

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 214**

51 Int. Cl.:

**G01J 3/10** (2006.01)

**G01J 3/44** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2008 PCT/GB2008/000840**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2008 WO08107702**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2008 E 08718686 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2118627**

54 Título: **Técnicas espectroscópicas mejoradas que usan conformación de haz espacial**

30 Prioridad:

**08.03.2007 GB 0704491**

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

**23.03.2017**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY  
OF ST. ANDREWS (100.0%)  
College Gate, North Street  
St. Andrews, KY16 9AJ, GB**

72 Inventor/es:

**DHOLAKIA, KISHAN;  
CORMACK, IAIN y  
MAZILU, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 606 214 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

Técnicas espectroscópicas mejoradas que usan conformación de haz espacial

- 5 La presente invención se refiere a un sistema de espectroscopia Raman y un método para mejorar la relación de señal respecto a ruido de técnicas espectroscópicas enfocadas usando conformación de haz espacial diseñada específicamente para mejorar su rendimiento.

10 **Antecedentes de la invención**

- 10 La espectroscopia Raman es un potente método para obtener una signatura química que defina la estructura molecular interna de una muestra. Las aplicaciones y principios de la espectroscopia Raman son bien conocidos y, por lo tanto, en el presente documento no se describirán en detalle. La espectroscopia Raman es una técnica de dispersión de luz inelástica que usa el efecto Raman. En un sistema de espectroscopia Raman típico, un láser de excitación ilumina una muestra, por ejemplo una muestra molecular o celular, que contiene diversas moléculas que proporcionan la señal de dispersión de Raman. La luz, que es dispersada desde la muestra, exhibe un desplazamiento de frecuencia que refleja la energía de vibraciones moleculares específicas dentro de la muestra. Esto proporciona una composición química detallada de la muestra - una huella química.

- 20 Dado que puede aplicarse a muestras en un amplio intervalo de tamaño desde células individuales hasta tejido intacto, la espectroscopia Raman tiene un potencial significativo en la ciencia biomédica, por ejemplo en la detección temprana de una enfermedad. Sin embargo, un desafío fundamental de la espectroscopia Raman es que la señal es muy débil y puede ser enmascarada por la fluorescencia de fondo que es generada a partir de componentes dentro de la disposición óptica, así como en la muestra. En particular, puede generarse fluorescencia a partir de revestimientos sobre la superficie de los componentes ópticos y/o dentro de los propios componentes ópticos. Se ha realizado un esfuerzo considerable por mejorar la relación de señal con respecto a ruido de fondo para espectroscopia Raman. Pueden conseguirse algunos beneficios incrementando el tiempo de adquisición normalmente a varios minutos. Sin embargo para células vivas, tiempos de adquisición largos pueden causar daños debido a una irritación prolongada por el láser de excitación Raman.

- 30 La figura 1 muestra un equipo de microscopio de espectroscopia típico que incluye una fuente de luz, una lente de objetivo para enfocar luz procedente de la fuente sobre un plano de muestra, un colimador para colimar la luz procedente del plano de muestra, y una lente adicional para enfocar la luz colimada sobre un detector que mide el espectro. La señal de Raman se generará en el plano de muestra y será recogida eficazmente sobre el detector. Adicionalmente, la fluorescencia generada a partir del sistema óptico será recogida con eficiencia variable. Se muestra la trayectoria de la luz fluorescente generada a partir de un punto específico en la lente de objetivo. La cantidad de fluorescencia recogida y detectada depende de la fluorescencia total generada inicialmente, la distancia desde el eje paraxial y la distancia desde el plano focal. Cuanto más cerca esté el punto de fluorescencia del eje paraxial y/o del plano focal, más fluorescencia se detecta. La cantidad de fluorescencia detectada también depende de la intensidad de la excitación, el perfil del haz y la eficiencia de recogida. Por ejemplo, cuando se excita con un perfil de haz Gaussiano, la intensidad máxima está situada a nivel central haciendo que la mayor cantidad de fluorescencia se genere bajo el centro del eje paraxial, permitiendo que sea recogida de forma eficiente por el detector. Esto es un problema.

- 45 El documento US 2006184037 describe un sistema de imaginología óptica. En una realización, la luz pasa a través de una guía lumínica anular hacia una lente que enfoca la luz sobre un área de muestra. Las emisiones procedentes de la muestra son recogidas en reflexión. No hay, sin embargo, ninguna descripción de los problemas asociados con los requisitos de sensibilidad para medir señales de Raman. Además, no hay ninguna enseñanza de una solución a este problema.

