

Diseño y Fabricación de un Microscopio Confocal de Disco Rotante a Bajo Costo

Lizeth T. González Vargas,¹ John W. Sandino del Busto,¹ and Juan D. Hernández Pineda¹

¹Departamento de Física,

Universidad Nacional de Colombia, Bogotá,
Colombia

Abstract

Se diseñó y fabricó un prototipo de microscopio confocal de disco rotante de bajo costo, orientado a aplicaciones de topografía de muestras, empleando principalmente estructuras impresas en 3D, piezas mecanizadas y un disco de *pinholes* elaborado mediante técnicas de litografía. El sistema desarrollado permitió obtener un primer prototipo funcional, integrado con un sistema de control que habilita la adquisición de imágenes.

Palabras Clave: Microscopio Confocal, Disco Rotante, Disco de Nipkow, Bajo Costo

I. INTRODUCCIÓN

Un microscopio confocal es un microscopio que utiliza una técnica específica para adquirir imágenes con alto contraste y resolución y que permite reconstruir imágenes en tres dimensiones. Esto lo hace utilizando un láser como fuente de iluminación y un “*pinhole*” o apertura circular, del orden de las micras, que elimina la luz desenfocada [1]. Este tipo de microscopio se utiliza ampliamente en diferentes campos como biología, medicina y ciencia de materiales. La mayoría permite la adquisición de imagen por fluorescencia, lo que permite obtener imágenes de diferentes estructuras de especímenes biológicos. En ciencia de materiales, se utiliza para adquirir mapas de topografía de muestras, al tomar diferentes imágenes en diferentes planos.

Sin embargo, el costo de un microscopio confocal puede variar entre los 100 y los 500 mil dólares, lo que limita su accesibilidad para laboratorios pequeños y para actividades de docencia. Esto motiva el desarrollo de alternativas más económicas y adaptadas a entornos educativos.

A. Reguilón et al. (2023) fabricaron un microscopio confocal de bajo costo (3500 USD) para su uso didáctico en laboratorios de pregrado que permite tomar medidas de espesor y de variaciones topográficas de láminas de portaobjetos [2]. J. Loose et al. (2025) desarrollaron un microscopio confocal que usa el dispositivo óptico PHR-803T que se encuentra en el lector de un Blu-ray para adquirir imágenes y detectar variaciones de temperatura con una resolución entre 1.5 y 15 μm [3]. A. Halpern et al. (2022) diseñaron un módulo de microscopio confocal de disco rotante de bajo costo (7200 USD) basado en una máscara de cromo que puede ser añadido a un microscopio de fluorescencia con iluminación láser, que muestra un fuerte desempeño en aplicaciones de

microscopía convencional y de super-resolución [4].

Este documento presenta el desarrollo de un microscopio confocal de tipo de disco rotante de bajo costo orientado principalmente a obtener imágenes de topografía de muestras. Un microscopio confocal de disco rotante se diferencia en que en lugar de tener un solo *pinhole*, contiene un disco de *pinholes* en una distribución de espirales de Arquímedes, este se conoce como disco de Nipkow o Petrán. Esto permite enfocar la iluminación sobre una región de la muestra en diferentes puntos al mismo tiempo, permitiendo la adquisición paralela, lo que aumenta su velocidad. Además de esto, la rotación del disco permite realizar un barrido sobre la región de la muestra sin necesidad de utilizar sistemas costosos como lo pueden ser espejos galvanométricos o posicionadores para mover el haz o la muestra respectivamente [5].

II. METODOLOGÍA

A. Diseño del Disco

El disco de *pinholes* consiste en un disco de vidrio de 10cm de diámetro recubierto con una película de plata. Los *pinholes* son regiones donde la plata fue removida. Este fue fabricado por medio de técnicas litográficas. El procedimiento de fabricación se explica en el documento titulado “Fabricación de un Disco de Nipkow por Técnicas Litográficas” escrito como parte de este trabajo de grado.

