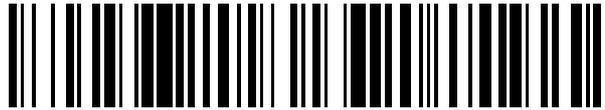


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 712**

21 Número de solicitud: 201631277

51 Int. Cl.:

**G02B 5/26** (2006.01)

**G01L 3/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**03.10.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**07.05.2018**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2017/070645**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

**C/ Serrano, nº 117**

**28006 Madrid ES y**

**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES  
ONCOLOGICAS (CNIO) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**POSTIGO RESA, Pablo Aitor y  
MEGIAS VÁZQUEZ, Diego**

74 Agente/Representante:

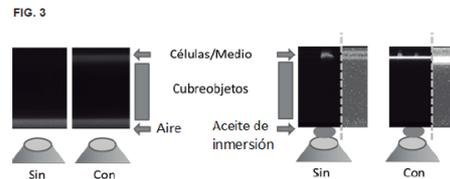
**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **USO DE UN MATERIAL PARA LA FABRICACIÓN DE UN CUBREOBJETOS, UN PORTAMUESTRAS O UN RECIPIENTE DE CULTIVO CELULAR**

57 Resumen:

Uso de un material para la fabricación de un cubreobjetos, un portamuestras o un recipiente de cultivo celular.

La presente invención se refiere al uso de un material que comprende un recubrimiento capaz de reflejar luz de una longitud de onda de entre 350 nm y 850 nm, correspondientes a las regiones del espectro electromagnético del VIS, IR y UV, y un sustrato transparente a la luz VIS, para la fabricación de un cubreobjetos, un portamuestras o un recipiente de cultivo celular, particularmente un cubreobjetos, un portamuestras o un recipiente de cultivo celular que se utilizan en microscopía óptica.



ES 2 666 712 A1

**Uso de un material para la fabricación de un cubreobjetos, un portamuestras o un recipiente de cultivo celular**

**DESCRIPCIÓN**

5

La presente invención se refiere al uso de un material que comprende un recubrimiento capaz de reflejar total o parcialmente y de forma selectiva luz de longitudes de onda entre 350 nm y 800 nm, correspondientes a las regiones del espectro electromagnético del VIS, del IR y del UV, y un sustrato transparente a la luz VIS, para la fabricación de un cubreobjetos, un portamuestras o un recipiente de cultivo celular, particularmente un cubreobjetos, un portamuestras o un recipiente de cultivo celular que se utilizan en microscopía óptica.

10

15

Por tanto, la invención se podría encuadrar en el sector de las técnicas de análisis y caracterización de muestras, particularmente por microscopía óptica.

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

20

Normalmente, el enfoque automático de una imagen en microscopía óptica se realiza midiendo la luz reflejada sobre un portamuestras o cubreobjetos transparente, cuando se utiliza una luz IR como fuente de iluminación, donde la detección de la luz reflejada se realiza en paralelo al sistema de iluminación. El problema de escasa estabilidad/nitidez de la imagen enfocada automáticamente aparece, por ejemplo, cuando se utilizan objetivos de inmersión de aceite cuyo índice de refracción es similar al del cubreobjetos o el del portamuestras comúnmente un material de vidrio, cuarzo o un material plástico transparente y, por tanto, la luz que se refleja es pequeña.

25

30

En la bibliografía se pueden encontrar diferentes formas de mejorar la estabilidad/nitidez de la imagen enfocada automáticamente en un microscopio óptico.

Por ejemplo, US2010033811 describe un sistema de autoenfoco del microscopio que corrige la imagen de una muestra a lo largo del camino óptico utilizando un divisor de haz.

35

US2011017902 describe sistema de autoenfoco y su procedimiento de operación para alcanzar una mayor velocidad y una robustez en las medidas de muestras

biológicas por microscopía. El sistema de autoenfoco del microscopio se basa en corregir las imágenes de las muestras a lo largo del camino óptico; la alta velocidad de medida del sistema de autoenfoco se alcanza realizando un patrón con luz sobre la muestra y midiendo, con un detector espacial, al menos dos patrones de reflexión de dicho patrón.

