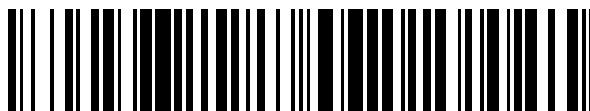


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 809**

51 Int. Cl.:

G02B 21/00 (2006.01)

G01B 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2016 PCT/EP2016/080771**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.09.2017 WO17148555**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2016 E 16809812 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3345032**

54 Título: **Procedimiento para la determinación de la altura de un objeto**

30 Prioridad:

02.03.2016 DE 102016103736

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.02.2020

73 Titular/es:

CARL ZEISS MICROSCOPY GMBH (100.0%)

Carl-Zeiss-Promenade 10

07745 Jena, DE

72 Inventor/es:

LANGHOLZ, NILS y

DRESCHER, VIKTOR

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 741 809 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la determinación de la altura de un objeto

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la altura de un objeto en una primera ubicación lateral del objeto mediante un microscopio, el cual representa el objeto con una función de borrosidad de imágenes de puntos a lo largo de una dirección z que coincide con la dirección de la altura. Asimismo, la presente invención se refiere a un microscopio para la generación de una representación parcialmente confocal y de una representación en el campo amplio de un objeto, donde el microscopio comprende un equipo detector, un equipo estenopeico para la
10 representación parcialmente confocal y para la toma en el campo amplio, un equipo de enfoque, el cual está configurado para ajustar una posición z de un foco de la representación parcialmente confocal, y un equipo de control para dirigir el equipo estenopeico, el cual está conectado con el equipo detector.

15 Por el estado de la técnica, son conocidos procedimientos mediante los cuales se puede determinar la topografía de un objeto mediante microscopios ópticos. Para ello, se utilizan en particular microscopios confocales. En estos procedimientos conocidos, el foco de una representación parcialmente confocal es modificado en una dirección z, es decir, en la dirección de la altura de la topografía, y en cada posición z se toma una representación parcialmente confocal. Generalmente, la representación parcialmente confocal se escoge de tal modo que la imagen comprende un porcentaje meramente confocal y un porcentaje de un campo amplio. Para cada una de estas imágenes en la
20 dirección z, que en resumen se denominan también pila, se determina la intensidad y se calcula la evolución de la intensidad en la dirección z. Por medio de esta evolución de la intensidad calculada, se puede determinar la intensidad máxima cuya coordenada z coincide con la altura del objeto en el punto medido. Con el fin de determinar en plano la altura del objeto, se repite el procedimiento descrito anteriormente en diferentes ubicaciones.

25 Para determinar la intensidad máxima, generalmente es necesario efectuar muchas mediciones a lo largo de la dirección z con el fin de determinar con la exactitud correspondiente el máximo de la intensidad y, con ello, la altura del objeto. Por lo tanto, al procedimiento puede ir aunada una gran inversión de tiempo.

30 El documento US 2004/0008515 A1 aborda la mejora de la iluminación fluorescente para la microscopia de resolución tridimensional. La publicación Hiraoka Y. y otros., Revista de Biofísica, Vol. 57, febrero 1990, pág. 325-333, describe la determinación de las propiedades de representación tridimensional en un microscopio óptico. McNally J. y otros, SPIE, Vol. 2.984, 1997, pág. 52-63, compara varios procedimientos de microscopia en 3D mediante un objeto de prueba conocido con exactitud.

35 El objetivo de la invención es proporcionar un sistema para determinar con rapidez la altura de un objeto.

Este objetivo se consigue mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 y mediante el microscopio de acuerdo con la reivindicación 12. Las reivindicaciones dependientes contienen formas de realización preferidas de la invención.

40 En un procedimiento para determinar la altura de un objeto en una primera ubicación lateral del objeto mediante un microscopio, el cual representa el objeto con una función de borrosidad de imágenes de puntos a lo largo de una dirección z que coincide con la dirección de la altura, se efectúan las siguientes etapas: representar el objeto con el microscopio en el campo amplio y determinar la intensidad del campo amplio, calcular la intensidad máxima, esperada en la primera ubicación, mediante la multiplicación de la intensidad del campo amplio con un factor de
45 escala predeterminado, representar de manera parcialmente confocal el objeto en la primera ubicación con el foco en una posición de medición en la dirección z, donde, para la toma parcialmente confocal, se utiliza un equipo estenopeico con una abertura que es mayor que el límite de difracción, y donde la representación parcialmente confocal fija un rango de profundidad de campo y el foco se encuentra en el rango de profundidad de campo, así como determinar una intensidad parcialmente confocal de la representación parcialmente confocal en la primera
50 ubicación, calcular la intensidad correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos en la primera ubicación mediante la determinación de la diferencia entre la intensidad parcialmente confocal y el producto de la intensidad del campo amplio con un factor de enlace predeterminado, calcular la coordenada z del foco en la dirección z en la que la función de borrosidad de imágenes de puntos es máxima, utilizándose una forma conocida
55 previamente de la función de borrosidad de imágenes de puntos, de la intensidad correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos calculada, y de la intensidad máxima esperada calculada, y utilizar la coordenada z como altura del objeto en la primera ubicación.

60 El procedimiento se utiliza preferentemente para determinar la topografía de un objeto extendido lateralmente. Para ello, se puede determinar la altura en varias primeras ubicaciones, donde las primeras ubicaciones están distanciadas entre sí lateralmente. Por lo tanto, las primeras ubicaciones hacen referencia en particular a la extensión lateral del objeto. Las primeras ubicaciones están distanciadas de manera preferente perpendicularmente con respecto a la dirección z.

65 Preferiblemente, el procedimiento se utiliza escaneando, donde, en cada punto de escaneado que pueda corresponderse con la primera ubicación, se ejecute el procedimiento reivindicado o partes del mismo. A partir de las

alturas de las primeras ubicaciones individuales, se puede determinar la topografía del objeto.

5 El microscopio está configurado para representar el objeto de manera parcialmente confocal. La expresión «de manera parcialmente confocal» significa en este contexto que la representación está limitada mediante un estenopo en la dirección z, pero su difracción no está limitada aún. A este respecto, el tamaño del estenopo determina el área de la primera ubicación en la dirección z, que se representa mediante la representación parcialmente confocal. Tal y como es conocido en general, la resolución en dirección z es mayor cuanto menor sea el estenopo.

10 La expresión «representación confocal» significa en este contexto que el estenopo tiene una extensión que se corresponde con el límite de difracción de la representación. Una representación parcialmente confocal presenta en particular fracciones de una representación meramente confocal y de la imagen amplia. El estenopo para una representación parcialmente confocal es mayor que el estenopo para una representación confocal. La representación parcialmente confocal sirve en particular para la detección de una llamada imagen compuesta.

15 El microscopio, en particular, su óptica y el tamaño del estenopo, determina el rango de profundidad de campo en la dirección z. Por lo tanto, el rango de profundidad de campo es una propiedad del microscopio que puede determinarse de antemano con procedimientos conocidos.

20 El objeto presenta en particular una topografía que se encuentra en una modificación de la altura del orden de entre los nano y los milímetros. El objeto puede ser cualquier muestra que pueda ser representada ópticamente. En particular, el objeto puede ser también una muestra biológica.

25 La representación parcialmente confocal define el rango de profundidad de campo. El rango de profundidad de campo depende del tamaño del estenopo, donde el rango de profundidad de campo en la dirección z es mayor cuanto mayor sea el estenopo. Por lo tanto, una representación confocal tiene un menor rango de profundidad de campo en la dirección z que la representación parcialmente confocal. Asimismo, el rango de profundidad de campo de una representación parcialmente confocal es menor que el rango de profundidad de campo de una representación de campo amplio. Si en una representación confocal se reduce más el estenopo, el rango de profundidad de campo no varía, sino que únicamente se reduce la intensidad de la representación confocal.

30 Una representación en el campo amplio ha de ser en particular una representación del objeto que no tenga o que tenga poca resolución espacial en la dirección z. Esto puede suceder a través de que en una trayectoria de haces de la representación, que constituya la trayectoria de haces de la luz emitida o reflejada desde la primera ubicación hacia un equipo detector del microscopio, no esté previsto ningún estenopo o un estenopo con un gran diámetro. 35 Tras la realización de la representación en el campo amplio, se determina su intensidad, la cual se corresponde con la intensidad del campo amplio.

40 La representación en el campo amplio puede realizarse en la primera ubicación o en cualquier otra ubicación del objeto y sirve preferentemente para detectar las propiedades ópticas como, por ejemplo, la reflectividad, de la muestra. Preferentemente, la intensidad del campo amplio se determina únicamente una vez, de modo que, si se repite el procedimiento, se utiliza la intensidad del campo amplio de una medición anterior. La determinación únicamente una vez de la intensidad del campo amplio funciona en particular si hay presente un objeto cuyas propiedades ópticas, en particular, la reflectividad, son constantes o prácticamente constantes por la extensión del objeto, o varían en menos del 10 %, 20 % o 50 %. Por consiguiente, en el caso de una repetición del procedimiento 45 descrito aquí, preferentemente se efectúa únicamente una representación en el campo amplio de la primera ubicación.