50 **Sumario de la invención**

- Diversos aspectos de la presente invención están definidos en las reivindicaciones independientes. Algunas características preferidas están definidas en las reivindicaciones dependientes.

- 55 Conformando el haz de excitación, por ejemplo formando un campo de luz anular, la presente invención puede reducir significativamente la fluorescencia de fondo que habitualmente eclipsa las señales de dispersión de Raman, proporcionando de este modo una sensibilidad mejorada. Esto ayuda tanto a reducir la necesidad de adquisición prolongada así como el ruido global de la señal de Raman. Ésta es una técnica robusta y sencilla que puede implementarse fácilmente en cualquier configuración de Raman.

- 60 El haz es conformado antes de la iluminación de la muestra y/o antes de pasar a través de uno o más elementos de enfoque para enfocar sobre la muestra.

- 65 La espectroscopia puede ser, por ejemplo dispersión de Raman, dispersión de Raman intensificada en la punta (TERS), dispersión de Raman intensificada por efecto superficial (SERS).

### Breve descripción de los dibujos

A continuación se describirán diversos aspectos de la invención a modo de ejemplo solamente y con referencia a los dibujos adjuntos, de los cuales:

- 5 la figura 2 es un gráfico teórico de perfiles de intensidad para una serie de diferentes rayos, junto con cálculos teóricos de la fluorescencia de fondo recogida;  
 la figura 3 es un diagrama de bloques de una disposición experimental que se usó para ensayar los efectos de conformación de haz sobre espectroscopia Raman;  
 10 la figura 4 muestra espectros Raman para dos perfiles de haz diferentes;  
 la figura 5 muestra la desviación estándar de cada componente espectral para los espectros de la figura 4;  
 la figura 6 muestra la desviación estándar de la señal de Raman con respecto al tiempo de adquisición, y  
 la figura 7 muestra diversas representaciones esquemáticas que comparan las secciones transversales de un haz Gaussiano con las secciones transversales de un haz de Bessel.

### Descripción específica de los dibujos

De acuerdo con la presente invención, se usa un perfil de haz espacial diseñado especialmente como fuente de iluminación para técnicas espectroscópicas, y en particular las técnicas espectroscópicas basadas en Raman. Usar, por ejemplo, un haz anular en la disposición de la figura 1 reduce la fluorescencia de fondo, ya que aleja la parte de intensidad máxima del haz de las partes centrales y, por lo tanto, más anchas de los componentes ópticos. Esto significa que menos fluorescencia global es generada y recogida por el detector. Este comportamiento es independiente en gran medida de la configuración óptica usada para generar y recoger la señal de Raman.

25 Podría usarse cualquier forma de haz espacial diseñado, siempre que su mayor intensidad se propague lejos del eje paraxial. Por ejemplo, podría usarse un haz Laguerre-Gaussiano (LG), o Hermite Gaussiano de orden superior. La figura 2 muestra, teóricamente, la eficiencia de recogida global para un Laguerre-Gaussiano (LG) de acuerdo con la invención y uno Gaussiano tal como se usa en la técnica anterior.

30 Se consideraron dos fuentes principales de fluorescencia por separado, siendo éstas la fluorescencia causada por el revestimiento sobre los componentes ópticos y la fluorescencia causada por la masa de vidrio. Los datos de la figura 2 muestran que rayos anulares son beneficiosos respecto a un perfil Gaussiano para reducir la fluorescencia de fondo. Esto es debido a que el haz anular permite que la intensidad de excitación máxima se aleje del eje paraxial de modo que esté distribuida uniformemente una distancia establecida alrededor del eje. Como consecuencia, cualquier fluorescencia generada es recogida menos eficazmente que un haz que tenga un perfil Gaussiano.

Un haz Laguerre-Gaussiano tiene un centro oscuro tal como se muestra en la figura 2. Tener un centro oscuro en el punto focal, como el de un haz LG, distribuye el haz de excitación por un área más grande, reduciendo el daño fotoinducido en la muestra.

