

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 869**

51 Int. Cl.:

G03H 1/08 (2006.01)

G02B 1/10 (2006.01)

G03H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2009 E 09783710 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2014 EP 2329324**

54 Título: **Método para investigar objetos nanométricos utilizando microscopía holográfica**

30 Prioridad:

03.10.2008 EP 08165820

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

14.05.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES (100.0%)
Avenue Franklin Roosevelt, 50, CP 161
1050 Brussels , BE**

72 Inventor/es:

DUBOIS, FRANK

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 460 869 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

Método para investigar objetos nanométricos utilizando microscopía holográfica.

5 **Campo de la invención**

La presente invención está relacionada con un microscopio holográfico y un método para investigar objetos nanométricos.

10 **Antecedentes de la invención**

La microscopía holográfica digital (MHD), donde el holograma se graba con una cámara CCD, constituye una herramienta eficaz para reenfoque, corte tras corte, las imágenes de profundidad de una muestra gruesa a través de la reconstrucción digital. La MHD también brinda imágenes de contraste de fase cuantitativa con numerosas aplicaciones como el estudio de muestras biológicas. La capacidad de reconstrucción en profundidad hace que la MHD sea muy poderosa para implementar la velocimetría tridimensional. Como la holografía digital brinda la amplitud compleja, se implementaron procesos poderosos, como el enfoque automatizado, la compensación por aberración, el reconocimiento de patrones tridimensionales, el procesamiento de segmentación y de bordes. La capacidad de la MHD para registrar, en un corto tiempo, el volumen de información que puede seguir siendo procesado posibilita la investigación de fenómenos rápidos con distorsiones temporales reducidas. Esta es una ventaja decisiva en aplicaciones de velocimetría tridimensional. Con este propósito, se investigaron distintos enfoques, incluido el uso de holografía en línea. En configuraciones de campo brillante, cabe esperar reconstrucciones contrastadas de partículas por MHD cuando el tamaño de las partículas exceda la resolución del sistema. Aun así, en algunas circunstancias, esta condición es difícil de cumplir debido a consideraciones prácticas. En el caso de las partículas con tamaños inferiores al micrón, el uso de lentes de alta apertura numérica es frecuentemente poco realista debido a la pequeña distancia de trabajo y, en algunos casos, debido al uso de lentes de inmersión en aceite. Más aun, con el uso creciente de objetos nanométricos para numerosas aplicaciones, existen casos en que las partículas que queremos detectar son de menor tamaño que el límite de resolución óptica el cual es de aproximadamente 300 nm. Por lo tanto, es necesario que los sistemas ópticos puedan detectar rápidamente partículas u objetos menores al límite de resolución de la microscopía óptica.

En la tesis doctoral de J.A. Domínguez Caballero "Toma de imágenes digitales holográficas de especies acuáticas", se divulga un sistema de imágenes holográficas de campo oscuro. El sistema divulgado no da ningún indicio acerca de la optimización de la detección de objetos de menor tamaño que la resolución del sistema óptico.

35 **Objetivos de la invención**

El objetivo de la invención consiste en brindar un método de detección de un objeto tridimensional a través de un microscopio holográfico que mejore los métodos de las técnicas anteriores.

Más particularmente, la invención intenta brindar un método de operación de un microscopio holográfico de transmisión (MH) para detectar objetos tridimensionales de menor tamaño que el límite de resolución típico de la microscopía óptica (300 nm).

45 **Compendio de la invención**

La invención está relacionada con un método para detectar un objeto tridimensional por medio de un microscopio holográfico, siendo dicho objeto tridimensional menor que la resolución óptica del microscopio holográfico; el método comprende los siguientes pasos:

- 50 - Proporcionar una fuente lumínica que produzca un primer haz, siendo dicha fuente lumínica al menos parcialmente coherente;
- 55 - Dividir dicho primer haz en un haz objeto y un haz de referencia a través de un divisor del primer haz;
- Producir una imagen de la fuente lumínica en un plano de la imagen de la fuente lumínica a través de un primer objetivo de microscopio, en el camino óptico del haz objeto;
- 60 - Colocar el objeto tridimensional que se pretende detectar en una celda objeto en el camino óptico del haz objeto, entre el referido divisor del primer haz y el referido primer objetivo del microscopio;
- Recombinar el haz objeto y el referido haz de referencia para formar un haz recombinado a través de medios ópticos;
- 65 - Colocar un tope óptico en el referido plano de la imagen de la fuente lumínica del objetivo del microscopio en el eje óptico de dicho objetivo.