WO2013063096 describe un sistema de enfoque automático multifunción basado en enfocar la imagen de la muestra con la ayuda de un posicionamiento por reflexión y correcciones de astigmatismo y aberración cromática a lo largo del eje z, es decir, corregir las imágenes de las muestras a lo largo del camino óptico.

Dichos sistemas son complicados y costosos, por lo que es necesario desarrollar nuevos sistemas que ayuden a mejorar la estabilidad/nitidez de las imágenes obtenidas por microscopía óptica.

15

## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere al uso de un material que comprende un recubrimiento capaz de reflejar total o parcialmente y de forma selectiva luz de longitudes de onda entre 350 nm y 800 nm, correspondientes a las regiones del espectro electromagnético del visible, del IR y del UV, y un sustrato transparente a la luz VIS, para la fabricación de un cubreobjetos, un portamuestras o un recipiente de cultivo celular, particularmente un cubreobjetos, un portamuestras o un recipiente de cultivo celular que se utilizan en microscopía óptica.

20  
25

Como el cubreobjetos, portamuestras o recipiente de cultivo celular de la presente invención refleja total o parcialmente y de forma selectiva luz de longitudes de onda entre 350 y 800, correspondientes a las regiones del espectro electromagnético del visible, del IR y del UV, dicho recubrimiento puede reflejar la luz que emite el sistema de autoenfoco de un microscopio óptico, por lo que se corrige la estabilidad y nitidez de la imagen enfocada automáticamente mediante un sistema autoenfoco en un microscopio óptico.

Cabe señalar que esta mejora de la nitidez, la estabilidad y la calidad de la imagen se obtiene también cuando se utilizan objetivos de aceite de inmersión.

30  
35

El cubreobjetos de la presente invención refleja luz UV, es decir, bloquea el paso de la luz UV a su través. Este hecho le confiere una ventaja a la hora de analizar muestras biológicas que se deterioran bajo luz UV.

5

El uso de un material que además es capaz de transmitir la fluorescencia de una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de tejido humano, para la fabricación de un cubreobjetos, un portamuestras o un recipiente de cultivo celular tiene especial interés en microscopia óptica de fluorescencia.

10

Por tanto, el primer aspecto de la presente invención se refiere al uso (a partir de aquí el uso de la invención) de un material que comprende un sustrato y un recubrimiento caracterizado por que

15

- dicho sustrato es transparente a la luz visible,
- el índice de refracción del material de dicho recubrimiento es mayor que el índice de refracción del material de dicho sustrato,

20

- dicho recubrimiento está depositado sobre al menos una cara del sustrato,
- dicho recubrimiento tiene un espesor inferior a 1  $\mu\text{m}$ , y
- dicho recubrimiento es capaz de reflejar total o parcialmente y de forma selectiva, luz de longitudes de onda entre 350 nm y 800 nm, correspondientes a las regiones del espectro electromagnético del visible, del IR y del UV,

25

para la fabricación de un cubreobjetos, un portamuestras o un recipiente de cultivo celular.

30

En la presente invención se entiende por "recipiente de cultivo celular" como aquel recipiente en los que se puede preparar un cultivo celular. Ejemplos de dichos recipientes son una placa Petri, o una placa de pocillos múltiples.

En una realización preferida de la presente invención, el recubrimiento está depositado sobre ambas caras del sustrato. De este modo, si una cara se estropea o se ensucia, se podría utilizar la otra.

5 En otra realización preferida de la invención, el recubrimiento es una lámina delgada de óxido de tantalio de espesor de entre 25 nm y 200 nm. Más preferiblemente, la lámina delgada de óxido de tantalio tiene un espesor de entre 75 nm y 125 nm.

10 En la presente invención se entiende por “sustrato transparente a la luz visible” como aquel sustrato formado por un material capaz de transmitir la luz correspondiente a un rango de longitudes de onda del espectro electromagnético de entre 350 nm y 800 nm.

15 En otra realización preferida, el soporte transparente se selecciona de entre un vidrio, cuarzo o una composición polimérica y un copolímero.

Ejemplos de polímeros transparentes susceptibles de ser utilizados como sustrato son polidimetilsiloxano (PDMS), polimetilmetacrilato (PMMA), hidroxietilmetacrilato (HEMA) ó resina epoxi fotosensible negativa que comprende 8 grupos epoxi (SU8).

