

Este es un breve resumen de algunas funciones de procesamiento y análisis para imágenes obtenidas por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

Es importante tener en cuenta que las funciones de procesamiento para corregir las imágenes pueden afectar o no las mediciones de interés. En líneas generales, se recomienda que hagan las correcciones con cuidado, que sepan qué es lo que le hace cada corrección a la imagen y que el procesamiento sea el mínimo posible. Siempre es preferible mejorar la imagen durante la adquisición (*i. e.* optimizando los parámetros del lazo).

Hay dos tipos de correcciones: correcciones de fondo que se hacen para solucionar algunas distorsiones comunes producidas por el barrido propio del microscopio, y filtros que se aplican para “embellecer” la imagen para presentar. En los modos de operación tradicionales de AFM (contacto o *tapping*), la imagen dimensional que se usa para cuantificar tamaños es la imagen de topografía o altura. Para que los datos de esta imagen sigan siendo cuantitativos (es decir, si quieren de la imagen cuantificar una altura o una distancia), se recomienda que sólo hagan las correcciones del fondo para corregir distorsiones ocasionadas por el barrido. Hay otras funciones del software como la escala de color y entre qué valores ponen esa escala que no cambian los datos sino sólo cómo se muestran, éstas se utilizan siempre para optimizar la visualización de las imágenes en función de las mediciones de interés.

A continuación se describen las funciones de procesamiento más comunes en el software libre de análisis *Gwyddion*. Por último se mencionan los artefactos más recurrentes en las imágenes.

1. Funciones para corrección de fondo

Existen algunas distorsiones o artefactos en las imágenes de AFM que son propias del principio de operación del mismo. Por ejemplo, como los escáneres o barredores AFM están fijos en un extremo y mueven la muestra (o el sensor respecto de la misma) en el otro, el extremo libre no se mueve en un plano. Las propiedades mecánicas del piezo así como la cinemática del movimiento resultan entonces en curvaturas de segundo o tercer orden respecto de un plano perfecto. Esta distorsión se denomina curvatura o *bow*, y es más evidente cuanto mayor es el área de barrido. Hay dos funciones de corrección de fondo que son típicamente las utilizadas para solucionar este tipo de distorsiones de fondo:

1.1 Corrección de fondo línea por línea (*Flatten*). Esta corrección se utiliza para remover artefactos debidos a la deriva (*drift*) vertical (*z*) del escáner, el *bow* o cualquier otra distorsión que resulte en un offset vertical entre las líneas de escaneo. Consiste en remover el offset en cada línea de barrido en la dirección rápida (*x*) ajustando un polinomio de cierto grado a la línea y restando dicho polinomio a la línea de barrido original. Es lo mismo que hace el microscopio mientras va barriendo cuando seleccionan cómo muestra los datos (en general el microscopio permite restarle una constante, una recta o un polinomio de 2do orden a la visualización online

de cada línea). En Gwyddion esta función se denomina *Align rows using various methods*, seleccionando el método polinomial. El grado del polinomio que se va a seleccionar es el mínimo necesario para corregir la distorsión del barrido.

Al aplicar esta corrección suele ser importante que excluyan las regiones que no quieren usar para el ajuste del background porque si no al aplicarla les quedan como "sombras" horizontales (Figura 1). Para excluir regiones con Gwyddion usen el ícono "Edit Mask", en la forma "add selection to mask". Esto les permite marcar con máscaras las zonas que quieren excluir, y después cuando apliquen la corrección tildan la opción de excluir las regiones seleccionadas. Lo mismo se hace para la corrección de fondo por plano.



Figura1. A. Imagen a la que se le aplicó la corrección de fondo por línea sin excluir las zonas con estructuras: la corrección se realiza bien en las zonas de la imagen en donde no están las estructuras, pero en donde están quedan el ajuste no es el correcto, lo que se evidencia en el perfil de alturas (der.) y como "sombras" en la imagen (izq.). **B.** Al excluir las zonas de la imagen con estructuras para hacer la corrección, ésta se hace correctamente. Tomado de [1].