- Enfocar el referido haz combinado en los referidos medios de registro con los medios de enfoque;
 - Registrar las señales interferométricas producidas por la interacción entre el haz de referencia y el haz objeto a través de un medio de registro,
 - reconstruyendo una imagen tridimensional del objeto tridimensional que se pretende detectar a partir de la referida señal interferométrica, detectando de esta manera el referido objeto tridimensional.
- 10 Por imagen tridimensional, se entiende la representación tridimensional del objeto tridimensional.
- Por resolución óptica (RO) del microscopio holográfico, se entiende la resolución óptica del primer objetivo del microscopio. La resolución óptica se define como la capacidad de un sistema de imágenes para determinar detalles en el objeto cuya imagen se está captando. Se utiliza el criterio de Rayleigh en la descripción actual, el cual representa la menor distancia entre dos puntos en el plano del objeto que es distinguible en el plano de la imagen. Para microscopios, se puede estimar según la fórmula $RO=0,61 \cdot \lambda/AN$, donde AN es la apertura numérica del objetivo y λ es la longitud de onda de la luz.
- 20 De acuerdo con realizaciones preferidas específicas, el método de la invención actual divulga una combinación adecuada de las siguientes características o al menos una de ellas:
- El tope óptico es mayor que el tamaño de la imagen de la fuente lumínica en el plano de la imagen de la fuente lumínica del referido objetivo del microscopio;
 - El método incluye el paso de insertar un atenuador óptico en el camino óptico del haz de referencia;
 - Los medios ópticos se componen de lo siguiente:
 - Un segundo divisor de haz;
 - Un primer espejo ubicado para dirigir el haz de referencia hacia el mencionado segundo divisor de haz;
 - Un segundo espejo ubicado para dirigir el haz objeto hacia el mencionado segundo divisor de haz;
 - La función de transferencia óptica del camino óptico del haz objeto sin el espécimen y sin el tope óptico y del haz de referencia sin el atenuador óptico son esencialmente equivalentes. En la presente invención, por función de transferencia óptica se entiende una función que aplicada a la fase y la amplitud en un plano de entrada, calcula la fase y la amplitud en un plano de salida.
 - La longitud total del camino óptico tanto del haz objeto como del haz de referencia son esencialmente iguales.
 - El método comprende el paso de compensar la diferencia de caminos ópticos entre el haz de referencia y el haz objeto, y de producir, en ausencia del espécimen y del tope óptico, esencialmente la misma dependencia de fase espacial del haz objeto y del haz de referencia en los medios de registro;
 - El método comprende el paso de insertar un segundo objetivo de microscopio en el camino óptico del referido haz de referencia;
 - Una celda de referencia similar a la celda objeto pero que no incluya el espécimen que se estudiará, o un material transparente de un adecuado grosor y una adecuada composición se inserta en el camino óptico del haz de referencia, preferentemente cerca del plano focal frontal del referido segundo objetivo de microscopio;
 - La fuente lumínica es parcialmente coherente espacialmente;
 - La fuente lumínica es parcialmente coherente temporalmente;
 - El medio de registro es una cámara de vídeo, preferentemente, dicha cámara de vídeo es una cámara CCD o CMOS.
 - La cámara de vídeo está conectada a medios de procesamiento y de análisis de imagen computarizados para procesar las referidas señales interferométricas;
 - La reconstrucción de la imagen tridimensional se obtiene volviendo a enfocar corte tras corte el volumen experimental en el cual el objeto tridimensional se encuentra distribuido para poder reconstruir una imagen tridimensional.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa a un microscopio holográfico de campo oscuro de acuerdo con esta invención.

5 La figura 1a representa una imagen de intensidad de campo brillante registrada en foco de acuerdo con la tecnología anterior (zona de 100x100 recortada de la imagen original)

10 La figura 1b representa una imagen de intensidad de campo oscuro registrada en foco. La zona corresponde a la de la figura 1a.