20 Ejemplos de copolímeros transparentes susceptibles de ser utilizados como sustrato son copolímeros basados en estireno y polimetilpenteno (PMP).

25 En una realización preferida, el cubreobjetos, el portamuestras o el recipiente de cultivo celular se utilizan en microscopía óptica, por lo que el recipiente de cultivo celular debe tener el tamaño adecuado para poder situarse en la zona de visualización de un microscopio óptico.

30 En otra realización preferida, el cubreobjetos, el portamuestras o el recipiente de cultivo celular reflejan la luz del sistema de autoenfoque de un microscopio óptico y dicha luz del sistema de autoenfoque incide sobre la superficie de dicho cubreobjetos, dicho portamuestras o dicho recipiente de cultivo celular, por la cara que comprende el recubrimiento.

35 El ángulo de incidencia depende de la apertura numérica del objetivo. En la presente invención, el cubreobjetos, el portamuestras o el recipiente de cultivo celular refleja la

luz del sistema de autoenfoque de un microscopio óptico y dicha luz del sistema de autoenfoque incide a cualquier ángulo y con cualquier objetivo sobre la superficie de dicho cubreobjetos, dicho portamuestras o dicho recipiente de cultivo celular, por la cara que comprende el recubrimiento.

5

En la presente invención, se entiende por “enfocar automáticamente” al uso de un sistema de autoenfoque de un microscopio óptico que enfoca una imagen de un microscopio mediante la medida o detección de la reflexión de una luz incidente procedente de un sistema de iluminación sobre una placa que comprende a una muestra o una placa que cubre una muestra, donde la medida o detección de la luz reflejada se realiza en paralelo al sistema de iluminación.

10

El término “luz incidente del sistema de autoenfoque” se refiere a aquella luz que emite una luz LED o un sistema láser que forma parte de un sistema de enfoque automático de un microscopio óptico en el rango del espectro electromagnético correspondiente a unas longitudes de onda  $\lambda$  de entre 350 nm y 800 nm.

15

En la presente invención, concretamente en la interfaz entre el recubrimiento y el sustrato se produce un cambio de índice de refracción que también ofrece ventajas en sistemas de microscopía óptica, en concreto en microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (en inglés, Total internal reflection fluorescence microscopy o TIRFM), en la microscopía de iluminación delgada inclinada (en inglés Highly inclined thin illumination o HILO), así como en técnicas de nanoscopía, es decir de microscopía de resolución nanométrica como el sistema por depleción del estado basal (en inglés Ground state depletion and single-molecule return o GSDIM) o Depleción de emisión por estimulación (en inglés stimulated emission depletion o STED).

20

25

El cambio en el índice de refracción que se produce en la interfaz entre el recubrimiento y el sustrato en la presente invención permite la optimización de la ruta lumínica en los microscopios TIRFM e HILO.

30

El cambio de índice de refracción que se produce en la interfaz entre el recubrimiento y el sustrato en la presente invención produce una mejora de la reflexión de la luz incidente que utilizan los microscopios de resolución nanométrica GSDIM y STED resultando en una mayor resolución..

35

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un material (a partir de aquí el material de la invención) que comprende un recubrimiento formado por una lámina delgada de óxido de tantalio de espesor de entre 25 nm y 200 nm y un sustrato transparente a la luz visible, donde el recubrimiento está depositado sobre al menos una de las caras de dicho sustrato.

En una realización preferida del material de la invención, el recubrimiento está depositado sobre ambas caras de dicho sustrato.

En otra realización preferida del material de la invención, la lámina delgada de óxido de tantalio del material de la invención tiene un espesor de entre 75 nm y 125 nm.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIG. 1.** Ejemplo de rutina de autoenfoco y esquema de microscopio equipado con sistema de enfoque de luz infrarroja. (a) Ejemplo de rutina de autoenfoco y (b) Esquema ejemplo de microscopio equipado con sistema de enfoque por luz infrarroja.

**FIG. 2.** Sección transversal de las muestras 1 a 5 obtenida por reflexión óptica en un microscopio confocal.

**FIG. 3.** Imágenes de reflexión de la luz con o sin el empleo del recubrimiento en objetivos secos y de inmersión.

**FIG. 4.** Imágenes adquiridas con un objetivo de 20X de inmersión en aceite para 3 marcadores (azul verde y rojo) que emiten a lo largo del visible.