1.2 Corrección de fondo por plano (*Planefit*). Esta corrección es análoga a la anterior pero con la diferencia que no se hace línea por línea sino que se hace un ajuste 2D de un plano polinomial para toda la imagen y luego resta este plano a la imagen. "Planefit" puede aplicarse calculando un ajuste polinomial de diferente orden a la imagen en las direcciones X o Y. Nuevamente se recomienda tomar el menor orden posible en ambas direcciones hasta que se corrija la imagen, típicamente no se necesita más que orden 3. En Gwyddion esta corrección se llama ***Remove polynomial background*** y permite ir viendo el plano que le va a restar y cómo va quedando la imagen.

Al igual que para el Flatten, las variaciones en la topografía de la imagen debidas a la muestra y no al fondo (si son grandes las diferencias en altura entre las estructuras de la muestra y el fondo) pueden alterar el ajuste del plano, dejando alguna inclinación no propia del barrido. Esto se puede remediar nuevamente usando máscaras ya sea para excluir zonas de la imagen que no son background (y que no quieren tener en cuenta para restarlo) o seleccionando solo las porciones de background de la imagen (las que deberían ser planas) para determinar el plano de ajuste.

2. Funciones de visualización de la imagen

2.1 Cambiar el valor mínimo de datos a cero, en Gwyddion ***Shift minimum data value to zero***. Esto se aplica siempre, porque el valor mínimo de altura en la imagen AFM no tiene sentido como valor absoluto, lo importante es el rango de los datos. Tomando como mínimo cero, la escala z es el rango de alturas medida. Aplicar esta función una vez restado el fondo.

2.2 Cambiar la escala de visualización z, en Gwyddion ***Stretch color range to part of data*** (se abre una ventana, ir a la segunda opción arriba de todo "Explicitly set fixed color range"), seleccionar (en el display muestra el histograma de alturas) el rango para ver mejor las estructuras de interés en la imagen. Esto se hace siempre, no cambia los datos sino sólo el rango de alturas a la que ajusta la escala de colores, es útil para ajustar la escala en función de las estructuras de interés en la imagen.

2.3 Escala pseudocoloreada z. Típicamente la escala z es una escala de grises, pero hay diferentes escalas de color que se pueden utilizar. En Gwyddion se elige haciendo click derecho sobre la escala del costado. La escala de colores típica de AFM es en tonos marrones-naranjas, en el Gwyddion es la escala gold, pero esto es sólo estético. Depende de qué quieran mostrar en la imagen a veces se usan otras escalas de colores.

2.4 Visualización 3D, en Gwyddion ***Display a 3D view of data***. Representa la imagen en 3D tomando los datos de altura.

2.5 Recorte de la zona de interés de la imagen, con la herramienta ***Crop data***. Es importante que si les interesa sólo una parte de la imagen, es decir si la van a recortar, hagan el recorte al iniciar el análisis y después las correcciones del fondo (así éstas se basan en la zona de interés y no en toda la imagen).

3. Funciones de análisis más utilizadas

3.1 Rugosidad (*Roughness*). Es un parámetro que da cuenta de las variaciones de altura en la topografía de la imagen. La cantidad utilizada generalmente para cuantificar la rugosidad de la topografía de un material es el valor de rugosidad RMS o S_q (*mean square roughness* o valor RMS de las irregularidades de altura), que se calcula según la ecuación 1:

$$S_q = \sqrt{\frac{\sum z_i^2}{N}}, \quad (1)$$

donde la suma se hace sobre los N valores de altura z_i de la imagen (o de una región seleccionada). En Gwyddion, se utiliza la función **Statistical quantities**, que calcula además de este parámetro (S_q) otras cantidades estadísticas.

3.2 Secciones. Con la herramienta **Extract profiles** de Gwyddion, se traza una línea en cualquier lugar de la imagen, y se obtiene un perfil (*cross-section*) vertical de altura vs distancia en esa línea (Figura 2). Resulta muy útil para medir distancias como ancho a mitad de altura de algunas estructuras, así como alturas relativas.

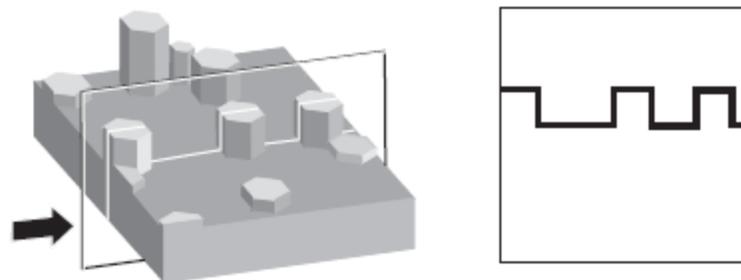


Figura 2. Esquema de selección de línea en la imagen AFM (izq.) a partir de la que se grafica el perfil de altura (der.). Tomado de [1].