40 La figura 3 muestra una disposición óptica para demostrar cómo un perfil de haz diseñado reduce la fluorescencia de fondo. Se usaron elementos ópticos estándar, no diseñados específicamente para reducir la fluorescencia. Para los experimentos, el haz de excitación Raman fue proporcionado por un diodo láser de alta potencia (Tui Optics TA100) que funciona a una longitud de onda de 780 nm. Se usó un holograma para crear un haz óptico conformado. Éste se seleccionó para crear un haz LG (1=3) cuando está en su posición central o un perfil Gaussiano atravesándolo lejos de la posición central, permitiéndole actuar como una rejilla estándar. Se usó un telescopio para expandir el haz para maximizar la apertura numérica (AN) de la lente de objetivo mientras que al mismo tiempo se garantiza que no había acortamiento del haz para los tres perfiles. Una lente de objetivo de AN elevada de inmersión en aceite (Nikon x100, AN=1,4) se usó para enfocar sobre la cámara de una muestra mientras que un objetivo de recogida de AN más baja (Nikon x20, AN=0,9) se usó para colimar la señal de Raman. Al hacer esto, solamente se recogió luz que se origina desde la parte central de la cámara de la muestra.

La cámara de la muestra se formó usando un separador de vinilo de 80  $\mu\text{m}$  de profundidad entre un portaobjetos de microscopio de cuarzo y un cubreobjetos de sílice fundida (120  $\mu\text{m}$  de grosor). Un cubreobjetos de sílice fundida se prefirió respecto a un cubreobjetos de cuarzo menos fluorescente dado que ayudaba a incrementar señales extrañas que se derivan de la muestra. Como muestra, se usó una solución diluida de 10  $\mu\text{m}$  de microesferas de polímero en agua destilada. Un filtro de muesca holográfica de cero grados se colocó después del objetivo de recogida para eliminar la luz de excitación. La luz se enfocó finalmente a continuación a través de la hendidura de entrada de 100  $\mu\text{m}$  del espectrómetro (Jobin Yvon Triax 550). El espectro de dispersión de Raman fue recogido por una cámara CCD refrigerada de Peltier (Symphony OE STE Jobin Yvon). La potencia del haz de rayos láser que entra en la primera lente de objetivo se mantuvo constante (13 mW) para los tres perfiles.

Para permitir que se obtenga información estadística de las mediciones, se recogieron 125 espectros para cada perfil de haz. Cada espectro tenía un tiempo de integración de 0,2 segundos que, cuando se sumaron, dieron como resultado un tiempo de exposición global de 25 segundos. Se realizaron dos mediciones espectrales independientes para cada perfil de haz, uno con una única esfera de polímero presente y una medición de fondo cuando la esfera de

polímero está retirada. La señal de dispersión de Raman se obtuvo restando los dos espectros. La figura 4 muestra los espectros sumados para los dos perfiles cuando la esfera de polímero estaba presente.

5 En cada uno de los espectros de la figura 4, se observa una gran señal de dispersión de Raman a  $1000\text{ cm}^{-1}$  con todos los picos de Raman restantes estando eclipsados en gran medida por fluorescencia. Sin embargo, el perfil de haz LG observa mucha menos fluorescencia de fondo (3,4 veces menos) con solamente una reducción muy pequeña de la señal de Raman global. Esto puede observarse especialmente a partir del gran pico de fluorescencia a  $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$  que, con un perfil Gaussiano, es significativamente mayor que el pico de Raman a  $1000\text{ cm}^{-1}$ . Cuando se observa el LG sin embargo, la reducción de fluorescencia permite que la señal de Raman se convierta en el  
10 componente espectral más grande.

El ruido presente en la señal de Raman resultante está directamente relacionado con la cantidad de fluorescencia de fondo presente. Esta correlación es evidente en la figura 5, que muestra la desviación estándar de cada componente espectral. Esto demuestra cómo grandes cantidades de fluorescencia añaden directamente ruido a la señal de Raman. Para LG, la cantidad reducida de fluorescencia permite que pase menos ruido sobre la señal de Raman.  
15

La figura 6 ilustra la importancia de reducir este ruido. Esto muestra la desviación estándar de la señal de Raman con respecto al tiempo de adquisición. A partir de esto, queda claro que el perfil de haz anular proporciona mediciones de Raman más limpias más rápidamente que una configuración Gaussiana. Esto permite que picos de Raman más pequeños se distingan del ruido usando un tiempo de adquisición significativamente reducido. Esto es importante si Raman se va a convertir en una técnica experimental práctica en áreas tales como para diagnóstico médico.  
20