**FIG. 5.** Curva de transmisión de luz de un recubrimiento diseñado para reflejar la radiación ultravioleta

## 5 EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

10 La FIG. 1a muestra un ejemplo de rutina de autoenfoco, donde el sistema de autoenfoco comprende los siguientes elementos:

(a) Situación del objetivo con la muestra enfocada

1 Plano de foco

15 2 Objetivo

3 Distancia del cubreobjetos al plano de foco

(b) Perdida del plano de enfoque

1 Posición de foco (desenfocada)

20 2 Cubreobjetos

(c) Corrección de posición del objetivo y enfoque

1 Laser o Led de enfoque

2 Movimiento de objetivo

25

(d) Mecanismo de recuperación de enfoque

1 Muestra

2 Distancia del cubreobjetos al plano de foco

30 La FIG. 1b muestra un esquema ejemplo de microscopio equipado con sistema de enfoque por luz infrarroja que comprende los siguientes elementos.

1 Medio de montaje

2 Muestra

35 3 Interfaz entre muestra y cubreobjetos

4 Cubreobjetos

- 5 Medio de inmersión (aceite, agua o aire)
- 6 Objetivo
- 7 Sistema de autoenfoque
- 8 Luz infrarroja
- 5 9 Led o láser
- 10 Cámara ccd en línea
- 11 Cámara del Microscopio para toma de imagen

10 Las muestras están compuestas por placas de vidrio (portaobjetos) recubiertas con óxido de tantalio y cuyo índice de refracción está alrededor de 2 y es transparente en una amplia región del espectro visible. El recubrimiento es una película delgada depositada por pulverización catódica. Cada muestra tiene un espesor diferente.

15 Se han realizado 5 deposiciones sobre 5 placas de vidrio con 5 espesores diferentes, que son 100 nm (1), 75 nm (2), 50 nm (3), 25 nm (4) y 200 nm (5), para ilustrar el efecto del espesor del recubrimiento sobre la nitidez de la imagen observada por microscopía óptica.

20 Se han realizado medidas de transmisión óptica en un microscopio confocal de cada una de las muestras de 1 a 5 preparadas. Las imágenes 1 a 5 corresponden a los espesores 100 nm, 75 nm, 50 nm, 25 nm y 200 nm, respectivamente. La imagen 0 corresponde a una placa de vidrio sin recubrimiento.

25 La FIG. 2 muestra a sección transversal de las muestras 1 a 5. La FIG. 2a corresponde al reflejo de la luz en 488 nm y la FIG. 2b en 633 nm en cada una de las dos caras.

30 En las muestras de 1 a 5 se obtuvo una mejora del enfoque automático independientemente de la magnificación del objetivo utilizado con o sin aceite de inmersión.

35 En general es deseable que la luz de color verde, típica de la fluorescencia, se refleje con poca intensidad, por lo que en este caso el mejor espesor del recubrimiento corresponde al caso numero 1 (100 nm de espesor).

La FIG. 3 muestra imágenes de reflexión de la luz con o sin el empleo del recubrimiento en objetivos secos y de inmersión, en ambos casos se produce un aumento claro de dicha reflexión.

- 5 La FIG. 4 muestra imágenes adquiridas con un objetivo de 20X de inmersión en aceite para 3 marcadores (azul verde y rojo) que emiten a lo largo del visible. Se observa una mejora de la calidad de imagen gracias a la mejora de autoenfoco.