3.3 1D PSD o Power Spectral Density. Representa en un gráfico la amplitud de la rugosidad en función de la frecuencia espacial. Los picos de esta curva indican las frecuencias especiales características de la muestra, lo que puede ser una medida del tamaño característico de alguna muestra periódica; por ejemplo de tamaño de granos en una muestra evaporada. La 1D PSD puede hacerse en sentido horizontal o vertical, o puede hacerse la PSD radial (una SD 2D integrada angularmente), que contiene la misma información que la PSD 1D si la muestra es isotrópica. En Gwyddion, se obtiene con la herramienta **1D Statistical functions**, quantity: PSDF (eligiendo la dirección horizontal o vertical), o radial PSDF.

4. Artefactos

Hay algunos artefactos que pueden deberse a problemas en el sensor de fuerza, como suciedad o rotura de la punta. Si bien en estos casos la imagen es estable, no será representativa de la

muestra a estudiar. Es importante entonces conocer estos artefactos y cómo lucen las imágenes, para no obtener a partir de ellas información errónea de las muestras.

4.1 Punta sucia o gastada. Si la punta se desgasta, o bien si se le pega alguna suciedad, las estructuras de la muestra se verán todas con la misma forma, como si fuera un sello que se repite (Figura 3). En este caso las dimensiones laterales de las estructuras estarán dominadas por la forma de la muestra, y sólo se puede obtener algún valor cuantitativo de los valores de altura (z).

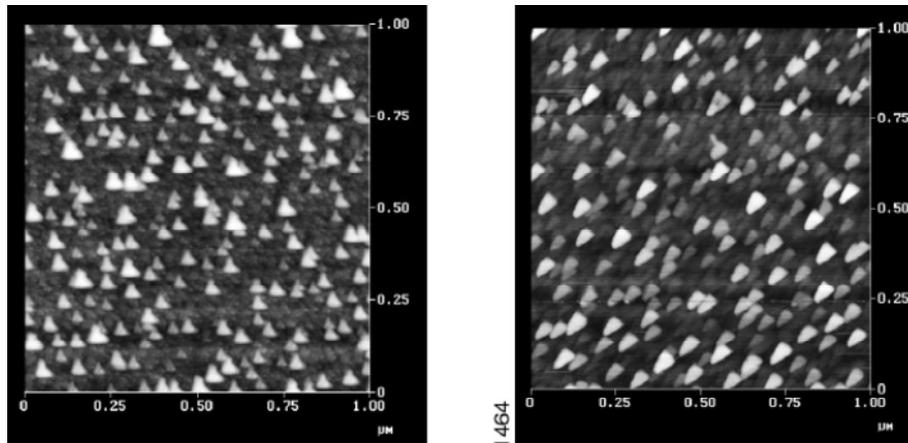


Figura 3. Ejemplos de imágenes tomadas con punta sucia o gastada. Tomado de [1].

4.2 Punta doble o múltiple. Si las estructuras se ven dobles o múltiples puede deberse a que el extremo final de la punta consiste en dos o más estructuras. En estos casos en las imágenes se ven las estructuras dobles o múltiples, todas con la misma orientación (Figura 4).

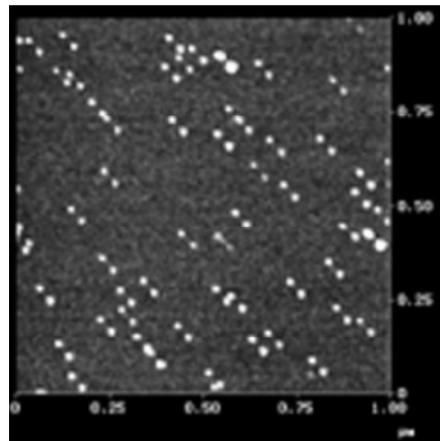


Figura 4. Ejemplo de imagen con punta doble. Tomado de [1].

Referencias

- [1] Apunte que contiene principios básicos de AFM y procesamiento de imágenes: *Scanning Probe Microscopy Training Notebook*, Digital Instruments, Veeco Metrology Group 2000.
- [2] Funciones de análisis de Gwyddion: <http://qwyddion.net/documentation/user-guide-en/>