15 La figura 1c representa una imagen de intensidad de campo oscuro con una distancia de desenfoque de 60 μm. La zona corresponde a la de la figura 1a.

La figura 1d representa una imagen de intensidad de campo oscuro de holografía digital reenfocada del holograma digital desenfocado por una distancia de 60 μm. La zona corresponde a la de la figura 1a.

Descripción detallada de la invención

20 Para resumir las ventajas brindadas por la integración de campo oscuro en la MHD, consideraremos primero la detección de un objeto de menor tamaño que el límite de resolución de un sistema de imágenes trabajando en modo de transmisión.

25 Para registrar un holograma digital, un haz de referencia interfiere con un haz objeto en el sensor de una cámara. La mejor imagen de un objeto que se puede esperar con una reconstrucción holográfica digital es la imagen del objeto que debería registrarse cuando está a distancia focal.

30 Por lo tanto, analizaremos este proceso de imagen. Consideramos una partícula opaca circular de diámetro d iluminada en transmisión. La imagen se transmite a través de una lente limitada por una apertura circular de diámetro D , y supondremos que d es de menor tamaño que el límite de resolución del sistema óptico definido por el criterio de Rayleigh.

35 La distancia entre el plano del objeto y la lente se denominará a mientras que la conjugada entre la lente y el plano de la imagen es b . El eje óptico se denominará z mientras que los ejes x e y son perpendiculares a z . La posición de la partícula se encuentra en el punto (x_0, y_0) en el plano del objeto. En aras de la concisión, adoptaremos la notación de óptica de Fourier.

Considerando que la distribución de amplitud en el plano del objeto $u_0(x, y)$, la distribución de amplitud en el plano de la imagen $u_1(x, y)$ se obtiene aplicando un operador lineal T , $u_1(x, y) = T u_0(x, y)$, de forma que:

40
$$u_1 = BV \left[-\frac{a}{b} \right] Q \left[\frac{1}{a} \right] w(x, y) \left[1 - \left(\frac{D}{2\lambda} \right)^2 s(\text{Fcirc}) \left(\frac{(x-x_0)D}{2\lambda}, \frac{(y-y_0)D}{2\lambda} \right) \right] \quad (1)$$

45 donde B involucra todos los términos que no son relevantes a los efectos del tema que estamos tratando; $V[\]$ es el operador de escala definido por $V[a]g(x, y) = g(ax, ay)$ que expresa la ampliación del sistema óptico; s es el área de la partícula; (Fcirc) denota las transformaciones de Fourier de la apertura de la lente; λ es la longitud de onda; $Q[\beta]$ representa un factor de fase cuadrático definido por

$$Q[\beta] = \exp\{j(k\beta/2)(x^2 + y^2)\} \text{ con } k = 2\pi/\lambda \text{ y } j = \sqrt{-1}$$

50 y donde $w(x, y)$ es la amplitud luminosa del plano del objeto.

55 La ecuación (1) muestra que la imagen del objeto tiene la forma, con inversión de contraste, del impulso de respuesta del sistema óptico sobre un fondo luminoso. También vemos que la modulación de la imagen de la amplitud es multiplicada por el área s del objeto. Resulta que la modulación decrece junto con esta área y el contraste disponible se debilita rápidamente para partículas de menor tamaño que el límite de resolución. La modulación disminuye aún más cuando el objeto se desenfoca. Esto tiene dos consecuencias: las dinámicas disponibles para registrar la información del objeto se ven reducidas, y si el fondo experimenta ruido, como sucede prácticamente siempre, la señal disponible se corrompe mucho.

60 Por lo tanto, se espera que los objetos de menor tamaño que el límite de resolución del sistema óptico se vuelvan rápidamente indetectables. Las experiencias actuales demuestran que la pérdida de la habilidad de detección se produce rápidamente por debajo de la resolución del sistema óptico. Esto induce a colocar un sistema de campo oscuro integrado en un microscopio holográfico digital para mejorar las capacidades de detección.

El sistema que hemos implementado se describe en la figura 1.