50 Como siguiente etapa del procedimiento, se calcula la intensidad máxima esperada en la primera ubicación, la cual se corresponde con la intensidad máxima que se obtiene en una representación parcialmente confocal o en una representación confocal. Este cálculo se basa en el conocimiento de los inventores relativo a que la intensidad máxima de una representación confocal o parcialmente confocal sea proporcional a la intensidad del campo amplio. Esta relación se corresponde con el factor de escala, el cual es determinado preferentemente de antemano en el microscopio, y en particular en el objeto. El cálculo de la intensidad máxima esperada en la primera ubicación se puede efectuar únicamente una vez si la determinación de la intensidad del campo amplio también se efectúa 55 únicamente una vez. Por lo tanto, la determinación de la intensidad máxima esperada no tiene que realizarse de nuevo al repetirse el procedimiento.

60 La representación parcialmente confocal del objeto en la primera ubicación se lleva a cabo en cada una de las primeras ubicaciones en el caso de repetirse el procedimiento. El foco de esta representación se prevé en una posición de medición z que se encuentra en el rango de profundidad de campo de la representación parcialmente confocal del microscopio. En particular, la posición de medición z se encuentra en un rango de profundidad de campo que está fijado por una representación confocal. La elección de la posición de medición z se realiza preferiblemente de manera aleatoria, o para la representación parcialmente confocal se utiliza en cada una de las primeras ubicaciones la misma posición de medición z. La fijación de la posición de medición z puede efectuarse 65 manualmente mediante un procedimiento prueba- error de tal modo que se encuentre en el rango de profundidad de campo de la representación parcialmente confocal. En particular, para la fijación del rango de profundidad de campo

de la representación parcialmente confocal, se puede recurrir a otros parámetros conocidos del objeto o del microscopio. La intensidad parcialmente confocal determinada a partir de la representación parcialmente confocal puede utilizarse preferentemente para averiguar si la posición de medición z se encuentra en el rango de profundidad de campo. Si no es éste el caso, se puede repetir esta etapa del procedimiento hasta que conste que la posición de medición z se encuentra en el rango de profundidad de campo de la representación parcialmente confocal.

La representación parcialmente confocal se produce a través de que en la trayectoria de haces de la representación esté previsto un estenopo. Por consiguiente, la representación parcialmente confocal presenta a diferencia de la representación en campo amplio una mejor resolución en la dirección z. A través de que para el microscopio se pueda determinar la función de borrosidad de imágenes de puntos, su evolución exacta es conocida, por ejemplo, la divergencia de la función de borrosidad de imágenes de puntos con respecto a una curva gaussiana y a su amplitud estándar. Una representación meramente confocal representa el objeto con la función de borrosidad de imágenes de puntos.

La intensidad máxima de la función de borrosidad de imágenes de puntos se denomina en particular la intensidad correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos. La posición de medición z en la dirección z, que coincide con la intensidad máxima de la función de borrosidad de imágenes de puntos, se puede calcular gracias a la asunción relativa a que la intensidad de una representación parcialmente confocal en la primera ubicación se corresponda con la suma de la intensidad de una representación confocal en la primera ubicación y la intensidad del campo amplio multiplicada por un factor de enlace. El factor de enlace se determina preferiblemente antes de la realización del procedimiento, por ejemplo, para el objeto observado o en general para el microscopio. Partiendo de este contexto, a partir de las magnitudes medidas, esto es, la intensidad parcialmente confocal y la intensidad del campo amplio, se puede calcular la intensidad correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos en la primera ubicación. Esta etapa del procedimiento se realiza preferentemente durante la determinación de la topografía para cada primera ubicación.

La coordenada z buscada es la posición del foco en la dirección z en la que la intensidad de la función de borrosidad de imágenes de puntos es máxima. Aquella es calculada utilizándose la información de la forma de la función de borrosidad de imágenes de puntos y de dos puntos que son conocidos por la función de borrosidad de imágenes de puntos. Esto se consigue ya que la función de borrosidad de imágenes de puntos en la dirección z coincide con la evolución de la intensidad de una representación confocal. El cálculo de la posición en la que la función de borrosidad de imágenes de puntos es máxima puede realizarse, por ejemplo, mediante el vínculo de la función de borrosidad de imágenes de puntos a los dos puntos conocidos.

Estos dos puntos conocidos se corresponden con la intensidad, correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos, de la representación parcialmente confocal, así como con la intensidad máxima esperada, la cual fue determinada previamente, como se describió anteriormente. La coordenada z del foco en la que la evolución de la intensidad de la función de borrosidad de imágenes de puntos es máxima coincide con la altura de la primera ubicación del objeto.

Al determinarse la posición para la que la función de borrosidad de imágenes de puntos es máxima, puede darse una ambigüedad. Ésta puede resolverse como se describe a continuación. De manera opcional, este problema puede resolverse a través de que la coordenada z determinada del foco sea comparada con coordenadas z determinadas anteriormente, por ejemplo, utilizándose como posición verdadera aquella de las dos coordenadas z determinadas que se encuentre más cerca de la medición anterior. Asimismo, es posible que se recurra a otra información conocida por el objeto para la resolución de la ambigüedad.

Preferentemente, para la determinación de la altura del objeto en la primera ubicación, se realiza sólo una única representación parcialmente confocal. Puesto que en los procedimientos conocidos para la determinación óptica de la topografía de un objeto se deben tomar pilas z generalmente con diez o más representaciones parcialmente confocales con focos distanciados entre sí en la dirección z, y estas mediciones se llevan a cabo secuencialmente, la invención reduce la duración del procedimiento para la determinación de la altura de un punto del objeto en hasta el 10% en comparación con procedimientos conocidos. En particular, con el procedimiento es posible tomar para cada primera ubicación sólo una única representación parcialmente confocal, de modo que con procedimientos conocidos de representación confocal se puede generar no sólo una imagen bidimensional, sino también una imagen tridimensional del objeto.

Preferentemente, para la toma parcialmente confocal, se utiliza un equipo estenopeico con una abertura que sea mayor que el límite de difracción, de modo que la intensidad de la toma parcialmente confocal presenta fracciones de una representación de campo amplio.

En esta forma de realización es una ventaja que la evolución de la intensidad de la representación parcialmente confocal presente en dependencia de la posición de medición z un mayor rango de profundidad de campo en comparación con una representación meramente confocal, esto es, una representación en la que el estenopo presenta una abertura que sea mayor que el límite de difracción. Por lo tanto, el rango de profundidad de campo está

ampliado en esta forma de realización y puede ser ajustado con mayor facilidad. Asimismo, se pueden determinar mayores diferentes de altura.

5 Preferentemente, el factor de escala se determina a través de las siguientes etapas: generar una pila z mediante la representación parcialmente confocal repetida de una primera ubicación de calibración lateral de un primer objeto de calibración o del objeto con diferentes focos, desplazados en la dirección z, y determinar las intensidades parcialmente confocales para cada una de las representaciones parcialmente confocales; calcular la evolución de la intensidad en la dirección z en la primera ubicación de calibración y determinar la intensidad de calibración máxima de la evolución de la intensidad en la primera ubicación de calibración; representar la primera ubicación de calibración con el microscopio en el campo amplio y determinar una primera intensidad de calibración del campo amplio en la primera ubicación de calibración; y calcular el factor de escala como relación entre la intensidad de calibración máxima y la primera intensidad de calibración del campo amplio.

15 El factor de escala puede ser determinado en un primer objeto de calibración distinto del objeto o en el propio objeto. El primer objeto de calibración presenta preferentemente propiedades ópticas similares, especialmente en lo referente a la reflexión y a la dispersión de la luz, como el objeto a medir. El objeto y el primer objeto de calibración difieren en cuanto a sus propiedades ópticas en menos del 10 %, 20 % o 50 %. La utilización de un primer objeto de calibración tiene la ventaja de que no se tenga que realizar la determinación del factor de escala cada vez antes del procedimiento. Por el contrario, la determinación del factor de escala en el propio objeto a medir tiene la ventaja de que el factor de escala pueda ser determinado con una exactitud particularmente elevada. Tal y como se ha descrito anteriormente, la determinación del factor de escala se efectúa antes de la realización del procedimiento.

25 La primera ubicación de calibración puede ser una ubicación seleccionada cualquiera del primer objeto de calibración o del objeto. A modo de ejemplo, es posible que la primera ubicación de calibración coincida con la primera ubicación, por ejemplo, si la determinación del factor de escala se lleva a cabo directamente antes de la realización del procedimiento descrito.

30 Para la determinación del factor de escala, se determina la evolución de la intensidad de la representación parcialmente confocal en la dirección z. A este respecto, en la trayectoria de haces de la representación se prevé un estenopo cuya abertura tiene un tamaño como se utiliza a continuación en el procedimiento descrito. En particular, para la representación parcialmente confocal, se utiliza un estenopo que es empleado tanto para la determinación del factor de escala como para la determinación de la altura del objeto en la primera ubicación.

