

Calibración de Microscopios Confocales

J. de Vicente⁽¹⁾, C. Molpeceres⁽²⁾, O. Guarneiros⁽²⁾,
García-Ballesteros. J.J⁽²⁾

(1) *Laboratorio de Metrología y Metrotecnica, Universidad Politécnica de Madrid
c/ J.G. Abascal 2, 28006 MADRID
Teléfono: 91 336 3125 Correo Electrónico: jvo@industriales.upm.es.*

(2) *Centro Láser, Universidad Politécnica de Madrid
Campus Sur, Edificio "La Arboleda", 28031 MADRID*

Resumen

El microscopio confocal ha sido durante mucho tiempo un instrumento de observación tridimensional con múltiples aplicaciones especialmente dentro de la biología. Sin embargo en los últimos años ha comenzado a ser utilizado como instrumento de medida en diferentes áreas de la ingeniería. En la actualidad existen muchas especificaciones de productos (dimensionales, angulares, acabado superficial) en las escalas micrométricas y nanométricas que pueden o podrían ser verificadas utilizando este instrumento. Pero para que esta verificación sea válida dentro de un sistema de calidad el microscopio confocal debe ser trazable. Esta ponencia presenta una solución sencilla a este problema implementada en el Centro Láser de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) que ha permitido dotar de trazabilidad a las medidas dimensionales realizadas en el plano XY y en el eje Z de su microscopio confocal.

Palabras Clave: Microscopía Confocal, Metrología, Trazabilidad, Calibración, Incertidumbre

Abstract

The confocal microscope has been a three-dimensional observation instrument with multiple applications especially in biology. However in recent years has begun to be used as a measuring instrument contact in various engineering fields. At present there are many product specifications (size, angular, surface roughness) in the micrometer and nano scales that can or could be verified using this instrument. But this verification is only valid within a quality system if the confocal microscope is traceable. This paper presents a simple solution to this problem implemented in the Laser Centre of the Polytechnic University of Madrid (UPM). This solution provides traceability to the size measurements made in the XY plane and the Z-axis.

Keywords: Confocal Microscopy, Metrology, Traceability, Calibration, Uncertainty.

1. Introducción

El papel de la nanotecnología como motor de la innovación tecnológica ha sido muy importante en los últimos años. La creciente demanda de éste tipo de productos exige la utilización sistemas de medición y verificación trazables desde un punto de vista metrológico que permitan asegurar con un nivel de confianza razonable la conformidad de sus especificaciones con el fin de garantizar el buen funcionamiento del producto

final y la intercambiabilidad de sus componentes. Esta presión ha llevado a que instrumentos de observación como lo serían los microscopios confocales hayan cambiado su rol y poco a poco se hayan transformado en una herramienta de medición necesaria en algunos ámbitos [8].

Para que los resultados de medida sirvan para declarar a un producto conforme con sus especificaciones es necesario que dichos resultados sean trazables desde el punto de vista metrológico. Ello implica que (ver definición de trazabilidad en [1]):

- el instrumento con el que han sido obtenidos haya sido previamente calibrado frente a patrones trazables.
- se hayan determinado las correcciones de calibración del instrumento
- y se hayan estimado las incertidumbres de las correcciones de calibración y de los resultados de medida mediante el procedimiento descrito en la guía ISO-GUM [2] u otro equivalente [3].

Sin embargo, la trazabilidad de los microscopios confocales al igual que la de otros microscopios de barrido es muy difícil de asegurar debido fundamentalmente a la existencia de patrones adecuados ni de laboratorios que sean capaces de certificarlos con incertidumbres suficientemente bajas [9].

2. Descripción del microscopio confocal del Centro Láser de la UPM

El Centro Láser de la UPM dispone de un microscopio Leica modelo ICM 1000 [10] con siete objetivos de los cuales habitualmente solo se utilizan cuatro (ver tabla 1). El campo de medida en el eje Z es de 2 mm y posee una resolución en dicho eje de 25 nm.

Tabla 1. Objetivos utilizados en el microscopio confocal del Centro Láser

AMPLIFICACIÓN	Apertura Numérica	División de Escala XY (μm)	Resolución Lateral (μm)	Campo de Medida XY (μm)
$\times 20$	0,40	0,78	0,6 – 1,0	500 \times 400
$\times 50$	0,50	0,31	0,5 – 0,8	200 \times 160
$\times 50$	0,75	0,31	0,3 – 0,5	200 \times 160
$\times 100$	0,90	0,16	0,3 – 0,4	100 \times 80

3. Patrones para la calibración del microscopio confocal

Para la calibración del microscopio confocal se han elegido patrones de fácil adquisición y sobre todo calibración en España.