Así como rayos Laguerre-Gaussianos, podrían usarse otros rayos diseñados especialmente, por ejemplo un haz de Bessel. Esto puede crearse de diversas maneras, por ejemplo usando un elemento óptico de forma cónica (axicón). Estos rayos mantienen su perfil de intensidad de sección transversal a lo largo de una distancia mucho mayor que el haz Gaussiano y Laguerre-Gaussiano equivalente. El orden no cero de un haz de Bessel está compuesto por múltiples anillos concéntricos que muestran la misma región oscura en el centro del haz que el haz Laguerre-Gaussiano mientras su distancia de propagación enfocada es muchas veces más grande. Esta propiedad mejora la disposición óptica reduciendo los requisitos de enfoque del haz de excitación en la muestra y mediante un volumen de excitación mayor.  
25  
30

La figura 7 compara las secciones transversales de un haz Gaussiano con las secciones transversales de un haz de Bessel. Muestra que, aunque el haz de Bessel tiene una región de baja intensidad en su centro que es útil para suprimir la fluorescencia de fondo, también tiene una región focal mucho más profunda que hace la recogida de la señal de Raman más fácil. Las figuras superiores muestran la sección transversal del haz Gaussiano (izquierda) y de Bessel (derecha) y el par inferior las secciones longitudinales respectivas.  
35

Un experto en la materia apreciará que son posibles variaciones de las disposiciones develadas sin alejarse de la invención.  
40

La fuente de excitación incluye, por ejemplo, láseres de onda continua o pulsados y fuentes de banda ancha/súper-continuas. El diseño específico de rayos puede conseguirse por ejemplo, mediante técnicas holográficas de fase y amplitud, elementos ópticos en masa tales como lentes cilíndricas y axicones así como máscaras de fase y amplitud. Estos perfiles de haz especiales son rayos Laguerre-Gaussianos, de Bessel y rayos Hermite-Gaussianos. Esta mejora de la relación de señal respecto a ruido puede obtenerse incrementando el nivel de señal, reduciendo la señal de fondo independientemente de su origen dentro de la disposición óptica y/o la muestra, así como reduciendo el nivel de ruido.  
45

La configuración espectral abarca experimentos que usan disposiciones que contienen, por ejemplo, lentes de objetivo numéricas elevadas que enfocan estrechamente el haz de excitación. Dichas aplicaciones pueden incluir dispersión de Raman, dispersión de Raman intensificada en la punta (TERS), Dispersión de Raman intensificada por efecto superficial (SERS), microscopía por fluorescencia, microscopía multifotónica y generación de frecuencia tal como mezcla de cuatro ondas no generadas. Estas técnicas pueden usarse para caracterizar espectralmente muestras que incluyen células fijadas o vivas, y soluciones químicas y coloides.  
50  
55

Por consiguiente, la descripción anterior de la realización específica se realiza a modo de ejemplo solamente y no para fines de limitación. Quedará claro para el experto en la materia que pueden realizarse modificaciones menores sin cambios significativos al funcionamiento descrito.  
60

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de espectroscopia Raman para recoger una señal de Raman con ruido o fluorescencia de fondo reducidos, comprendiendo el método:  
5           excitar una señal de Raman iluminando una muestra usando un haz de rayos láser que está conformado de modo que su máximo de intensidad se propague lejos del eje óptico espectroscópico y tenga un punto oscuro en su centro, en donde el haz de rayos láser se selecciona entre: un haz Laguerre-Gaussiano; un haz Hermite-Gaussiano o un haz de Bessel,  
10          hacer pasar el haz de rayos láser conformado a través de uno o más elementos de enfoque para enfocararlo sobre la muestra, y  
            recoger una señal de Raman a partir de la muestra.
2. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la espectroscopia Raman es una de: dispersión de Raman, dispersión de Raman intensificada en la punta (TERS) y dispersión de Raman intensificada por efecto superficial (SERS).  
15
3. Un sistema de espectroscopia Raman que comprende medios para iluminar una muestra con un haz de rayos láser conformado para excitar una señal de Raman, uno o más elementos de enfoque para enfocar el haz de rayos láser conformado sobre la muestra y un detector que es utilizable para detectar luz que se refleja desde o se transmite a través de una muestra, en donde los medios para iluminar la muestra son utilizables para proporcionar un haz de rayos láser que tiene un máximo de intensidad que se propaga lejos del eje óptico espectroscópico y un punto oscuro en su centro, en donde el haz de rayos láser se selecciona entre: un haz Laguerre-Gaussiano; un haz Hermite-Gaussiano o un haz de Bessel.  
20
4. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 4, configurado para medir una o más de dispersión de Raman, dispersión de Raman intensificada en la punta (TERS) y dispersión de Raman intensificada por efecto superficial (SERS).  
25