- 10 La FIG. 5 muestra la curva de transmisión de luz diseñado para reflejar la radiación ultravioleta. En la FIG. 5 se observa cómo se bloquea el paso de la luz ultravioleta.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un material que comprende un sustrato y un recubrimiento  
5 caracterizado por que
- dicho sustrato es transparente a la luz visible,
  - el índice de refracción del material de dicho recubrimiento es mayor que el índice de refracción del material de dicho sustrato,
  - dicho recubrimiento está depositado sobre al menos una cara del sustrato,
  - 10 • dicho recubrimiento tiene un espesor inferior a 1  $\mu\text{m}$ , y
  - dicho recubrimiento es capaz de reflejar total o parcialmente y de forma selectiva, luz de longitudes de onda entre 350 nm y 800 nm,
- para la fabricación de un cubreobjetos, un portamuestras o un recipiente de cultivo celular.
- 15
2. Uso según la reivindicación 1, donde el recubrimiento está depositado sobre ambas caras del sustrato.
3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde el recubrimiento es  
20 una lámina delgada de óxido de tantalio de espesor de entre 25 nm y 200 nm.
4. Uso según la reivindicación 3, donde la lámina delgada de óxido de tantalio tiene un espesor de entre 75 nm y 125 nm.
- 25
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el soporte transparente a la luz visible se selecciona de entre un vidrio, cuarzo, una composición polimérica y un copolímero.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el cubreobjetos, el  
30 portamuestras o el recipiente de cultivo celular se utilizan en microscopía óptica.
7. Uso según la reivindicación 6, donde el cubreobjetos, el portamuestras o el recipiente de cultivo celular refleja la luz del sistema de autoenfoco de un microscopio óptico y donde dicha luz del sistema de autoenfoco incide sobre la  
35 superficie de dicho cubreobjetos, dicho portamuestras o dicho recipiente de cultivo celular, por la cara que comprende el recubrimiento.

8. Material que comprende un recubrimiento formado por una lámina delgada de óxido de tantalio de espesor de entre 25 nm y 200 nm y un sustrato transparente a la luz visible, donde el recubrimiento está depositado sobre al menos una de las caras de dicho sustrato.
- 5
9. Material según la reivindicación 8, donde el recubrimiento está depositado sobre ambas caras de dicho sustrato.
- 10
10. Material según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, donde la lámina delgada de óxido de tantalio tiene un espesor de entre 75 nm y 125 nm.