Para la calibración en el plano XY se ha utilizado un patrón de trazos de vidrio (100 trazos uniformemente distribuidos a lo largo de un 1 mm) calibrado en el Centro Español de Metrología (CEM) con 0,5 μm de incertidumbre.

Para la calibración del eje Z se han utilizados patrones de profundidad de ranura como aquellos utilizados para la calibración del eje Z de los rugosímetros y también han sido calibrados en el CEM. Se utilizado patrones cuyo nominal varía entre 20 nm y algún micrómetro.

4. Calibración en el plano XY

Se ha utilizado un procedimiento para la calibración del microscopio confocal en el plano XY similar al utilizado en la calibración de proyectores de perfiles. Dicho procedimiento ha consistido en la medición de once trazos del patrón uniformemente repartidos a lo largo del área visible en la pantalla del microscopio. Sobre cada trazo se han repetido nueve medidas a partir de las cuales se ha determinado el valor medio, su desviación típica y la corrección de calibración. Todo el proceso se ha repetido según cuatro orientaciones: dos paralelas a los ejes y dos formando 45° grados con ellos (ver figura 1).

Todo el proceso se debe repetir para cada uno de los objetivos que se utilicen en el microscopio confocal. En el caso del Centro Láser se han calibrado los cuatro objetivos mas utilizados.

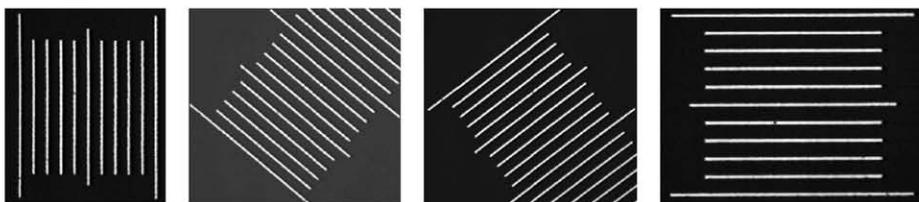


Figura 1. Orientaciones del patrón de trazos durante la calibración en el plano XY

La estimación de la incertidumbre de las correcciones de calibración se ha realizado de forma simple utilizando el modelo de correcciones aditivas descrito en la referencia 5, considerando como únicas contribuciones las correspondientes al patrón utilizado, la repetibilidad y la resolución lateral. Se han considerado despreciables la temperatura y la posible deriva en el tiempo del patrón. La influencia asociada a la determinación del centro del trazo se ha considerado incluida dentro de la repetibilidad.

5. Calibración en el eje Z

Se han elegido diez ranuras cuyas profundidades nominales cubren el rango de utilización del microscopio en el eje Z. Cada ranura se ha medido diez veces, variando ligeramente su posición respecto del objetivo, evaluándose el valor medio, la desviación típica y la corrección de calibración.

La estimación de la incertidumbre de las correcciones de calibración se ha realizado de forma similar al procedimiento utilizado en el plano XY. Se ha utilizado el modelo de correcciones aditivas considerando como únicas contribuciones las correspondientes al patrón utilizado, la repetibilidad y la división de escala del microscopio. Se han considerado también despreciables la temperatura y la posible deriva en el tiempo del patrón.

Se ha realizado también una calibración frente a un patrón de vidrio de planitud para cada uno de los objetivos con el fin de determinar la posible distorsión que cada uno de ellos induce.

6. Incertidumbres de uso del microscopio

Se han determinado dos incertidumbres de uso. La primera válida para mediciones dimensionales en el plano XY y la segunda válida para mediciones de diferencias de cotas (según el eje Z).

En ambos casos se ha utilizado el modelo de corrección global nula descrito en el referencia 5. Este modelo es particularmente útil en aquellos instrumentos en los que no es posible aplicar (o no es conveniente hacerlo) las correcciones de calibración. Para ello se determina una corrección global nula con una incertidumbre ampliada que recoge el efecto de la no aplicación de dichas correcciones. Como componentes adicionales a las de la corrección se han considerado únicamente la división de escala (o la resolución lateral) y la repetibilidad.

En la tabla 2 se incluyen las incertidumbres de uso estimadas supuesto que se toma como resultado de medida la media de cuatro lecturas.