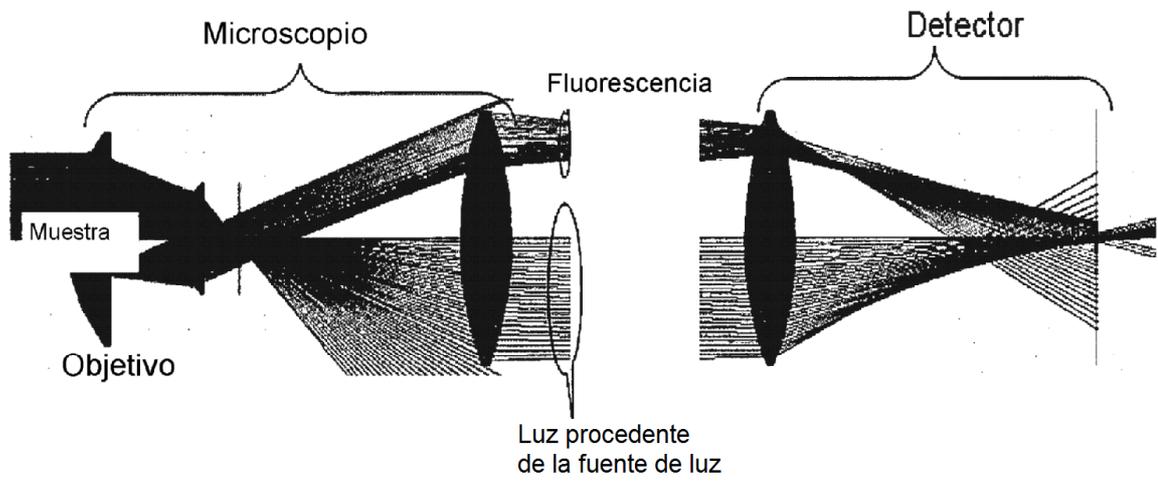


Figura 1

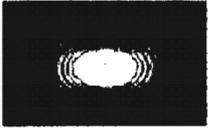
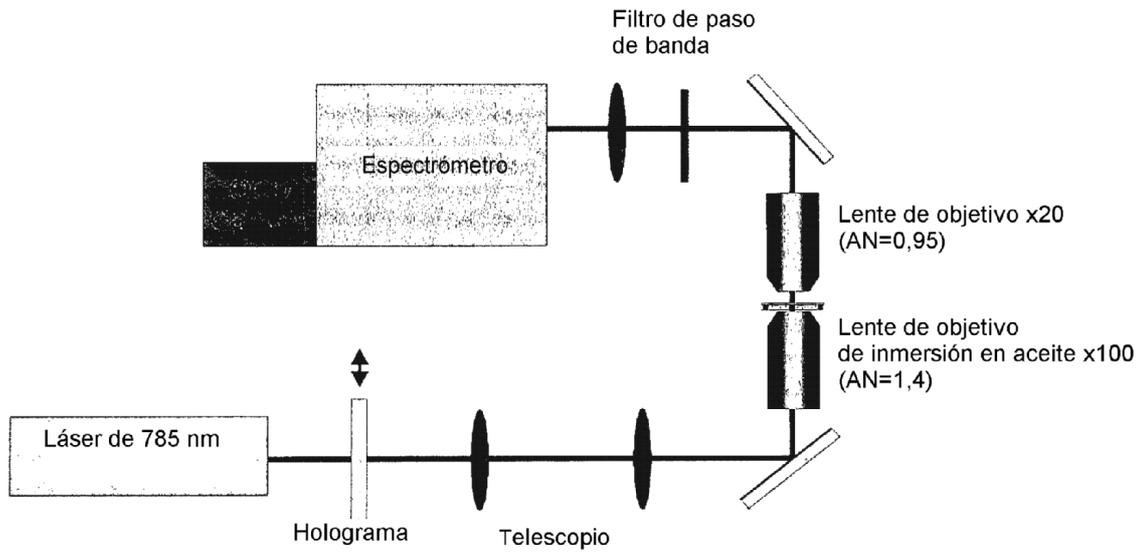
	Gaussiano	LG ( $l=1$ )	LG ( $l=3$ )
Perfil de intensidad en el punto focal			
Fluorescencia procedente de revestimientos que alcanza el detector	100%	81%	51%
Fluorescencia procedente de la masa que alcanza el detector	100%	78%	47%
Señal de Raman (procedente del plano de muestra) que alcanza el detector	100%	93%	80%