35 Las diversas representaciones parcialmente confocales, cuyos focos están desplazados en la dirección z, forman una pila z, a partir de la cual se determina en cada caso la intensidad parcialmente confocal, de modo que a partir de ello se puede determinar la evolución de la intensidad en la dirección z. Por medio de esta evolución de la intensidad, se calcula la intensidad de calibración máxima y se establece su relación con respecto a la intensidad de calibración del campo amplio ya detectada, que ha sido determinada en la primera ubicación de calibración. En particular, el factor de escala es la relación de la intensidad de calibración máxima con respecto a la intensidad de calibración del campo amplio. La intensidad de calibración del campo amplio se determina en particular como la intensidad del campo amplio determinada anteriormente.

45 Preferentemente, el factor de enlace se determina a través de las siguientes etapas: representar de manera parcialmente confocal una segunda ubicación de calibración lateral de un segundo objeto de calibración o del objeto con el foco en una posición de medición de calibración en la dirección z, que se encuentra en el rango de profundidad de campo, y determinar la intensidad de calibración parcialmente confocal de la representación parcialmente confocal en la segunda ubicación de calibración; representar de manera confocal la segunda ubicación de calibración con el foco en la posición de medición de calibración y determinar una intensidad de calibración confocal de la representación confocal en la segunda ubicación de calibración; representar la segunda ubicación de calibración con el microscopio en el campo amplio y determinar una segunda intensidad de calibración del campo amplio en la segunda ubicación de calibración; y calcular el factor de enlace como relación entre la diferencia entre la intensidad de calibración parcialmente confocal y la intensidad de calibración confocal con respecto a la segunda intensidad de calibración del campo amplio.

55 El segundo objeto de calibración puede coincidir con el primer objeto de calibración. En particular, el segundo objeto de calibración está configurado de manera similar al objeto en cuanto a su reflexión y a la dispersión de la luz, por ejemplo, los parámetros ópticos se diferencian en menos del 10 %, 20 % o 50 %. Sin embargo, la determinación del factor de enlace se efectúa preferentemente en el propio objeto. Para ello, en una segunda ubicación de calibración escogida de manera arbitraria, que puede coincidir con la primera ubicación de calibración o con la primera ubicación, se genera una representación parcialmente confocal. En particular, el tamaño del estenopo en la trayectoria de haces de la representación es el mismo que en el procedimiento descrito anteriormente. Preferentemente, el estenopo es idéntico al del procedimiento descrito anteriormente y realizado a continuación del cálculo del factor de enlace.

65 La representación confocal se realiza con un estenopo cuyo diámetro se corresponde con el límite de difracción de la representación. Por lo tanto, el estenopo para la representación parcialmente confocal es mayor que el estenopo

para la representación parcialmente confocal. La intensidad de calibración confocal, determinada en la segunda ubicación de calibración, de la representación confocal se corresponde con la intensidad de calibración correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos, ya que la función de borrosidad de imágenes de puntos se consigue con la representación confocal.

5 La segunda intensidad de calibración del campo amplio puede coincidir con la primera intensidad de calibración del campo amplio si aquella se determina en la misma ubicación que la primera intensidad de calibración del campo amplio. En particular, se puede omitir la etapa representar la segunda ubicación de calibración con el microscopio en el campo amplio y determinar una segunda intensidad de calibración del campo amplio en la segunda ubicación de calibración si la primera ubicación de calibración coincide con la segunda ubicación de calibración.

10 El cálculo del factor de enlace se produce a la inversa con respecto a la determinación de la intensidad correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos por medio de la relación descrita anteriormente entre la intensidad de la representación parcialmente confocal, la intensidad de la representación confocal y la intensidad del campo amplio.

15 Preferentemente, la primera ubicación se representa con el microscopio en el campo amplio y la intensidad del campo amplio actual se determina en la primera ubicación.

20 En particular, en el caso de repetición del procedimiento descrito anteriormente, en cada una de las primeras ubicaciones se toma una imagen de campo amplio y, por lo tanto, se determina la intensidad del campo amplio en cada primera ubicación. Este *modus operandi* tiene la ventaja consistente en que, si el objeto varía en gran medida en cuanto a las propiedades ópticas, especialmente la reflectividad o la dispersión de la luz, a lo largo de la extensión del objeto, se utiliza la intensidad del campo amplio adecuada en cada caso. Por consiguiente, se puede aumentar la exactitud del procedimiento mediante la determinación de la intensidad del campo amplio en cada primera ubicación.

25 Preferentemente, el procedimiento presenta además las siguientes etapas: representar de manera parcialmente confocal la primera ubicación con el foco en al menos dos posiciones de medición z, distanciadas en la dirección z, que se encuentran en cada caso en el rango de profundidad de campo, y determinar intensidades parcialmente confocales para cada representación parcialmente confocal en la primera ubicación; calcular las intensidades, correspondientes a la función de borrosidad de imágenes de puntos, en la primera ubicación mediante la determinación respectiva de la diferencia entre la intensidad parcialmente confocal respectiva y el producto de la intensidad del campo amplio con el factor de enlace predeterminado; calcular la coordenada z del foco en la dirección z en la que la función de borrosidad de imágenes de puntos es máxima, utilizándose la forma de la función de borrosidad de imágenes de puntos, de las intensidades calculadas, correspondientes a la función de borrosidad de imágenes de puntos, y la intensidad máxima esperada calculada.

30 En esta forma de realización preferida, se determinan dos o más representaciones parcialmente confocales de la ubicación, donde los focos de las representaciones parcialmente confocales están distanciados en la dirección z. El tamaño del estenopo es preferentemente el mismo para cada una de las representaciones parcialmente confocales. Dos representaciones parcialmente confocales y la determinación correspondiente de las intensidades parcialmente confocales permiten que la determinación de la posición en la que la función de borrosidad de imágenes de puntos es máxima se realice por medio de tres puntos, a saber, las dos intensidades correspondientes a la función de borrosidad de imágenes de puntos, y la intensidad máxima de la función de borrosidad de imágenes de puntos. Gracias a ello, es posible resolver de forma fiable la ambigüedad del procedimiento descrito anteriormente.

35 Preferentemente, para la generación de una determinación en vivo de la altura del objeto en una segunda ubicación lateral del objeto, diferente con respecto a la primera ubicación, se representa la segunda ubicación de manera parcialmente confocal y, para calcular la coordenada z del foco en la dirección z en la segunda ubicación, se tiene en cuenta la coordenada z del foco en la dirección z en la primera ubicación.

40 En esta forma de realización, se utiliza la información de la altura del objeto en un punto anterior para resolver la ambigüedad del procedimiento descrito anteriormente. En particular, está previsto que se utilice como coordenada z verdadera aquella coordenada z que se encuentre más cerca de la medición anterior. La segunda ubicación puede ser cualquier ubicación sobre el objeto que esté distanciada de la primera ubicación. En particular, la segunda ubicación puede ser seleccionada por el usuario del microscopio.

45 Puesto que para esta forma de realización sólo se efectúa una representación parcialmente confocal de la segunda ubicación, esta forma de realización es particularmente rápida, de modo que también se pueden mostrar al observador imágenes en vivo de la altura del objeto. Esto es útil en particular si el usuario puede dirigir manualmente la segunda ubicación. También es posible que las segundas ubicaciones dirigidas manualmente sean vinculadas entre sí en una imagen topográfica del objeto.

60 Preferentemente, el procedimiento comprende además las etapas: representar de manera parcialmente confocal la primera ubicación con al menos dos estenopos diferentes y con el foco en una posición de medición z en la dirección

z, que se encuentra en el rango de profundidad de campo, y determinar otra intensidad parcialmente confocal para la representación parcialmente confocal con el otro estenopo; y calcular la coordenada z utilizándose la función de borrosidad de imágenes de puntos, la intensidad calculada, correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos, la otra intensidad parcialmente confocal y la intensidad máxima esperada calculada.

5 En esta forma de realización, que se puede utilizar de manera adicional o alternativa a las formas de realización mencionadas anteriormente, se toman dos representaciones parcialmente confocales en la primera ubicación, donde las representaciones parcialmente confocales se producen en cada caso con estenopos de diferente tamaño. Preferentemente, sólo para una de las representaciones parcialmente confocales, se calcula la intensidad correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos, tal y como se ha expuesto anteriormente. La otra intensidad parcialmente confocal se utiliza en particular para resolver la ambigüedad descrita anteriormente. La otra intensidad parcialmente confocal puede utilizarse en particular para determinar el lado de la función de borrosidad de imágenes de puntos en el que se encuentra la intensidad correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos.

15 En esta forma de realización es una ventaja que, para la determinación de la altura del objeto en la primera ubicación, no se tenga que modificar el foco de la representación parcialmente confocal, sino únicamente el tamaño del estenopo.

20 Preferentemente, como microscopio se utiliza un microscopio de escaneo por láser, donde, para representar de manera parcialmente confocal y representar en el campo amplio, se modifica el tamaño del estenopo mediante el ajuste o la sustitución del estenopo.