Los *pinholes* en el disco de Nipkow se encuentran distribuidos en un arreglo de espirales de Arquímedes. A pesar de que una sola espiral es suficiente para hacer un barrido, el uso de varias espirales permite obtener una sensibilidad menor frente al desplazamiento del disco respecto

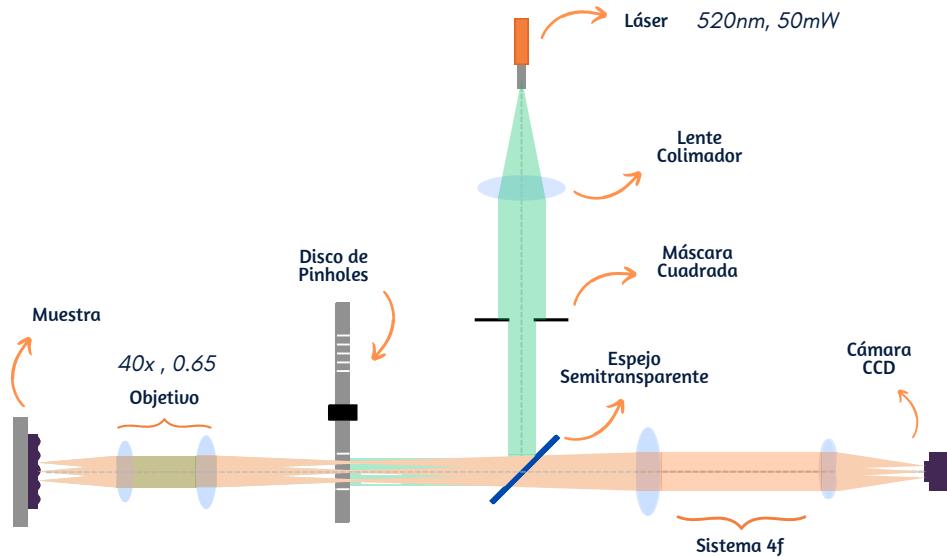


Figura 1: Diagrama del diseño del microscopio confocal de disco rotante. Se aprecian los diferentes componentes y los caminos ópticos de la luz que incide sobre la muestra (verde) y la luz que se refleja (naranja).

a su centro [4]. Un conjunto de n espirales está definido por la expresión matemática en coordenadas polares mostrada en 1, donde i hace referencia a la i -ésima espiral, r_{start} al radio inicial, n al número total de espirales y s al espaciamiento entre ellas.

$$r_i = r_{start} + \left(\frac{ns}{2\pi}\right) \left(\theta + \frac{2\pi i}{n}\right) \quad (1)$$

Trabajo previo ha establecido algunas pautas al momento de construir el disco para un microscopio confocal. Típicamente, el diámetro del pinhole se define para coincidir con el diámetro del primer mínimo del disco de Airy de la Función de Dispersión de Punto (PSF), el cual está dado por la expresión mostrada en (2). En el diseño del microscopio se decidió usar un objetivo de 40x de magnificación M y 0.65 de apertura numérica NA , y un láser de 520nm de longitud de onda λ . Por lo que el diámetro elegido para el pinhole fue de 38μm. Este tamaño permite un buen balance entre el rechazo de la luz desenfocada y la transmisión de la luz enfocada [6].

$$d = 1,22 \frac{\lambda M}{NA} \approx 38\mu m \quad (2)$$

Otro parámetro a considerar es la distancia de separación s entre espirales. Esta se elige comúnmente entre 3 y 10 veces el diámetro del pinhole para que la fracción del disco que contenga huecos se encuentre entre el 1 y el 10%, ya que esto da un buen balance entre la cantidad de luz transmitida y la separación de los pinholes, lo que permite una baja superposición de la luz que alcanza a llegar a un pinhole vecino [7].

Además de esto, como se dijo anteriormente, el uso de más de una espiral permite obtener una sensibilidad menor respecto al desplazamiento del disco respecto al centro; entre mayor sea la cantidad, menor es la sensibilidad [4]. Aun así, el incremento radial de pinholes sucesivos en una espiral no debe exceder la mitad de la anchura a media altura (FWHM) de la PSF para cumplir el criterio de Nyquist [4]. Este incremento radial está dado por la expresión mostrada en 3 donde r_{avg} es el radio promedio de la posición de la espiral. Para un número total de espirales n igual a 32 y una separación s de cinco veces el diámetro del pinhole (190μm) y tomando un radio promedio de 3,5cm ,el incremento es aproximadamente 5,3μm.

$$\Delta r \approx \frac{ns^2}{2\pi r_{avg}} \approx 5,3\mu m \quad (3)$$

El valor del FWHM se calcula con la expresión mostrada en 4. Este depende de la longitud de onda λ utilizada y de la apertura numérica del objetivo NA . La mitad del valor calculado es 204nm, valor que en el plano imagen conjugado, donde se ubica el disco, equivale al mismo multiplicado por la magnificación, es decir ,8,2μm [5] ,que se mantiene mayor al valor del incremento radial. Lo que significa que 32 espirales separadas 190μm es una elección adecuada.