Figura 2



**Figura 3**

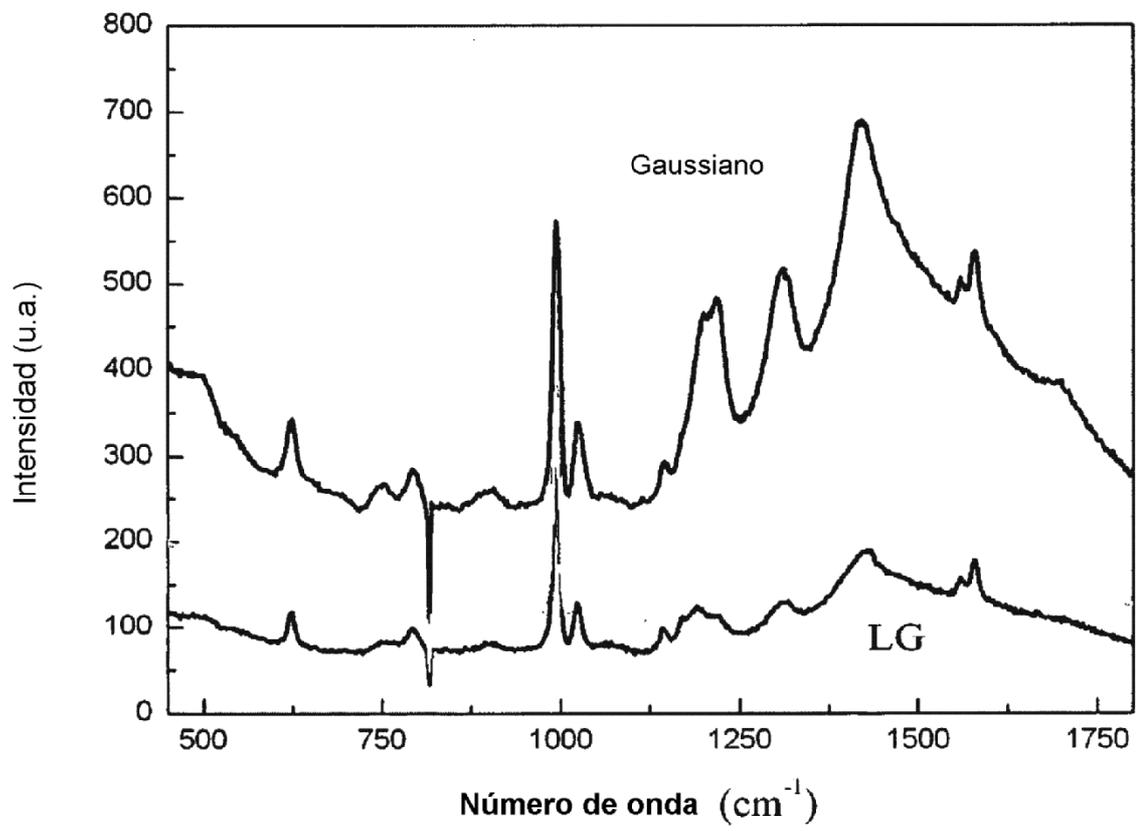


Figura 4