El divisor de haces BS1 divide un haz lumínico, que puede ser total o parcialmente coherente. El haz transmitido, el haz objeto, ilumina el objeto 9 en la transmisión e incide en la lente L1 del microscopio. Se ubica un tope óptico 4 de manera que, sin el objeto 9, se bloquee el haz transmitido. Por el contrario, cuando existe un objeto 9, parte de la luz difractada no es bloqueada por el tope óptico e incide en el sensor de la cámara.

Por lo tanto, el par de lentes L1-L3 forman la imagen de campo oscuro del plano focal frontal de L1 en el CCD 5. El efecto del tope óptico 4 es el de remover el término constante en la ecuación (1). Suponiendo que el tope óptico perturba levemente la amplitud de imagen en el sensor, la ecuación (1) es:

$$u'_1 = B \left(\frac{D}{2\lambda a} \right)^2 sV \left[-\frac{a}{b} \right] Q \left[\frac{1}{a} \right] w(x,y) (F_{circ}) \left(\frac{(x-x_0)D}{2\lambda a}, \frac{(y-y_0)D}{2\lambda a} \right) \quad (2)$$

Como no hay más fondo, el aspecto importante es que se vuelve posible ajustar la sensibilidad del sistema de detección de tal manera que se utilice todo el rango dinámico del sistema de registro.

El haz reflejado por BS1, el haz de referencia, también se vuelve a direccionar sobre el sensor del CCD de tal manera que registramos el patrón de interferencia entre el objeto y el haz de referencia. Un filtro 7 de densidad neutral permite ajustar la proporción del haz para obtener un patrón de franjas de alto contraste.

El sistema se alinea sin un objeto y sin el tope óptico para obtener un patrón de interferencia para aplicar un método holográfico fuera de eje para computar la amplitud compleja del objeto. Una vez lograda la alineación, se coloca el tope óptico 4.

Al estar la amplitud compleja disponible a través de la MHD, un objeto, representado por la amplitud u_0 que se registra fuera de foco, se puede reenfoque computando la ecuación de propagación de Kirchhoff Fresnel en la distancia de desenfoque ε :

$$u_\varepsilon(x', y') = \exp(jk\varepsilon) F_{x',y'}^{-1} Q[-\lambda^2 \varepsilon] F_{u,v}^{-1} u_0(x, y) \quad (3)$$

Además de las capacidades de reenfoque proporcionadas por la MHD, existe otra ventaja adicional al usar la configuración de campo oscuro. Consideremos la amplitud de distribución de campo oscuro u'_1 de un objeto de menor tamaño que el límite de resolución. Para incrementar la distancia de desenfoque ε , la amplitud disminuye globalmente a razón de $1/\varepsilon$ mientras que la intensidad disminuye a razón de $1/\varepsilon^2$. Por lo tanto, la intensidad disminuye mucho más rápidamente que la amplitud.

Por tratarse de la amplitud actualmente brindada por la holografía digital, independientemente de sus capacidades de reenfoque, es posible detectar objetos desenfocados en un rango de distancias significativamente mayor que el de la toma de imágenes por intensidad.

Ejemplo

Para demostrar la viabilidad de la MHD de campo oscuro para detectar tridimensionalmente partículas de menor tamaño que el límite de resolución, insertamos partículas nanométricas inmersas en agua destilada desionizada entre una lámina de microscopio y una cubierta. Las partículas tienen un tamaño promedio de 150 nm con un ancho de 20 nm. La MHD está equipada con lentes microscópicas X10 (AN=0,3) que proporcionan un límite de resolución de 1,3 μm .

El campo de visión original es de 525 μm x 420 μm y se proyectó sobre un sensor CCD de 1280 x 1024 píxeles. Cabe destacar que el pico de tamaño de las partículas es 8 veces menor que el límite de resolución. Las imágenes de intensidad de las partículas fueron registradas en foco en campo brillante y campo oscuro (figura 1a, b). El holograma fue registrado en un campo oscuro con una distancia de desenfoque de 60 μm y reconstruido sobre esta distancia. Su imagen de intensidad puede verse en la figura 1c. La figura 1d muestra la intensidad de la imagen reenfocada por holografía digital.

Observamos que según lo esperado una gran parte de las partículas en la figura 1a tienen un bajo contraste en el campo brillante. El mejor contraste obtenido por algunas de ellas es debido al agrupamiento de las partículas. En la imagen de campo oscuro obtenida en la figura 1b, las partículas que son casi invisibles en la imagen de campo brillante pueden ser vistas con un buen contraste con respecto al fondo.