25 El microscopio de escaneo por láser utilizado presenta un equipo estenopeico en el que el tamaño del estenopo puede ser ajustado manual o automáticamente. Esta forma de realización del procedimiento utiliza en particular un microscopio de escaneo por láser con sólo un detector, el cual toma tanto la representación parcialmente confocal como la representación en el campo amplio. Asimismo, en esta forma de realización es posible determinar la ambigüedad de la determinación de la altura del objeto en la primera ubicación mediante dos tomas con estenopos de diferente tamaño.

30 Preferentemente, como microscopio se utiliza un microscopio de escaneo por láser, donde, para representar de manera parcialmente confocal y representar en el campo amplio, se prevén dos detectores detrás de un estenopo de diferente tamaño.

35 Esta forma de realización puede estar implementada de manera alternativa o adicional a la forma de realización descrita anteriormente. Para los dos detectores que pueden ser parte de un equipo detector, está previsto en cada caso un estenopo de diferente tamaño. Los dos estenopos forman en particular un equipo estenopeico. El mayor de los dos estenopos está previsto específicamente para la generación de una representación en el campo amplio, donde el estenopo pequeño se puede utilizar para la generación de la representación parcialmente confocal.

40 Una ventaja preferida de esta forma de realización es que la imagen de campo amplio y la representación parcialmente confocal pueden generarse simultáneamente, por ejemplo, previéndose un divisor de haz. Por consiguiente, en esta forma de realización, en cada determinación de la altura en la primera ubicación, se puede determinar la intensidad del campo amplio simultáneamente a la intensidad parcialmente confocal, de modo que el procedimiento es particularmente rápido en esta forma de realización del microscopio.

45 Preferentemente, como microscopio se utiliza un microscopio de escaneo por láser, donde para representar en el campo amplio se utiliza una cámara de campo amplio.

50 En este diseño, el microscopio de escaneo por láser es provisto de una cámara de campo amplio, hacia la cual, por ejemplo, mediante un divisor de haz, se dirige un porcentaje de la radiación de la trayectoria de haces de la representación. La representación en el campo amplio y la representación parcialmente confocal se superponen aquí preferentemente de manera lateral y vertical. En este diseño, es posible en particular tomar simultáneamente la representación parcialmente confocal y la representación en el campo amplio.

55 Preferentemente, como microscopio se utiliza un microscopio topográfico confocal, en el que se utiliza una retícula como estenopo, donde, para representar de manera parcialmente confocal, se utiliza una primera cámara con la retícula y, para representar en el campo amplio, se utiliza una segunda cámara.

60 Los microscopios topográficos confocales sirven en particular para la determinación de la topografía de un objeto, donde el objeto se representa en un amplio rango de longitudes de onda. Los microscopios topográficos confocales son conocidos por el estado de la técnica. A diferencia de ello, en la trayectoria de haces de la representación de acuerdo con esta forma de realización se incorpora un divisor de haz, el cual dirige la radiación de la representación hacia la primera cámara y la segunda cámara. Mediante la primera cámara y la retícula prevista delante de ella, se puede generar una representación parcialmente confocal del objeto, mientras que con la segunda cámara se puede representar una imagen de campo amplio del objeto. También en este caso, es ventajoso de nuevo que se puedan

tomar simultáneamente la representación parcialmente confocal y la representación en el campo amplio. La retícula puede ser parte de un equipo estenopeico, mientras que la primera cámara y la segunda cámara pueden ser parte de un equipo detector.

5 Preferentemente, como microscopio se utiliza un microscopio de Airy confocal, en el que el objeto es representado sobre un equipo detector que presenta varios píxeles y que resuelve una estructura de difracción de la representación parcialmente confocal, donde la intensidad del campo amplio y la intensidad parcialmente confocal se determinan a partir de una toma.

10 Los microscopios de Airy permiten representar la primera ubicación del objeto de tal modo que la estructura de difracción de la representación puede ser resuelta mediante los píxeles del equipo detector. Puesto que en el detector se representa la evolución de la difracción de la representación, en el equipo detector se pueden detectar simultáneamente la intensidad parcialmente confocal y la intensidad en representación de campo amplio. Por lo tanto, es posible tomar simultáneamente la representación parcialmente confocal y la representación en el campo
15 amplio.

Preferentemente, como microscopio se utiliza un microscopio de Airy confocal, en el que el objeto es representado sobre un equipo detector que presenta varios píxeles y que resuelve una estructura de difracción de la representación parcialmente confocal, donde para representar en el campo amplio se utiliza una cámara de campo
20 amplio.

En este diseño, el microscopio de Airy es provisto de una cámara de campo amplio hacia la cual se dirige, por ejemplo, mediante un divisor de haz, un porcentaje de la radiación de la trayectoria de haces de la representación. La representación en el campo amplio y la representación parcialmente confocal se superponen aquí
25 preferentemente de manera lateral y vertical. En este diseño, es posible en particular tomar simultáneamente la representación parcialmente confocal y la representación en el campo amplio.

La presente invención se refiere además a un microscopio para la generación de una representación parcialmente confocal y de una representación en el campo amplio de un objeto, donde el microscopio comprende un equipo
30 detector para detectar la representación del objeto, un equipo estenopeico para proporcionar una representación parcialmente confocal y una toma en el campo amplio, un equipo de enfoque, el cual está configurado para ajustar un foco de la representación parcialmente confocal, y un equipo de control para dirigir el equipo estenopeico, el cual está conectado con el equipo detector. El microscopio representa el objeto a lo largo de una dirección z, que coincide con la dirección de la altura del objeto, con una función de borrosidad de imágenes de puntos. El equipo de
35 control está configurado para ejecutar el procedimiento, tal y como se ha descrito anteriormente.

El microscopio puede ser un microscopio de escaneo por láser, un microscopio de Airy, o un microscopio topográfico confocal. El microscopio puede comprender una fuente de luz que proporcione luz blanca o luz de una longitud de onda determinada, dependiendo de cómo sea ésta necesaria para la representación del objeto. El equipo detector
40 presenta detectores mediante los cuales la radiación incidente puede ser transformada en señales eléctricas, donde estas señales eléctricas son transmitidas al equipo de control.

El equipo estenopeico presenta preferentemente un estenopo mediante el cual el objeto puede ser representado de manera parcialmente confocal en el equipo detector. Se puede ajustar el tamaño del estenopo, de modo que
45 mediante el equipo estenopeico también se puede generar una representación en el campo amplio. De manera alternativa, el estenopo puede ser retirado de la trayectoria de haces de la representación, por lo que de este modo se puede representar una representación en el campo amplio. En el microscopio topográfico, están previstos preferentemente varios estenopos o retículas, los cuales están dispuestos sobre una plantilla que es movable lateralmente a través de la trayectoria de haces de la representación. A este respecto, los estenopos presentan
50 diferentes diámetros, o bien, las retículas presentan diferentes constantes de retícula.

El equipo de enfoque está configurado para ajustar el foco de la representación parcialmente confocal. Para ello, el equipo de enfoque puede presentar una óptica mediante la cual se pueda modificar la posición del plano focal sobre el objeto. Como alternativa, el equipo de enfoque puede mover el objeto en la dirección z y modificar así la posición
55 del plano focal de la representación. Por último, depende únicamente de un desplazamiento relativo entre el plano focal y el objeto.

El microscopio puede presentar además un equipo de posicionamiento, el cual está configurado para desplazar lateralmente la primera ubicación con respecto al equipo detector. El equipo de posicionamiento puede estar
60 realizado como un escáner mediante el cual el objeto pueda ser movido con respecto al equipo detector. De manera alternativa, la trayectoria de haces puede ser modulada para la iluminación del objeto de tal modo que así se pueda modificar la primera ubicación con respecto al equipo detector; esto está implementado, por ejemplo, en un microscopio de escaneo por láser.

65 Preferentemente, el equipo detector comprende un primer detector para la representación parcialmente confocal y un segundo detector para la representación en el campo amplio.

El equipo de control sirve en particular para dirigir los equipos mencionados anteriormente y para realizar el procedimiento descrito anteriormente. En particular, las ideas, formas de realización preferidas y las ventajas expuestas para el procedimiento son de aplicación análogamente en lo referente al microscopio.

5 Como es obvio, las características mencionadas anteriormente y las que aún se han de explicar a continuación son utilizables no sólo en las combinaciones indicadas, sino también en otras combinaciones o por separado, sin abandonar el contexto de la presente invención.

10 A continuación, la invención se explica aún más detalladamente a modo de ejemplo por medio de los dibujos adjuntos, que también divulgan características esenciales para la invención. Muestran:

Fig. 1 un microscopio de escaneo por láser como primera forma de realización de un microscopio para la realización de un procedimiento para la determinación de la altura de un objeto;

15 Fig. 2 una representación de bloques para ilustrar las etapas del procedimiento;

Fig. 3 una gráfica para representar la calibración del procedimiento;

20 Fig. 4 una gráfica para representar las intensidades utilizadas, determinadas y medidas para el procedimiento;

Fig. 5 un microscopio de Airy como segunda forma de realización de un microscopio para la realización del procedimiento; y

25 Fig. 6 un microscopio topográfico confocal como tercera forma de realización de un microscopio para la realización del procedimiento.

Un microscopio de escaneo por láser 10 sirve para representar por escaneo un objeto 12, donde en el microscopio de escaneo por láser 10 se puede realizar un procedimiento descrito a continuación para determinar la altura del objeto 12.