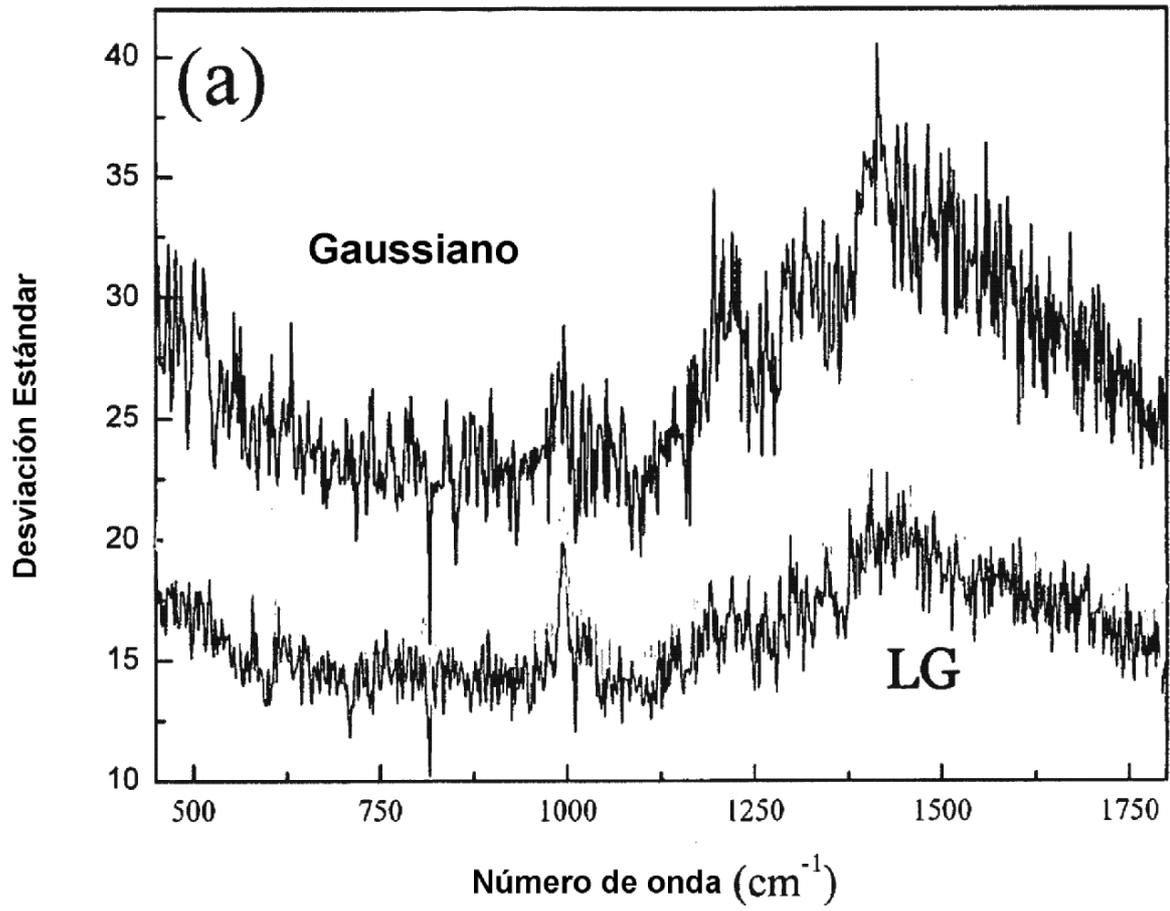


Figura 5

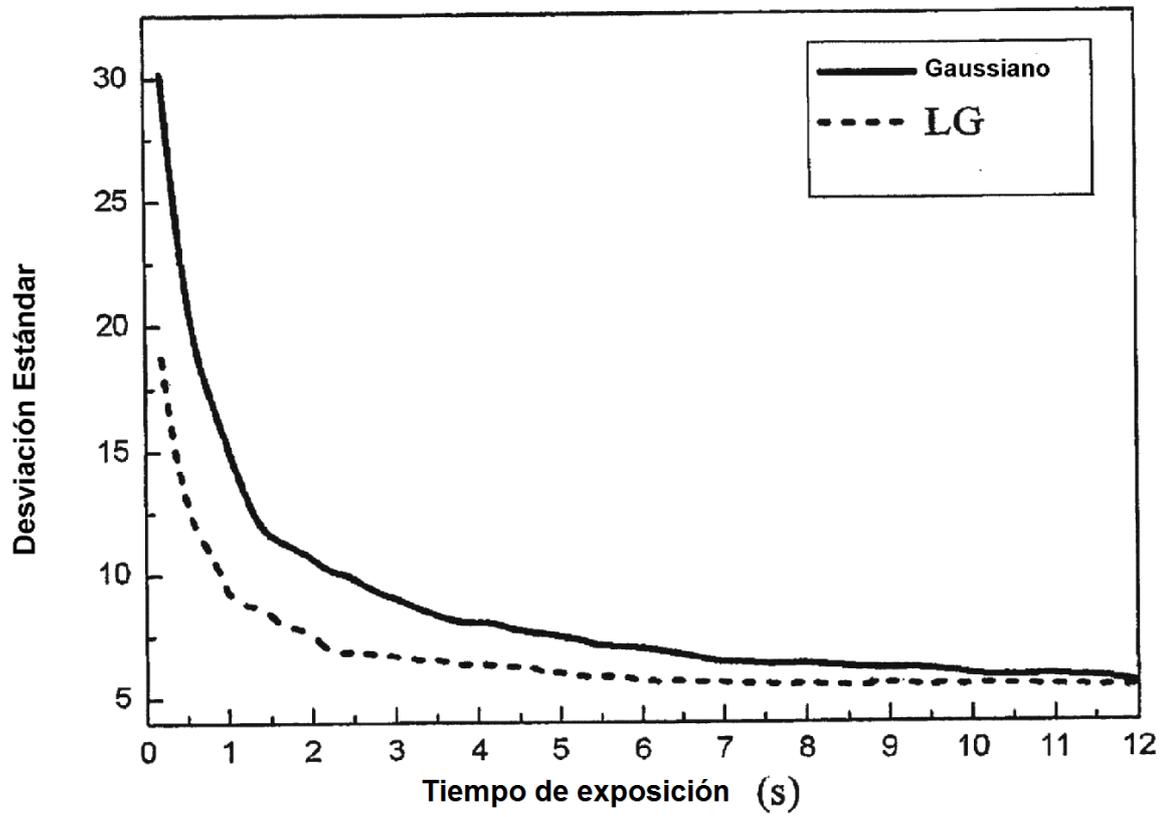


