea*. *Journal Experimental Biology*, Volume 212, Pages 155-162, January 2009.
18. Walter Federle, M. Riehle, Adam S.G., G. Curtis, Robert J. Full. An Integrative Study of Insect Adhesion: Mechanics and Wet Adhesion of Pretarsal Pads in Ants. *Integrative Comparative Biology*, Volume 42, Pages 1100-1106, 2002.
19. Kenneth V. Yeagan. Biology of Bolas Spiders. *Annual Review of Entomology*, Volume 39, Pages 81-99, January 1994.
20. Todd A. Blackledge, Adam P. Summers, Cheryl Y. Hayashi. Gumfooted lines in black widow cobwebs and the mechanical properties of spider capture silk. *Zoology*, Volume 108, Pages 41–46, March 2005.
21. Brent D. Opell, Jason E. Bond. Changes in the mechanical properties of capture threads and the evolution of modern orb-weaving spiders. *Evolutionary Ecology Research*, Volume 3, Pages 567–581, 2001.
22. Brent D. Opell, Mary L. Hendricks. The adhesive delivery system of viscous capture threads spun by orb-weaving spiders. *Journal Experimental Biology*, Volume 212, Pages 3026-3034, September 2009.
23. Todd A. Blackledgea, Nikolaj Scharff, Jonathan A. Coddington, Tamas Szűcs, John W. Wenzel, Cheryl Y. Hayashi, Ingi Agnarssona. Reconstructing web evolution and spider diversification in the molecular era. *PNAS*, Volume 106, Pages 5229-5234, March 2009.
24. Opell B.D., Hendricks M.L. The role of granules within viscous capture threads of orb-weaving spiders. *Journal Experimental Biology*, Volume 213, Pages 339–346, 2010.

25. Vasav Sahni, Todd A. Blackledge, and Ali Dhinojwala. A Review on Spider Silk Adhesion. *The Journal of Adhesion*, Volume 87, Pages 595-614, 2011.
26. Vasav Sahni, Todd A., Blackledge & Ali Dhinojwala. Viscoelastic solids explain spider web stickiness. *Nature Communications*, Volume, Article 19, May 2010.
27. Vollrath, F., and Edmonds, D. T. Modulation of the mechanical properties of spider silk by coating with water. *Nature Communications*, Volume 340, Pages 305–307, 1989.
28. Vasav Sahni, Todd A. Blackledge & Ali Dhinojwala. Changes in the Adhesive Properties of Spider Aggregate Glue During the Evolution of Cobwebs. *Scientific Reports*, Article 41, July 2011.
29. Cyprien Gay, Ludwik Leibler. On Stickiness. *Physics Today*, November 1999.
30. Carl A. Dahlquist, An investigation into the nature of tack. *Adhes. Age* 2, Pages 25-29, 1959.
31. S. Heddleson, D. Hamann, D.R. Lineback. The Dalhquist Criterion: Applicability of a rheological criterion to the loss of pressure-sensitive tack in flour-water dough. *Cereal Chemists*, Volume 70, Pages 744-748, 1993.
32. M.F. Ashby, L.J. Gibson, U.Wegst, R. Olive, The mechanical properties of natural materials. *Material property charts*, Pages 123-140, 1995.
33. E.P.S. Tan, C.T. Lim, Nanoindentation study of nanofibers, *Appl. Phys. Lett.* 87 (2005) 123106.
34. C. Clifford, M.P. Seah. Quantification issues in the identification of nanoscale regions of homopolymers using modulus measurement via AFM nanoindentation, *Appl. Surf. Sci.* 252, Pages 1915-1933, 2005.
35. Fernando G. Torres, Omar P. Troncoso, Fernando P. Cavalié. Physical characterization of the liquid adhesive from orb-weaving spiders. *Materials Science and Engineering C*, Volume 34, Pages 341–344, 2013.
36. Tanja Neumann, Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy. JPK Instruments Application Report. www.jpk.com
37. F. G. Torres, E. Le Bourhis, O. P. Troncoso, J. Llamaza. Nanomecánica de Materiales Biológicos VII Congreso Bolivariano de Ingeniería Mecánica 2012.

38. Tatyana G. Kuznetsova, Maria N. Starodubtseva, Nicolai I. Yegorenkov, Sergey A. Chizhik, Renat I. Zhdanov. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. Science Direct, Micron 38, Pages 824–833, 2007.
39. M. Radmacher, R. W. Tillmann, and H. E. Gaub. Imaging viscoelasticity by force modulation with the atomic force microscope, Physikdepartment Technische Universität München.
40. Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM, IOPscience. Nanotechnology 4, Pages 106, 1996.
41. Microscopía de Efecto Túnel y Microscopía de Fuerza Atómica, Open Course Ware UC3M.
42. M Radmacher, M Fritz, C M Kacher, J P Cleveland, and P K Hansma. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. Biophys Journal, 70(1), Pages 556–567, January 1996.
43. Manual de AFM: “Operating Instructions easyScan 2 AFM Version 1.6”.