El microscopio de escaneo por láser 10 presenta una fuente de luz 14, un equipo detector 16, un equipo estenopeico 18, un equipo de enfoque 20, un equipo de posicionamiento 22, un equipo de control 24 y un divisor de haz 26.

35 La fuente de luz 14 es, por ejemplo, un láser, un diodo emisor de luz (LED) u otra fuente de luz monocromática, la cual emite luz de una longitud de onda que en el objeto 12 excita pigmentos fluorescentes para la emisión de luz fluorescente. La radiación generada por la fuente de luz 14 de una trayectoria de haces de iluminación 28 es dirigida hacia un divisor de haz 26, que está realizado como espejo dicróico. El divisor de haz 26 refleja la luz de la trayectoria de haces de iluminación 28 sobre el equipo de posicionamiento 22.

40 El equipo de posicionamiento 22 presenta un escáner, por ejemplo, dos espejos colgados de manera móvil, que no aparecen representados en la figura 1. Mediante el escáner, el equipo de posicionamiento 22 puede dirigir la trayectoria de haces de iluminación 28 hacia diferentes ubicaciones del objeto 12. La desviación de la radiación de iluminación es dirigida por el equipo de control 24, el cual está conectado con el equipo de posicionamiento 22. En particular, el equipo de posicionamiento 22 dirige la trayectoria de haces de iluminación 28 escaneando a través del objeto 12. Como alternativa, se ajusta una mesa de pruebas que soporte el objeto 12.

50 Desde el equipo de posicionamiento 22, la radiación de iluminación 28 llega al equipo de enfoque 20, que está realizado como objetivo. Mediante el equipo de enfoque 20, el foco de la trayectoria de haces de iluminación 28 sobre el objeto 12 es modificado en la dirección z. La dirección z coincide con la altura del objeto 12 y yace perpendicularmente a la dirección lateral del objeto 12, que está definida por la dirección x e y. El equipo de enfoque 20 presenta varias lentes móviles unas respecto de otras, que son accionadas, por ejemplo, mediante un electromotor. El equipo de enfoque 20 también está conectado con el equipo de control 24, de modo que el equipo de control 24 puede modificar el foco del microscopio de escaneo por láser 10. El foco coincide con una posición de medición z del microscopio de escaneo por láser 10. Desde el equipo de enfoque 20, la trayectoria de haces de iluminación 28 discurre hacia el objeto 12, que está fijado a un soporte de muestra 30.

60 Mediante el equipo de enfoque 20, el foco puede ser modificado a lo largo de la dirección z. Mediante el equipo de posicionamiento 22, el foco de la trayectoria de haces de iluminación 28 puede ser desplazado lateralmente en una dirección x y en una dirección y, las cuales son perpendiculares a la dirección z.

65 En el objeto 12 están previstos pigmentos fluorescentes, que son excitados mediante la radiación de iluminación y emiten luz en una trayectoria de haces de la representación 32. Si en el objeto 12 no hay presentes pigmentos fluorescentes, la radiación de iluminación es reflejada parcialmente del objeto 12 a la trayectoria de haces de la representación 32. La trayectoria de haces de la representación 32 se extiende en el trayecto inverso a la trayectoria de haces de iluminación 28 hasta el divisor de haz 26. Debido al hecho de que la luz fluorescente tiene una longitud

de onda diferente a la de la radiación de iluminación, la radiación de la trayectoria de haces de la representación 32 puede atravesar el divisor de haz 26 dicróico y llega al equipo estenopeico 18, el cual presenta un estenopo cuyo tamaño puede ajustarse. Como alternativa, en lugar del divisor de haz 26 dicróico, puede estar previsto un divisor de haz parcialmente reflectivo, en particular si la radiación de iluminación es reflejada por el objeto 12. En particular, el equipo estenopeico tiene un electromotor que modifica el tamaño del estenopo de manera continua o gradual. El equipo estenopeico 18 está conectado con el equipo de control 24, de modo que el equipo de control 24 ajusta el tamaño del estenopo.

El estenopo se encuentra en un plano de imagen intermedio de la trayectoria de haces de la representación 32. Pospuesto a él está el equipo detector 16, el cual presenta un detector para transformar la radiación de la trayectoria de haces de la representación 32 en señales eléctricas. Las señales eléctricas son transmitidas al equipo de control 24, el cual puede determinar a partir de ellas la intensidad de la radiación en la trayectoria de haces de la representación 32.

El microscopio de escaneo por láser 10 genera una representación parcialmente confocal a través de que el estenopo del equipo estenopeico 18 sea ajustado con un tamaño pequeño, por ejemplo, 50-300 % mayor que un estenopo que represente el objeto 12 con difracción limitada. Para la generación de una representación en el campo amplio, el estenopo del equipo estenopeico 18 es ampliado en mayor medida en comparación con la representación parcialmente confocal, de modo que la representación presenta principalmente proporciones en el campo amplio.

El procedimiento para accionar el microscopio de escaneo por láser 10 se expone mediante la representación de bloques de la figura 2. El procedimiento sirve para determinar la altura del objeto 12 en una primera ubicación del objeto 12. La primera ubicación puede ser una ubicación cualquiera del objeto 12. En particular, el procedimiento se repite en varias primeras ubicaciones, de modo que se podrían determinar varias alturas del objeto 12, a partir de lo cual se puede deducir la topografía del objeto 12.

El procedimiento comprende tres etapas esenciales: la etapa S1 sirve para la calibración de un factor de escala S_k , la etapa S2 sirve para la calibración de un factor de enlace V_k y la etapa S3 sirve para el cálculo de la altura de la primera ubicación.

En primer lugar, se explica la calibración del factor de escala S_k en la etapa S1. La calibración del factor de escala S_k puede producirse en el objeto 12 o en un objeto de calibración que presente en particular propiedades similares al objeto 12 en cuanto a la reflexión y a la dispersión de la luz. En el siguiente ejemplo de realización, se expone la calibración del factor de escala S_k en el objeto 12 en una ubicación de calibración que es un punto sobre el objeto 12. La ubicación de calibración es un ejemplo para la primera ubicación de calibración.

En la etapa S1.1, se toma una pila z a partir de varias representaciones parcialmente confocales de la ubicación de calibración. Las representaciones se realizan en el rango de profundidad de campo de la representación parcialmente confocal, donde el equipo estenopeico 18 ajusta un primer tamaño para el estenopo. Para cada representación parcialmente confocal se determina la intensidad, de modo que en la etapa S1.2 se obtiene una evolución de la intensidad $I_k(z)$ en dependencia de la posición de medición z del foco. Esto se representa en la figura 3 a modo de ejemplo. Por medio de la evolución de la intensidad $I_k(z)$, se puede determinar la intensidad de calibración máxima $I_{k,max}$ que se da en la posición del foco $Z_{k,max}$.

En la etapa S1.3, se determina la intensidad de calibración del campo amplio I_{kw1} , ajustándose el equipo estenopeico 18 en un segundo tamaño para el estenopo que es mayor que el primer tamaño. El segundo tamaño del estenopo es tal que domina la intensidad de la representación de campo amplio con la intensidad de la representación. El segundo tamaño es, por ejemplo, 5-10 veces mayor que el primer tamaño. En la etapa S1.4, se calcula el factor de escala S_k , que cumple la siguiente ecuación:

$$S_k = \frac{I_{k,max}}{I_{kw1}} \quad (1)$$

En la etapa parcial S2.1 de la etapa S2, se determina una función de borrosidad de imágenes de puntos PSF(z) en la dirección z del microscopio de escaneo por láser 10. Esta etapa no es necesaria si la función de borrosidad de imágenes de puntos PSF(z) ya es conocida para el microscopio de escaneo por láser 10. En la etapa S2.2, se lleva a cabo una representación parcialmente confocal de la segunda ubicación de calibración en un segundo objeto de calibración, que puede coincidir con el primer objeto de calibración, o en el objeto 12 en una segunda ubicación de calibración, que puede coincidir con la primera ubicación de calibración. El tamaño del estenopo se ajusta en el primer tamaño. El foco de la representación parcialmente confocal se encuentra en una posición de medición de calibración Z_{k1} , la cual se encuentra en el rango de profundidad de campo de la representación parcialmente confocal. Acto seguido, se determina una intensidad de calibración I_{k1} parcialmente confocal de la representación parcialmente confocal de la segunda ubicación de calibración en la posición de medición de calibración z_{k1} .

En la etapa S2.3, se efectúa una representación confocal de la segunda ubicación de calibración. El foco de la

representación confocal se encuentra también en la posición de medición de calibración z_{k1} . A continuación, se determina una intensidad de calibración I_{k1}^* confocal de la representación confocal de la segunda ubicación de calibración en la posición de medición de calibración z_{k1} . La representación confocal se produce a través de que el tamaño del estenopo del equipo estenopeico 18 sea ajustado de tal modo que coincida con el límite de difracción de la representación. La intensidad de calibración I_{k1}^* confocal coincide con la intensidad de la función de borrosidad de imágenes de puntos PSF(z) en la posición de medición de calibración Z_{k1} .