$$FWHM = 0,51 \frac{\lambda}{NA} \approx 408nm \quad (4)$$

$$\frac{1}{2} FWHM \approx 204nm$$

$$\frac{1}{2} FWHM_{disk plane} \approx 8160nm = 8,2\mu m \quad (5)$$

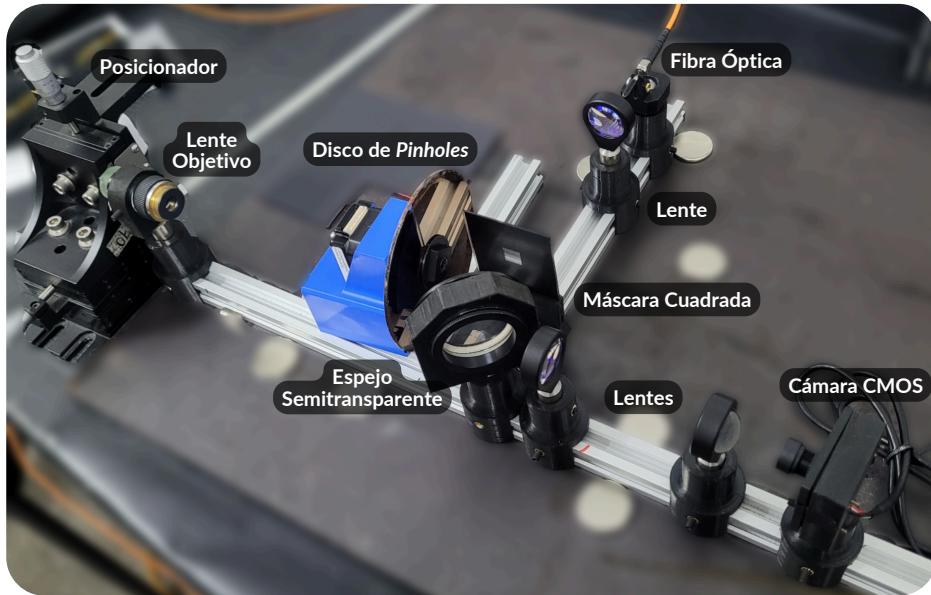


Figura 2: Montaje del microscopio confocal de disco rotante: se observan los diferentes componentes ubicados sobre rieles de aluminio.

B. Diseño del Microscopio

En la figura 1 se muestra el diagrama del diseño del montaje del microscopio. Como fuente de iluminación se utiliza un láser de 520nm de longitud de onda y una potencia máxima de 50mW . Este se acopla al sistema por medio de una fibra óptica multimodo que se establece para un perfil de intensidad de tipo "top-hat". El haz sale divergente de la fibra, por lo que se utiliza una lente positiva de 40mm de foco para colimarlo a un tamaño aproximado de 19mm . Luego se recorta el haz colimado al pasar a través de una máscara cuadrada de 1cm de lado y se hace incidir en un espejo semitransparente 50:50 que refleja la mitad del haz hacia el disco de *pinholes*, el cual es rotado por medio de un motor de paso NEMA. La luz pasa a través de los *pinholes*, los cuales son enfocados sobre la muestra por medio de un objetivo 40x, 0.65 de apertura numérica y 160mm de longitud de tubo.

La muestra refleja la luz enfocada, esta pasa por el objetivo el cual forma la imagen en el plano del disco, luego mitad de la señal pasa a través del espejo semitransparente, es colimada por un lente de 60mm de foco y luego es demagnificada por medio de otra lente de 40mm de foco para ajustar el tamaño al tamaño del sensor, el cual es una cámara CCD de modelo IMX179.

C. Diseño del Sistema de Control

Para el control del dispositivo se diseñó un sistema de control que permite controlar el motor y la cámara. En la figura 3 se muestra su arquitectura. Este integra

el control de un motor paso a paso (con driver TB6560 vía Arduino) y la captura de imágenes con una cámara USB desde una única interfaz en Python. Permite conectar/desconectar dispositivos, ajustar la velocidad del motor (0–300 RPM), mostrar vídeo en vivo, capturar series de imágenes con exposición manual y aplicar operaciones como promediado o suma para mejorar la señal, guardando resultados con marcas de tiempo.