Tabla 2. Incertidumbres de uso del microscopio confocal del Centro Láser

Amplificación	Apertura Numérica	Incertidumbre de uso en el Plano XY	Incertidumbre de uso en el eje Z
×20	0,40	1,1 μm + 0,015·L	0,4 μm
×50	0,50	1,0 μm + 0,013·L	0,1 μm
×50	0,75	0,8 μm + 0,011·L	0,1 μm
×100	0,90	0,7 μm + 0,011·L	0,1 μm

Los resultados obtenidos en el plano XY confirman que los objetivos presentan distorsiones geométricas del orden de un uno o dos por ciento. Estas distorsiones se pueden poner fácilmente de manifiesto realizando mediciones adicionales del patrón de trazos en nuevas posiciones, es especial en las cercanías del perímetro que limita el área de visión. Dado que la corrección de dichas distorsiones geométricas mediante la aplicación de correcciones de calibración no se piensa que sea factible, se considera improbable la disminución del término lineal de las ecuaciones incluidas en la tabla 2.

El término constante correspondiente a la incertidumbre de uso en el plano XY si podría reducirse significativamente (al menos para los objetivos ×50 y ×100) utilizando un patrón de trazos con menor incertidumbre de calibración.

La incertidumbre correspondiente al eje Z (para los objetivos ×50 y ×100) es una estimación conservadora. Quizá pudiera reducirse a unos 60÷80 nm. Pero por el momento se ha considerado preferible mantener el valor de 100 nm.

Las incertidumbres presentadas son válidas únicamente para medidas de distancias punto a punto o equivalentes en el plano XY o paralelas al eje Z. Para el caso de mediciones de radios de arcos y mediciones angulares contenidos en el plano XY se precedente aplicar el “Modelo G” desarrollado por el Laboratorio de Metrología y Metrotecnica (LMM) de la UPM para medidas tridimensionales [6,7].

7. Conclusiones

Se ha presentado un procedimiento sencillo de calibración de microscopios confocales realizado con patrones trazables y calibrados en España en el Centro Español de Metrología. Dicho procedimiento permite estimar las correcciones de calibración del microscopio, sus incertidumbres y las incertidumbres de uso del microscopio para medidas de distancias punto a punto en el plano XY o paralelas al eje Z.

Actualmente se está trabajando en la estimación de incertidumbres para medidas de radios de arcos y ángulos en el plano XY.

Por tanto, en un futuro próximo el microscopio confocal del Centro Láser de la UPM será un instrumento trazable que ofrecerá resultados de medida trazables y por tanto, resultados que podrán ser utilizados para declarar la conformidad con especificaciones de los productos con él inspeccionados.

A medio plazo se piensa continuar trabajando en la trazabilidad de las medidas de rugosidad y calidad superficial que éste instrumento puede también realizar.

8. Referencias

1. ISO/IEC PRF Guide 99, *International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM)*, 3ª Edición, ISO, Ginebra, Suiza, (2007, documento FDIS).
2. BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP and OIML 1995, *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*, ISO, Ginebra, Suiza, ISBN 92-67-10188-9 (1995)
3. ENAC, *Expresión de la incertidumbre de medida en las calibraciones*, CEA-ENAC-LC/02 (1998), 22 páginas.
4. UNE-EN ISO 10012:2003. *Sistemas de gestión de las mediciones. Requisitos para los procesos de medición y los equipos de medición* (2003).
5. A.M. Sánchez Pérez. *Fundamentos de Metrología*. Sección de Publicaciones de la ETSII-UPM, 1999, ISBN: 84-7484-138-0.
6. de Vicente, J.; F.J. Raya: *Simplified Statistical Method for Uncertainty Estimation in Coordinate Metrology*. Proceedings of METROLOGIE'99, Burdeos, (1999)
7. J. de Vicente; F.J. Raya: *Modelo simplificado de MMC para la estimación de incertidumbres en geometrías sencillas*. Actas del II Congreso Nacional de Metrología. Sevilla, (2000). Páginas 554-563.
8. T. Pfeifer et al.: *Quality control and process observation for the micro assembly*. Measurement 30 (2001). Páginas 1-18.
9. R. Breil et al.: *Intercomparison of scanning probe microscopes*. Precision Engineering 26 (2002) 296-305.
- 10- Leyca Microsystem: *Industrial Confocal Microscope Leica ICM 1000. User manual*

9. Agradecimientos

Se desea agradecer al Centro Láser de la Universidad Politécnica de Madrid el apoyo brindado en la fase experimental del presente artículo, así como al Laboratorio de Metrología y Metrotecnica por los patrones de referencia utilizados.