En la etapa S2.4, también se determina la intensidad de calibración del campo amplio I_{kw2} . Esto se realiza de manera análoga a la determinación de la intensidad de calibración del campo amplio I_{kw1} en la etapa S1.3.

El factor de enlace V_k se determina en la etapa S2.5 a partir de la intensidad de calibración I_{k1} parcialmente confocal, de la intensidad de calibración I_{k1}^* confocal y de la intensidad de calibración del campo amplio I_{kw2} de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$I_{k1} = I_{k1}^* + V_k \times I_{kw2} \quad (2)$$

A continuación, se explica cómo en la etapa S3 se determina la topografía en el microscopio de escaneo por láser 10 calibrado. Para ello, en la etapa S3.1 se representa la primera ubicación del microscopio de escaneo por láser 10 de manera parcialmente confocal, encontrándose el foco en una posición de medición z_{z1} , que se encuentra en el rango de profundidad de campo. A este respecto, el estenopo es ajustado en el primer tamaño. Acto seguido, se determina la intensidad I_1 parcialmente confocal. A partir de la intensidad parcialmente I_1 confocal, en la etapa S3.2 se calcula la intensidad I_1^* parcialmente confocal correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos PSF mediante el factor de enlace V_k y la ecuación (2) descrita anteriormente. La intensidad I_1^* correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos PSF se corresponde con la intensidad de la función de borrosidad de imágenes de puntos PSF en la posición de medición z_{z1} .

En la posición de medición z_{z1} , en la etapa S3.3 se realiza otra representación parcialmente confocal en la que el estenopo está modificado con respecto a la primera representación parcialmente confocal realizada. Para ello, el estenopo está realizado siendo ajustable su tamaño o se recambian los estenopos. A partir de esta otra representación parcialmente confocal con estenopo modificado, se puede calcular otra intensidad $I_{1,pin}$ parcialmente confocal.

Como se describió anteriormente, mediante el aumento del estenopo del equipo estenopeico 18, en la etapa S3.4 se genera una representación de la primera ubicación en el campo amplio y a partir de ella se determina la intensidad del campo amplio I_w . Mediante la ecuación (1) y el factor de escala S_k , se calcula la intensidad máxima I_{max}^* de la función de borrosidad de imágenes de puntos PSF.

A partir del factor de enlace V_k , de la intensidad máxima I_{max}^* esperada y de la intensidad I_1^* correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos PSF, en la etapa S3.5 se determina mediante la ecuación (2) una coordenada z_{zh} del foco, la cual coincide con la coordenada z de la intensidad máxima I_{max}^* de la función de borrosidad de imágenes de puntos PSF. Puesto que sólo se utilizan dos valores para la determinación, la determinación no es siempre unívoca, tal y como se indica en la figura 4 mediante las dos áreas en la dirección $z_{\Delta z1}$ y $z_{\Delta z1}'$. Mediante la otra intensidad $I_{1,pin}$ parcialmente confocal, se puede determinar ahora cómo es la evolución de la función de borrosidad de imágenes de puntos PSF, de modo que se puede fijar cuál de las distancias Δz_1 y $\Delta z_1'$ es la correcta, por lo que la posición de medición z_{zh} puede ser determinada de manera unívoca. La coordenada z_{zh} del foco se corresponde con la altura del objeto 12 en la primera ubicación. Las etapas S3.1 a S3.5 se repiten en cada una de las ubicaciones a medir, mientras que las etapas S1 a S2 sólo se efectúan una vez.

En la figura 5, se representa esquemáticamente una segunda forma de realización de un microscopio para la realización del procedimiento. En este caso, se utiliza un microscopio de Airy 100 cuya estructura esquemática coincide con el microscopio de escaneo por láser 10, a excepción de las siguientes diferencias representadas:

Un equipo de posicionamiento 122 del microscopio de Airy 100 no funciona mediante la desviación de la radiación de la trayectoria de haces de iluminación 28, sino mediante el movimiento del objeto 12 con respecto a la trayectoria de haces de iluminación 28 mediante un escáner, que forma el equipo de posicionamiento 122. El escáner mueve el soporte de muestra 30. No obstante, también se puede utilizar un equipo de posicionamiento 122 como el descrito con el microscopio de escaneo por láser 10. En este caso, el equipo de posicionamiento 122 también está conectado con el equipo de control 24, de modo que el equipo de control 24 puede ajustar el posicionamiento del objeto 12 con respecto a la trayectoria de haces de iluminación 28.

Un equipo detector 116 presenta varios píxeles que resuelven la estructura de difracción de la representación parcialmente confocal.

El modo de funcionamiento del microscopio de Airy 100 no difiere del modo de funcionamiento del microscopio de escaneo por láser 10 en lo referente al principio de determinación de la altura en la primera ubicación del objeto 12.

Únicamente difieren entre sí las generaciones de la representación parcialmente confocal y de la representación en el campo amplio.

5 Puesto que mediante el equipo detector 116 se puede resolver la estructura de difracción, las intensidades medidas por los píxeles de una única representación parcialmente confocal presentan la intensidad I_1 parcialmente confocal y la intensidad del campo amplio I_w . Por lo tanto, es posible determinar con una única representación parcialmente confocal las dos intensidades I_1 y I_w necesarias para el cálculo de la altura de la primera ubicación.

10 El procedimiento descrito anteriormente para la determinación de la intensidad I_1 parcialmente confocal (etapa S3.1) y de la intensidad I_1^* parcialmente confocal (etapa S3.2) correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos PSF se repite en una segunda posición de medición Z_2 , a partir de lo cual se obtiene la intensidad I_2 parcialmente confocal y una intensidad I_2^* parcialmente confocal correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos PSF. Otra representación parcialmente confocal con tamaño modificado del estenopo (etapa S3.3) no se efectúa en el microscopio de Airy 100, sino que la etapa S3.5 experimenta la siguiente modificación.

15 Se tienen sólo tres puntos de la función de borrosidad de imágenes de puntos PSF, esto es, las intensidades I_1^* y I_2^* correspondientes a la función de borrosidad de imágenes de puntos PSF y el valor máximo de la función de borrosidad de imágenes de puntos PSF, la intensidad I_{max}^* . Por medio de estos valores, se puede ajustar la PSF, cuya forma es conocida, de modo que se puede determinar la coordenada z_{Z_h} de la intensidad máxima I_{max}^* . Esta coordenada z_{Z_h} se corresponde con la altura del objeto 12 en la primera ubicación, de forma que la primera ubicación puede determinarse a partir de las dos representaciones parcialmente confocales en las posiciones de medición z_1 y Z_2 .

20 Por medio de la figura 6, se expone otra forma de realización de un microscopio. En la figura 6, se representa esquemáticamente un microscopio topográfico confocal 200, el cual difiere del microscopio de escaneo por láser 10 y del microscopio de Airy 100 únicamente en las siguientes diferencias:

30 El microscopio topográfico confocal 200 presenta análogamente al microscopio de Airy 100 un equipo de posicionamiento 222, que comprende también como escáner para el movimiento del soporte de muestra 30. En este caso, tampoco es decisivo el diseño del equipo de posicionamiento. Una fuente de luz 214 puede estar realizada como diodo emisor de luz (LED) o cualquier otra fuente de luz monocromática, pero también es posible la utilización de una fuente de luz blanca que genere luz en todo el rango visible, de modo que se ilumina el objeto 12 con radiación de iluminación en el rango de longitudes de onda visible.

35 Un equipo detector 216 presenta una primera cámara 216a, una segunda cámara 216b y un segundo divisor de haz 216c. El segundo divisor de haz 216c está realizado como espejo parcialmente reflectivo, el cual dirige el 50 % de la radiación de la trayectoria de haces de la representación 32 a la primera cámara 216a y el 50 % de la radiación de la trayectoria de haces de la representación 32 a la segunda cámara 216b. Un equipo estenopeico 218 está realizado como plantilla con varias retículas de diferente distancia de retícula, la cual es movable lateralmente a través de la trayectoria de haces de la representación 32.