Esto confirma la capacidad de detección incrementada proporcionada por el sistema de campo oscuro. En la figura 1c, el desenfoque posibilita la detección de las partículas. La reconstrucción holográfica digital muestra la capacidad de reenfoque de las partículas, y se observa que esta imagen es muy parecida a la que se ha registrado en foco.

Esto demuestra la viabilidad de la holografía digital de campo oscuro para la detección tridimensional de partículas que pueden ser de mucho menor tamaño que el límite de resolución.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de detección de un objeto tridimensional a través de un microscopio holográfico, siendo dicho objeto tridimensional de menor tamaño que la resolución óptica del microscopio holográfico, el cual método está compuesto por los siguientes pasos:
- 10 - proporcionar una fuente lumínica que produce un primer haz lumínico (1), siendo dicha luz al menos parcialmente coherente;
 - 15 - dividir este primer haz lumínico (1) en un haz objeto (2) y un haz de referencia (6) a través de un divisor del primer haz (BS1);
 - 20 - producir una imagen de la fuente lumínica en el plano de la imagen de la fuente lumínica a través de un primer objetivo de microscopio (L1), en el camino óptico del haz objeto (2) donde, por resolución óptica del microscopio holográfico, se entiende la resolución óptica de dicho primer objetivo de microscopio.
 - 25 - colocar el objeto tridimensional que debe ser detectado en una celda objeto (3) en el camino óptico del haz objeto (2), entre el referido divisor del primer haz (BS1) y el referido primer objetivo de microscopio (L1);
 - 30 - recombinar el haz objeto (2) y el haz de referencia (6) en un haz recombinado (8) a través de medios ópticos;
 - 35 - colocar un tope óptico (4) en el plano de la imagen de la fuente lumínica del referido objetivo de microscopio (L1), sobre el eje óptico de dicho objetivo de microscopio (L1), dicho tope óptico (4) se coloca de tal manera que, sin el objeto tridimensional, el haz objeto es bloqueado;
 - 40 - enfocar en un medio de registro (5) el haz recombinado (8) a través de un medio de enfoque (L3);
 - 45 - registrar las señales interferométricas producidas por la interacción entre el haz de referencia y el haz objeto con un medio de registro (5),
 - 50 - reconstruir una imagen tridimensional del objeto tridimensional que se detectará a través de la referida señal interferométrica, detectando así dicho objeto tridimensional.
- 55 2. El método de la reivindicación 1 en el cual el referido tope óptico (4) es de mayor tamaño que el de la imagen de la fuente lumínica en el plano de la imagen de la fuente lumínica del referido objetivo de microscopio (L1).
- 60 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que consiste en insertar un atenuador óptico (7) en el camino óptico del haz de referencia (6).
- 65 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el cual el referido medio óptico está compuesto por:
- 70 - un segundo divisor de haces (BS2);
 - 75 - un primer espejo (M1) ubicado para dirigir el haz de referencia (6) hacia el referido segundo divisor de haces (BS2);
 - 80 - un segundo espejo (M2) ubicado para dirigir el haz objeto (2) hacia el referido segundo divisor de haces (BS2).
- 85 5. El método de la reivindicación 3 o 4, cuando depende de la reivindicación 3, en el cual la función de transferencia óptica del camino óptico del haz objeto (2) sin el objeto tridimensional (9) y sin el tope óptico (4), y la del haz de referencia (6) sin el atenuador óptico (7) son esencialmente equivalentes.
- 90 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el cual la longitud total del camino óptico del haz objeto (2) y del haz de referencia (6) son esencialmente iguales.
- 95 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que consiste en compensar la diferencia de caminos ópticos entre el haz de referencia y el haz objeto, para producir, en ausencia del objeto tridimensional (9) y del tope óptico (4), esencialmente la misma dependencia de fase espacial del haz objeto y el haz de referencia en el medio de registro.
- 100 8. El método de la reivindicación 7 en el cual el paso de compensar la diferencia de camino óptico entre el haz de referencia y el haz objeto resulta de insertar un segundo objetivo de microscopio (ML2) en el camino óptico del referido haz de referencia (6).