Para el motor, usa pyserial para la comunicación serial con el Arduino. Para la cámara emplea opencv-python (OpenCV) para detección, captura y visualización y numpy para el procesamiento de imágenes (promedio y suma). También se utilizan utilidades estándar de Python como datetime para los nombres de archivo y el manejo de tiempos.

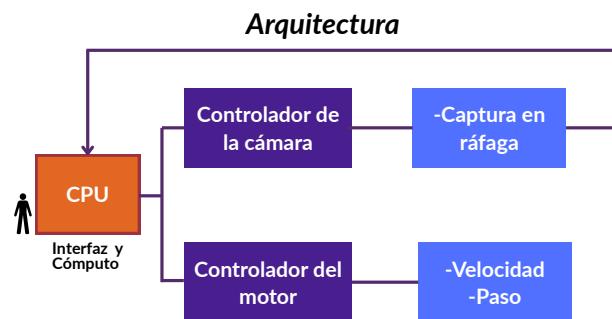


Figura 3: Diagrama del sistema de control desarrollado.

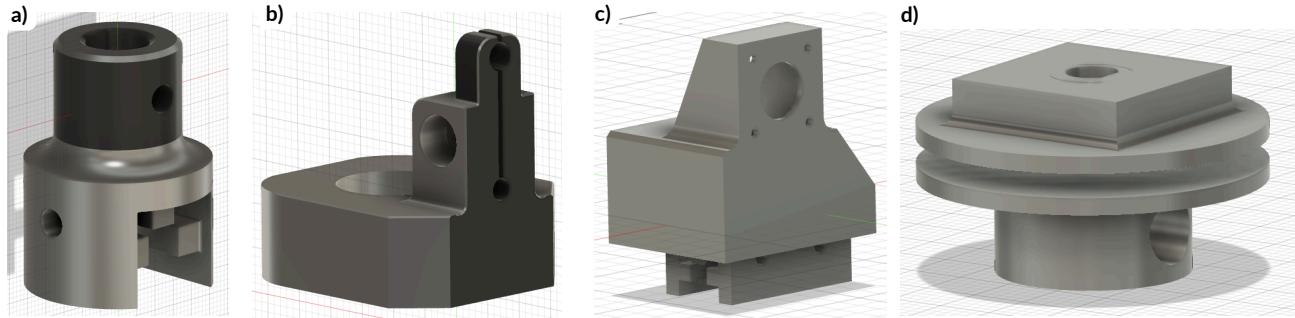


Figura 4: Diseño 3D de diferentes piezas utilizadas en el montaje. Se observan los modelos de: a) el soporte de los postes, b) el soporte de la fibra óptica, c) el soporte del motor y d) el acople del disco al motor.

III. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En la figura 2 se observa el montaje final construido. Este se montó sobre rieles de aluminio. Los soportes que sostienen la mayoría de los elementos y el acople del disco al motor fueron modelados para ser acoplados al riel y se imprimieron utilizando PET como material. Otras piezas, como los postes ubicados dentro de los soportes y las monturas del espejo, el objetivo y la cámara, fueron mecanizadas. Como posicionador de la muestra se utilizó, para el primer diseño, un posicionador mecánico. En la figura 4 se muestran los modelos 3D de algunas de las piezas diseñadas. Para acoplar los elementos al riel se diseñaron los soportes de postes mostrados en a). Estos presentan en su base la geometría del riel de aluminio para permitir su montaje y cuentan con dos orificios inferiores, en los cuales se incrustaron insertos térmicos que permiten fijar la pieza a la base mediante tornillos. Además, uno de sus laterales incorpora un orificio para sujetar el poste mecanizado en acero, sobre el cual se montan los diferentes elementos ópticos. En (b) se observa el soporte de la fibra, cuyo diseño se inspira en el soporte comercial para fibra óptica de Thorlabs. En (c) se muestra el soporte del motor NEMA, también adaptable al riel, y en (d) las dos piezas que permiten acoplar el disco al eje del motor.

Se realizó una primera prueba utilizando como muestra un espejo. Luego de alinear todo el sistema y con el disco estático, se adquirió una imagen de la muestra para comprobar que los *pinholes* estuviesen siendo correctamente enfocados sobre ella. En la figura 5 se muestra la imagen adquirida. Se observa efectivamente la reflexión de *pinholes* enfocados en el espejo, se ven tres zonas verticales donde se ven mejor enfocados. Se cree que esto puede ser causa de la topografía del espejo, aun así es necesario realizar más pruebas para confirmarlo.