45 Mediante el microscopio topográfico confocal 200, gracias al segundo divisor de haz 216c se puede generar simultáneamente una imagen en el campo amplio mediante la segunda cámara 216b, delante de la cual no hay dispuesto ningún estenopo, y una representación parcialmente confocal mediante la primera cámara 216a. En este sentido, el modo de funcionamiento coincide con el modo de funcionamiento del microscopio de Airy 100, ya que también en este caso se generan simultáneamente una representación parcialmente confocal y una representación en el campo amplio.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar la altura de un objeto (12) en una primera ubicación lateral del objeto (12) mediante un microscopio (10, 100, 200), el cual representa el objeto (12) con una función de borrosidad de imágenes de puntos (PSF) a lo largo de una dirección z que coincide con la dirección de la altura, el cual comprende las etapas
- representar el objeto (12) con el microscopio (10, 100, 200) en el campo amplio y determinar la intensidad del campo amplio (I_w),
 - calcular la intensidad máxima (I_{max}^*), esperada en la primera ubicación, mediante la multiplicación de la intensidad del campo amplio (I_w) con un factor de escala (S_k) predeterminado,
 - representar de manera parcialmente confocal el objeto (12) en la primera ubicación con el foco en una posición de medición (z_1) en la dirección z, donde, para la toma parcialmente confocal, se utiliza un equipo estenopeico (18, 118, 218) con una abertura que es mayor que el límite de difracción, y donde la representación parcialmente confocal fija un rango de profundidad de campo y el foco se encuentra en el rango de profundidad de campo, y determinar una intensidad parcialmente confocal (I_1) de la representación parcialmente confocal en la primera ubicación,
 - calcular la intensidad (I_1^*) correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos (PSF) en la primera ubicación mediante la determinación de la diferencia entre la intensidad parcialmente confocal (I_1) y el producto de la intensidad del campo amplio (I_w) con un factor de enlace (V_k) predeterminado,
 - calcular la coordenada z (z_h) del foco en la que la función de borrosidad de imágenes de puntos (PSF) es máxima, utilizándose una forma conocida previamente de la
 - función de borrosidad de imágenes de puntos (PSF), de la intensidad (I_1^*) calculada, correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos (PSF), y de la intensidad máxima (I_{max}^*) esperada calculada, y
 - utilizar la coordenada z (Z_h) como altura del objeto (12) en la primera ubicación.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el factor de escala (S_k) se determina a través de las siguientes etapas:
- generar una pila z mediante la representación parcialmente confocal repetida de una primera ubicación de calibración lateral de un primer objeto de calibración o del objeto (12) con diferentes focos, desplazados en la dirección z, y determinar las intensidades parcialmente confocales para cada una de las representaciones parcialmente confocales,
 - calcular la evolución de la intensidad en la dirección z en la primera ubicación de calibración y determinar la intensidad de calibración (I_{kmax}) máxima de la evolución de la intensidad en la primera ubicación de calibración,
 - representar la primera ubicación de calibración con el microscopio (10, 100, 200) en el campo amplio y determinar una primera intensidad de calibración del campo amplio (I_{kw1}) en la primera ubicación de calibración, y
 - calcular el factor de escala (S_k) como relación entre la intensidad de calibración (I_{kmax}) máxima y la primera intensidad de calibración del campo amplio (I_{kw1}).
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el factor de enlace (V_k) se determina a través de las siguientes etapas:
- representar de manera parcialmente confocal una segunda ubicación de calibración lateral de un segundo objeto de calibración o del objeto (12) con el foco en una posición de medición de calibración (Z_{k1}) en la dirección z, que se encuentra en el rango de profundidad de campo, y determinar la intensidad de calibración (I_{k1}) de la representación parcialmente confocal en la segunda ubicación de calibración,
 - representar de manera confocal la segunda ubicación de calibración con el foco en la posición de medición de calibración (Z_{k1}) y determinar una intensidad de calibración (I_{k1}^*) confocal de la representación confocal en la segunda ubicación de calibración,
 - representar la segunda ubicación de calibración con el microscopio (10, 100, 200) en el campo amplio y determinar una segunda intensidad de calibración del campo amplio (I_{kw2}) en la segunda ubicación de calibración, y
 - calcular el factor de enlace (V_k) como relación entre la diferencia entre la intensidad de calibración (I_{k1}) parcialmente confocal y la intensidad de calibración (I_{k1}^*) confocal con respecto a la segunda segunda intensidad de calibración del campo amplio (I_{kw2}).
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la primera ubicación se representa con el microscopio (10, 100, 200) en el campo amplio y por que la intensidad del campo amplio (I_w) actual se determina en la primera ubicación.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por las etapas:
- representar de manera parcialmente confocal la primera ubicación con el foco en al menos dos posiciones de medición (z_1, z_2), distanciadas en la dirección z, que se encuentran en cada caso en el rango de profundidad de campo, y determinar intensidades parcialmente confocales ($I_{1,2}$) para cada representación parcialmente confocal en la primera ubicación,

- calcular las intensidades (I_1^* , I_2^*), correspondientes a la función de borrosidad de imágenes de puntos (PSF), en la primera ubicación mediante la determinación respectiva de la diferencia entre la intensidad parcialmente confocal (I_1 , I_2) respectiva y el producto de la intensidad del campo amplio (I_w) con el factor de enlace (V_k) predeterminado,
 - 5 - calcular la coordenada z utilizándose la forma de la función de borrosidad de imágenes de puntos (PSF), de las intensidades (I_1^* , I_2^*) calculadas, correspondientes a la función de borrosidad de imágenes de puntos (PSF), y de la intensidad máxima (I_{\max}^*) máxima esperada calculada.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que, para la generación de una determinación en vivo de la altura del objeto (12) en una segunda ubicación lateral del objeto (12), diferente con respecto a la primera ubicación, se representa la segunda ubicación de manera parcialmente confocal y por que, para calcular la coordenada z en la segunda ubicación, se tiene en cuenta la coordenada z (Z_h) del foco en la primera ubicación.
- 10
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por las etapas:
- representar de manera parcialmente confocal la primera ubicación con al menos dos estenopos diferentes y con el foco en una posición de medición (z_1) en la dirección z , que se encuentra en el rango de profundidad de campo, y determinar otra intensidad parcialmente confocal ($I_{1,\text{pin}}$) para la representación parcialmente confocal con el otro estenopo,
 - 20 - calcular la coordenada z utilizándose la forma de la función de borrosidad de imágenes de puntos, de la intensidad (I_1^*) calculada, correspondiente a la función de borrosidad de imágenes de puntos (PSF), de la otra intensidad parcialmente confocal ($I_{1,\text{pin}}$) y de la intensidad máxima (I_{\max}^*) esperada calculada.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que como microscopio (10, 100, 200) se utiliza un microscopio de escaneo por láser (10), donde, para representar de manera parcialmente confocal y representar en el campo amplio, se modifica el tamaño del estenopo.
- 25
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que como microscopio (10, 100, 200) se utiliza un microscopio de escaneo por láser (10), donde, para representar de manera parcialmente confocal y representar en el campo amplio, se prevén dos detectores detrás de un estenopo de diferente tamaño o donde, para representar en el campo amplio, se utiliza una cámara de campo amplio.
- 30
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que como microscopio (10, 100, 200) se utiliza un microscopio topográfico confocal (200), en el que se utiliza una retícula como estenopo, donde, para representar de manera parcialmente confocal, se utiliza una primera cámara con la retícula y, para representar en el campo amplio, se utiliza una segunda cámara.
- 35
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que como microscopio (10, 100, 200) se utiliza un microscopio de Airy confocal (100), en el que el objeto (12) es representado sobre un equipo detector (116) que presenta varios píxeles y que resuelve una estructura de difracción de la representación parcialmente confocal, donde la intensidad del campo amplio (I_w) y la intensidad parcialmente confocal (I_1) se determinan a partir de una toma, o donde, para representar en el campo amplio, se utiliza una cámara de campo amplio.
- 40
12. Microscopio para la generación de una representación parcialmente confocal de un objeto (12) y de una representación del objeto (12) en el campo amplio, que comprende
- un equipo detector (16, 116, 216),
 - un equipo estenopeico (18, 118, 218) para la representación parcialmente confocal y para la toma en el
 - 50 campo amplio,
 - un equipo de enfoque (20), el cual está configurado para ajustar una posición z de un foco de la representación parcialmente confocal, y
 - un equipo de control (24) para dirigir el equipo estenopeico (18, 118, 218), el cual está conectado con el equipo detector (16, 116, 216),
 - 55 - donde el microscopio (10, 100, 200) representa el objeto (12) a lo largo de una dirección z , que coincide con la dirección de la altura del objeto (12), con una función de borrosidad de imágenes de puntos (PSF),
 - donde el equipo de control (24) está configurado para ejecutar el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8.
- 60
13. Microscopio según la reivindicación 12, caracterizado por que el tamaño de un estenopo del equipo estenopeico (18) es ajustable.
- 65
14. Microscopio según la reivindicación 12, caracterizado por que el equipo detector (216) comprende un primer detector (216a) para la representación parcialmente confocal y un segundo detector (216b) para la representación en el campo amplio.