Figura 6

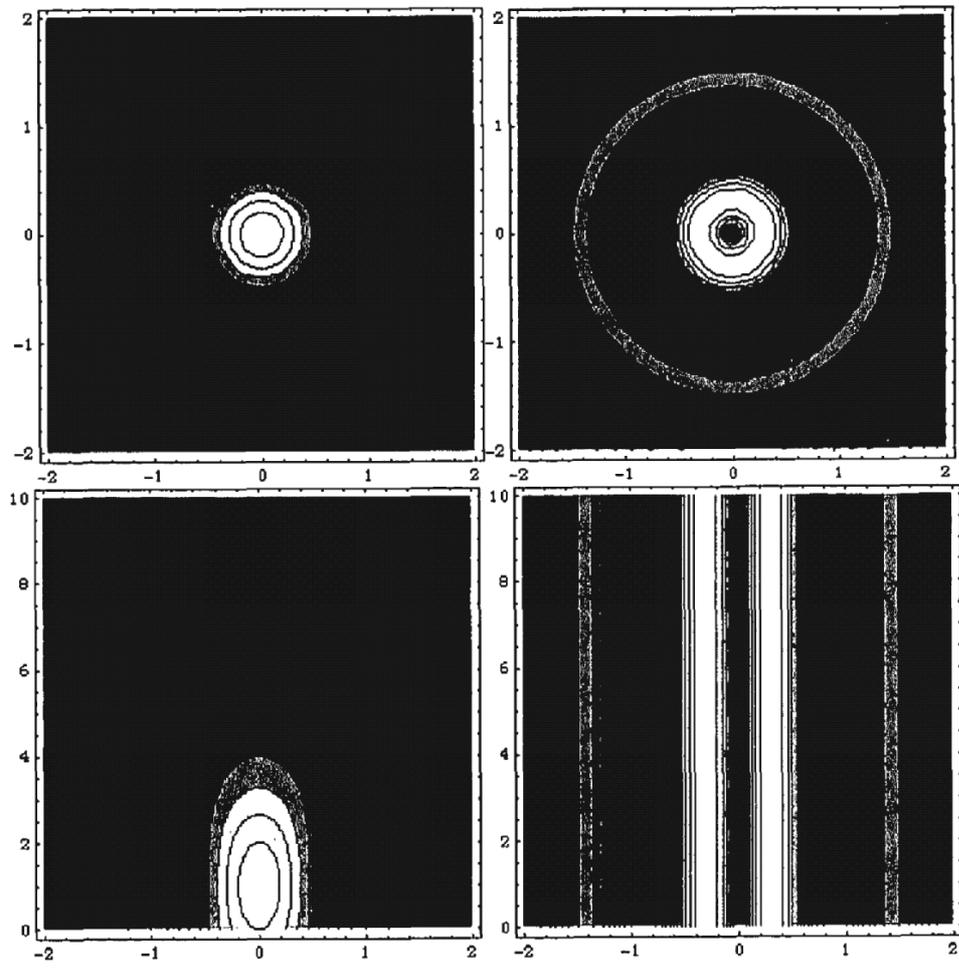


Figura 7