Además de esto, se observa un cambio de intensidad que se supone pudo ser ocasionado por iluminación no uniforme causada por la fibra óptica multimodo utilizada o por algún problema con la alineación o el foco.

Al haberse fabricado el disco con un recubrimiento de plata, el disco es bastante reflectivo, por lo que, como primera solución, se decidió inclinarlo a un pequeño ángulo para que así la luz reflejada no llegase al sensor y afectase la imagen; esta puede ser otra causa del cambio de intensidad. Se planea realizar más pruebas para determinar la razón.

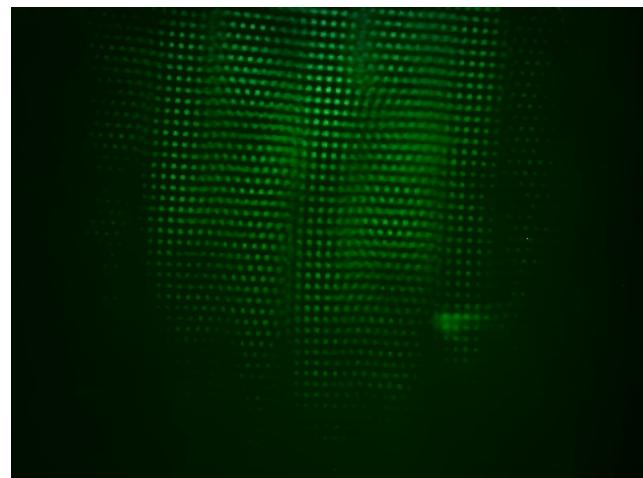


Figura 5: Imagen obtenida de los *pinholes* reflejados en un espejo.

IV. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Se diseñó y ensambló un microscopio confocal de disco rotante con un costo final total de aproximadamente 3000 USD, utilizando un disco de *pinholes* fabricado por técnicas litográficas. Además, se implementó un sistema de control que permite la adquisición y generación de imágenes. Se obtuvo una primera imagen que confirma el enfoque de los pinholes sobre la muestra.

Como trabajo a futuro, se iniciarán pruebas de adquisición de imagen y se resolverán los problemas obtenidos. Además, se caracterizarán la resolución y las limitaciones del sistema para así considerar la mejora de los componentes. También se implementará en el montaje un sistema de posicionamiento de la muestra que se añadirá al sistema de control.

V. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Nacional y, en especial, al profesor Ricardo Amézquita, así como a su equipo de investigación de la empresa *Combustión Ingenieros*, Jefferson, Jorge, Óscar y Andrés, por el apoyo brindado y por facilitar los equipos necesarios para la fabricación del disco. También extendemos nuestro agradecimiento a los trabajadores del taller por su colaboración en la fabricación de las piezas, y a los demás integrantes del grupo de

microscopía electrónica por su asistencia.

REFERENCIAS

- [1] T. R. Corle and G. S. Kino, *Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems*. Academic Press, 1st ed., 1996.
- [2] A. Reguilón, W. Bethard, and E. Brekke, “A low-cost confocal microscope for the undergraduate lab,” *American Journal of Physics*, Jan. 2023.
- [3] J. Loose, S. H. Hales, J. Kendell, I. Cutler, R. Ruth, J. Redd, S. Lino, and T. Munro, “An Inexpensive, 3D-Printable, Arduino- and Blu-Ray-Based Confocal Laser and Fluorescent Scanning Microscope,” *Metrology*, vol. 5, Jan. 2025.
- [4] A. R. Halpern, M. Y. Lee, M. D. Howard, M. A. Woodworth, P. R. Nicovich, and J. C. Vaughan, “Versatile, do-it-yourself, low-cost spinning disk confocal microscope,” *Biomedical Optics Express*, vol. 13, Feb. 2022.
- [5] D. K. Toomre, M. F. Langhorst, and M. W. Davidson, “Introduction to spinning disk confocal microscopy.” <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spinningdisk/introduction.html>, 2009. Accedido: Dic-2025.
- [6] D. T. Fewer, S. J. Hewlett, E. M. McCabe, and J. Hegarty, “Direct-view microscopy: experimental investigation of the dependence of the optical sectioning characteristics on pinhole-array configuration,” *Journal of Microscopy*, vol. 187, July 1997.
- [7] J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer, 3rd ed., 2006.