- 5 9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 en el cual una celda de referencia similar a la celda objeto (3), pero que no incluye al objeto tridimensional (9) que se estudiará, o un material transparente de grosor y de composición apropiados, se inserta en el camino óptico del haz de referencia.
- 10 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el cual la referida fuente lumínica es parcialmente coherente espacialmente.
- 10 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el cual la antemencionada fuente lumínica es parcialmente coherente temporalmente.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el cual el referido medio de registro es una cámara de vídeo (5).
- 15 13. El método de la reivindicación 12 en el cual dicha cámara de vídeo (5) es una cámara CCD o CMOS.
14. El método de la reivindicación 12 o 13 en el cual la cámara de vídeo (5) se conecta a medios de procesamiento y de análisis de imagen computarizados para procesar las referidas señales interferométricas.

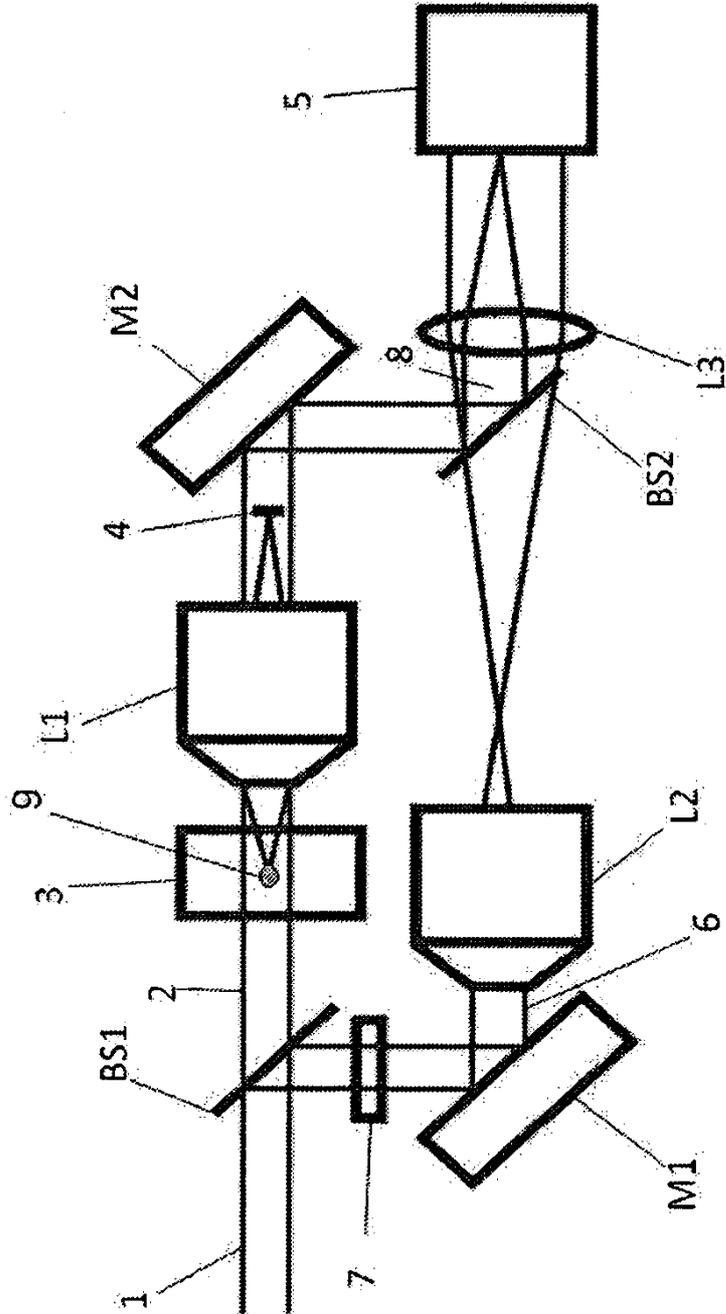


Fig. 1

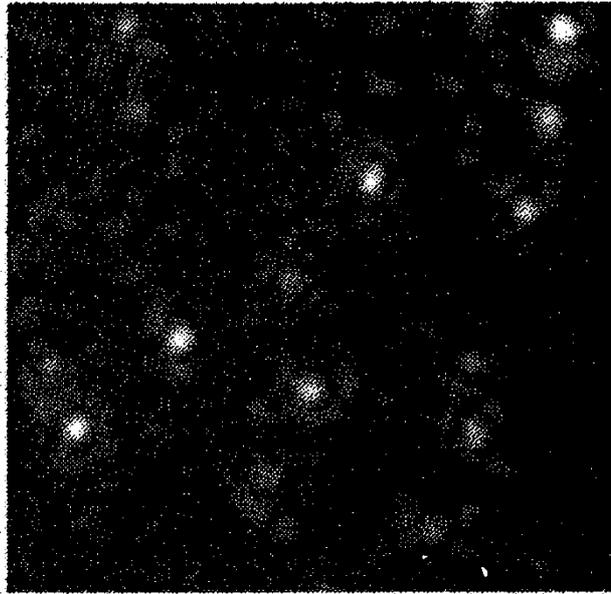


Fig. 1b

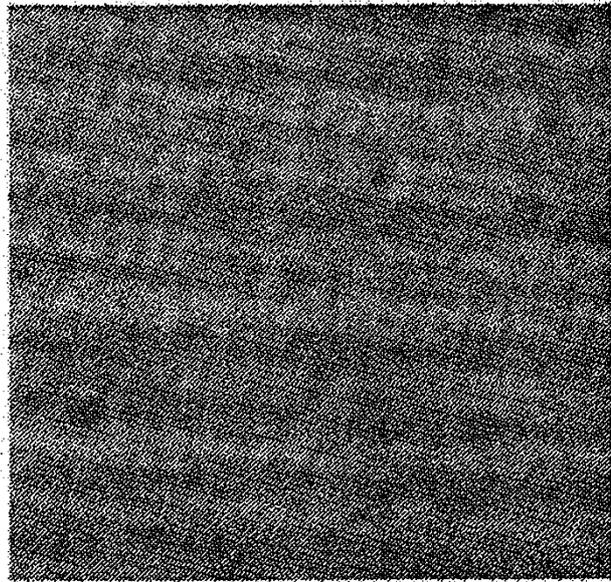


Fig. 1a

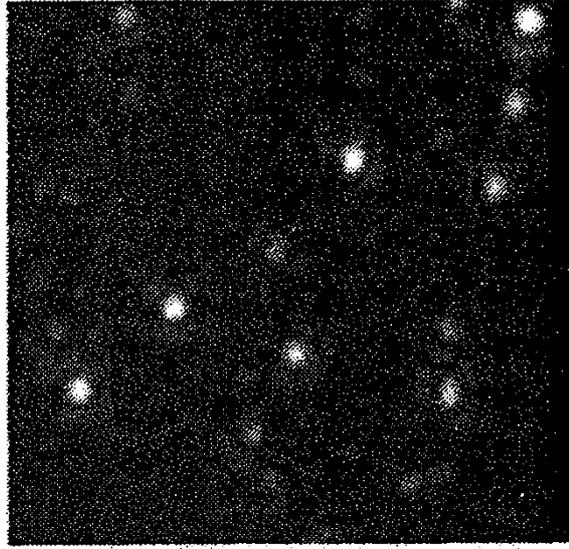


Fig. 1d

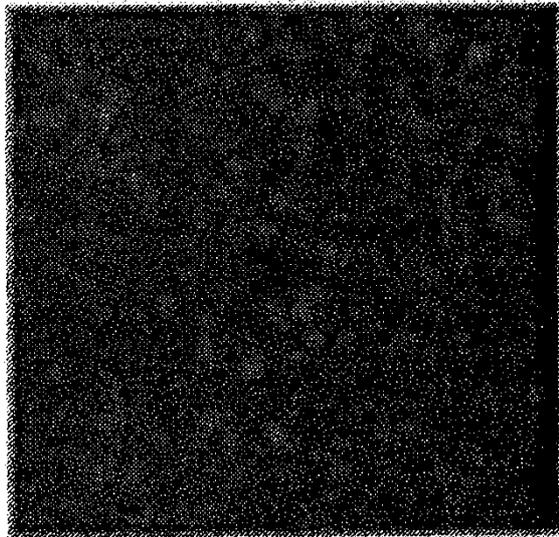


Fig. 1c