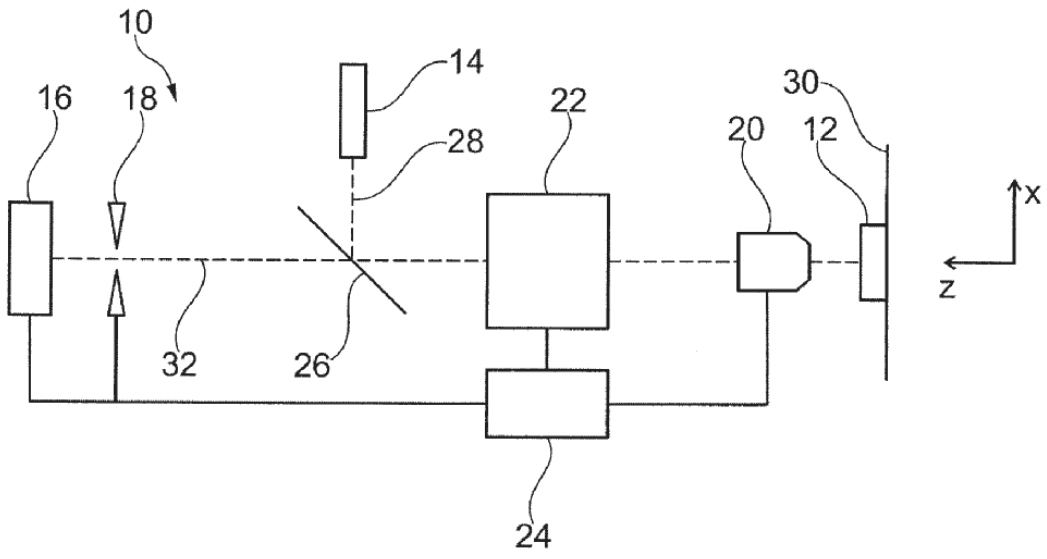


Fig. 1

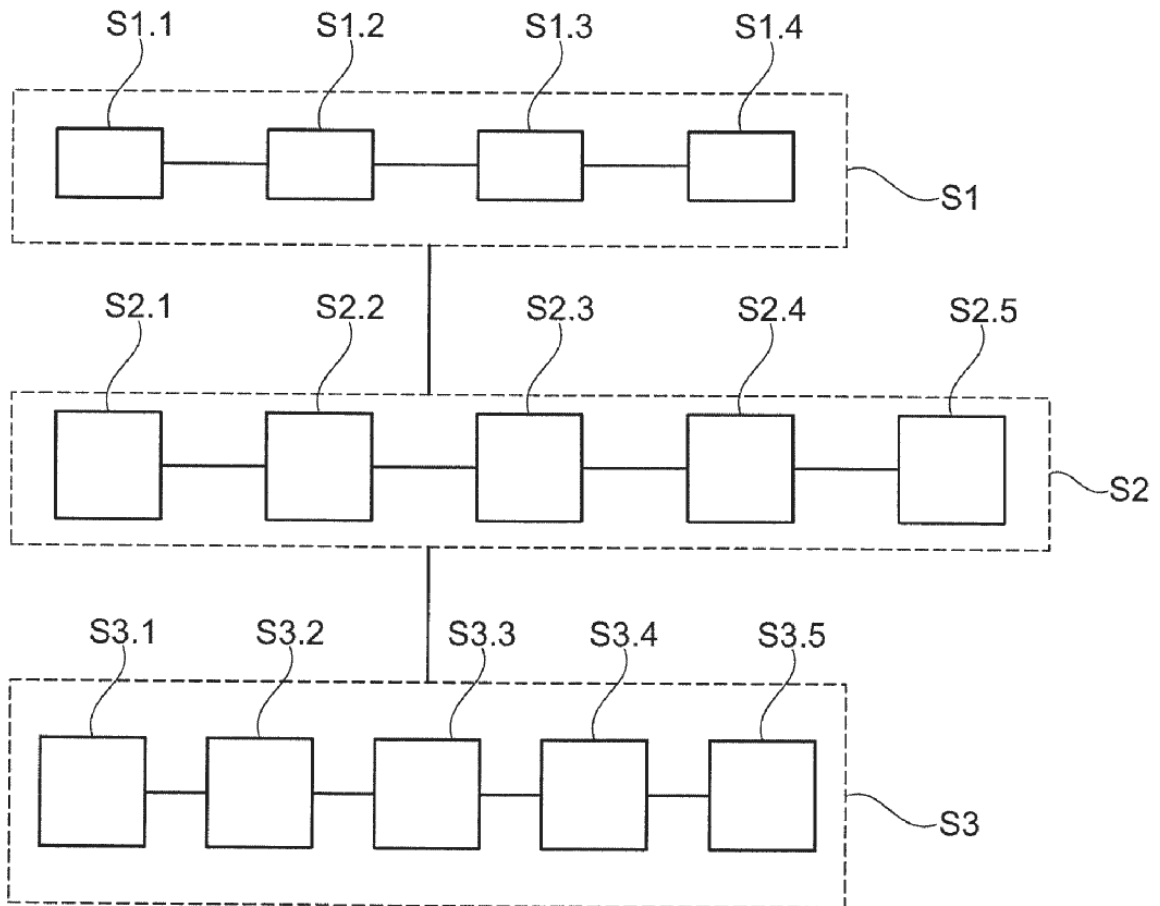


Fig. 2

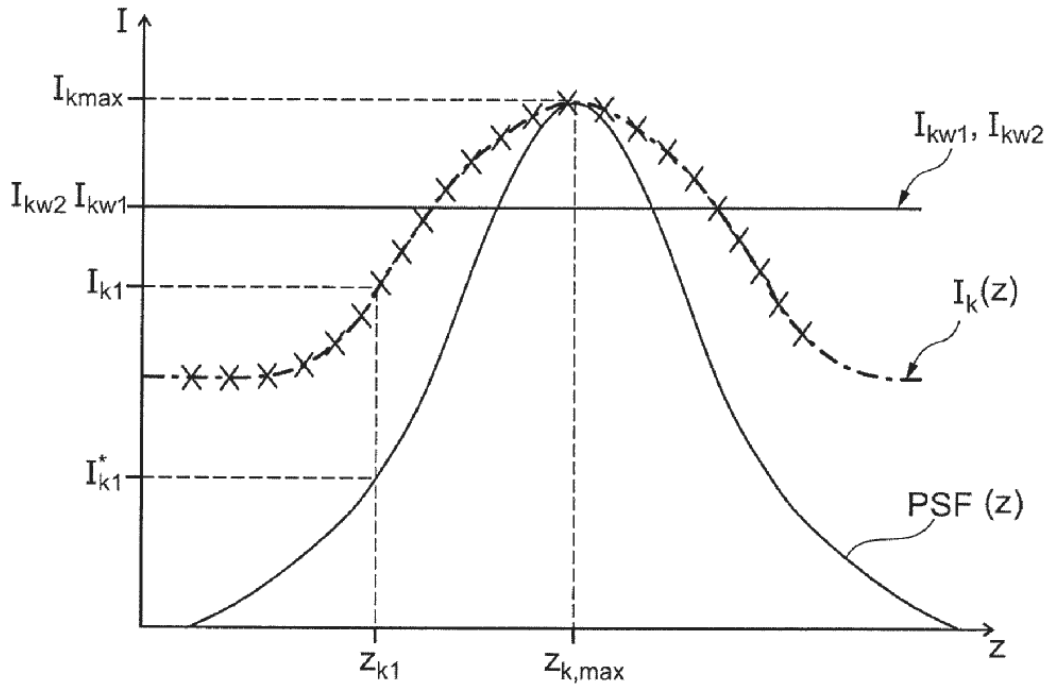


Fig. 3

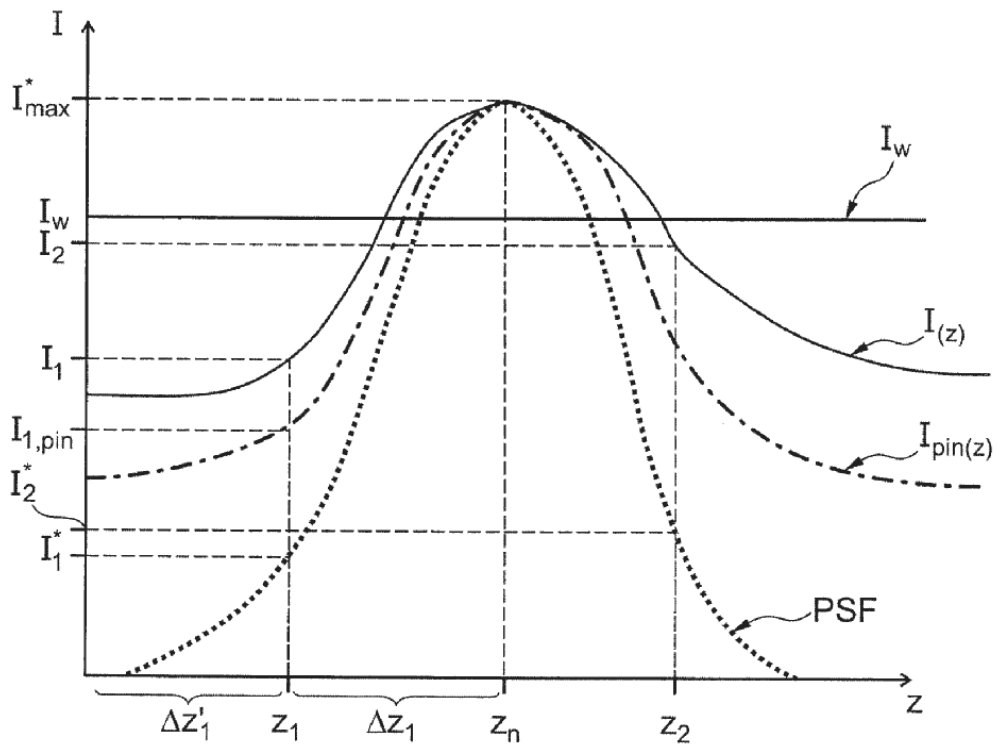


Fig. 4