FIG. 1

FIG.1a

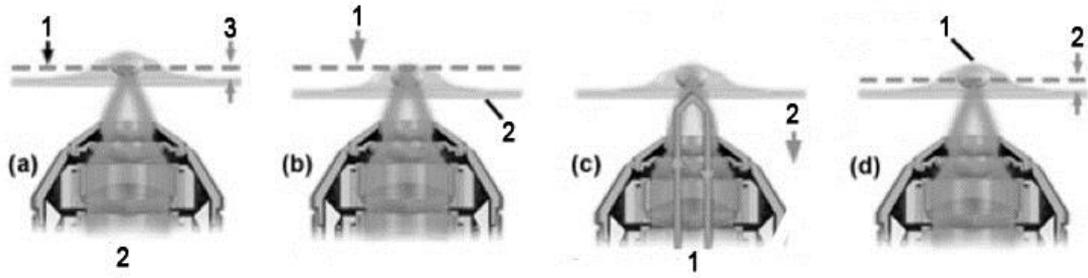


FIG. 1b

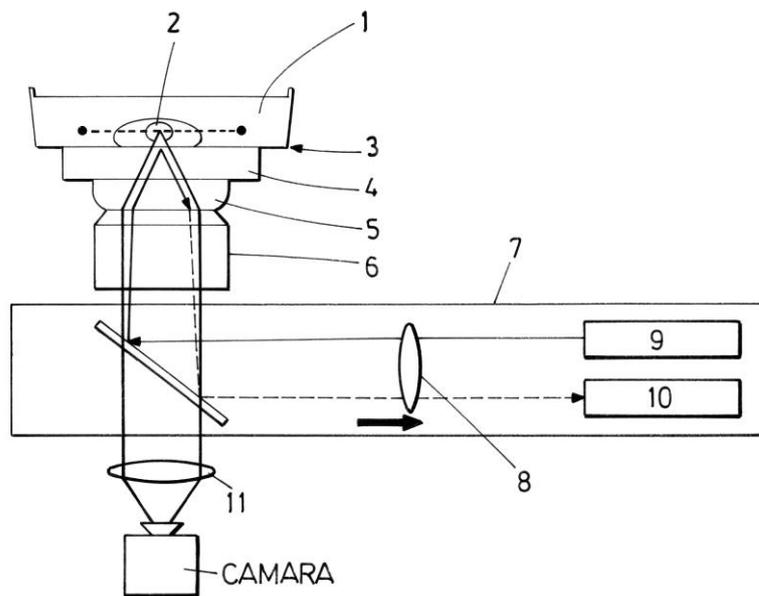


FIG. 2

FIG. 2a

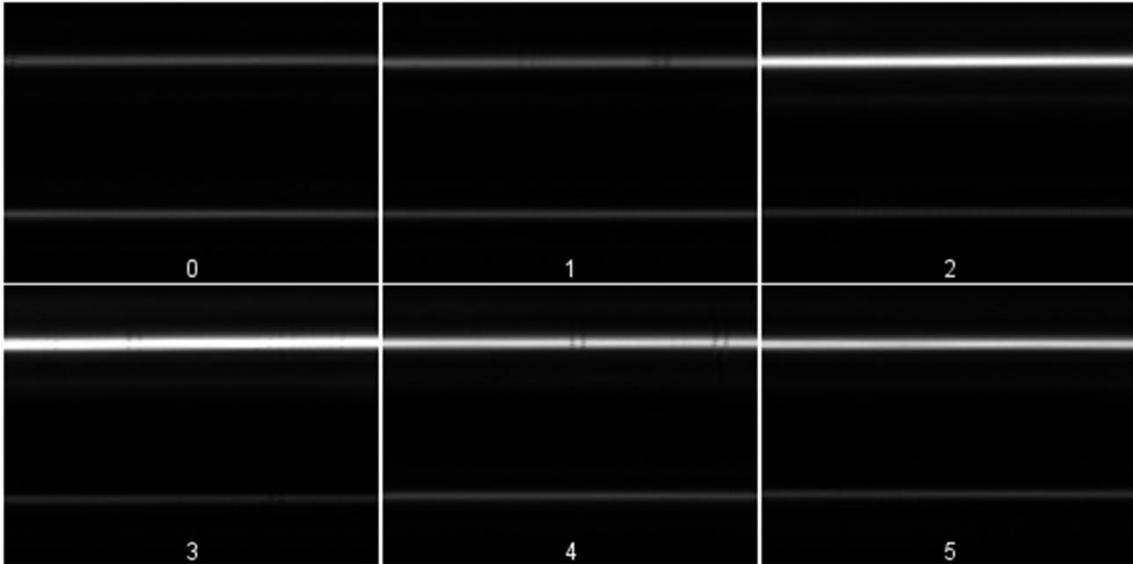


FIG. 2b

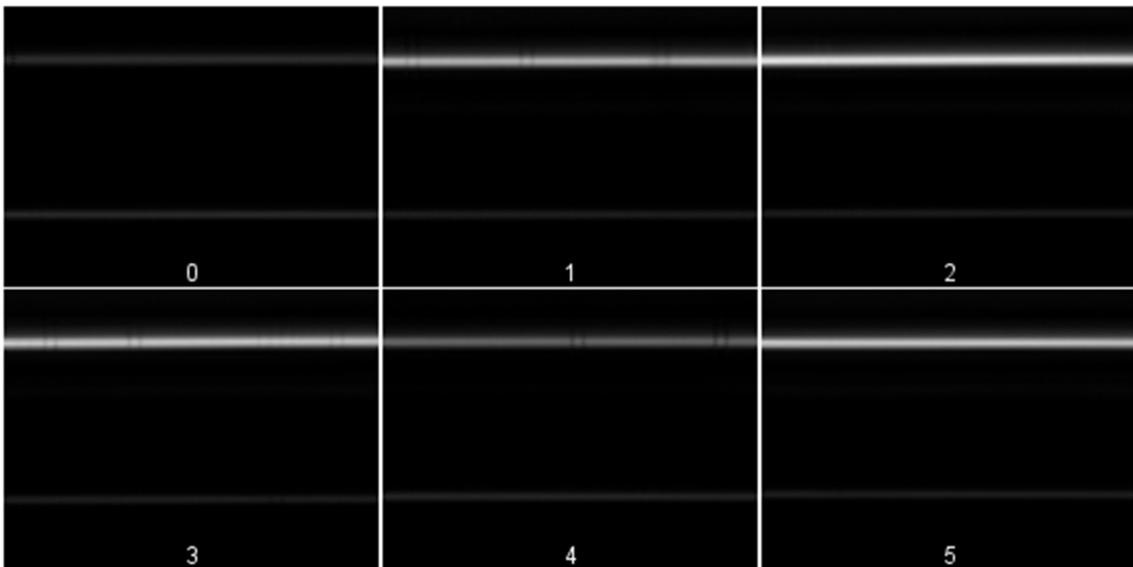
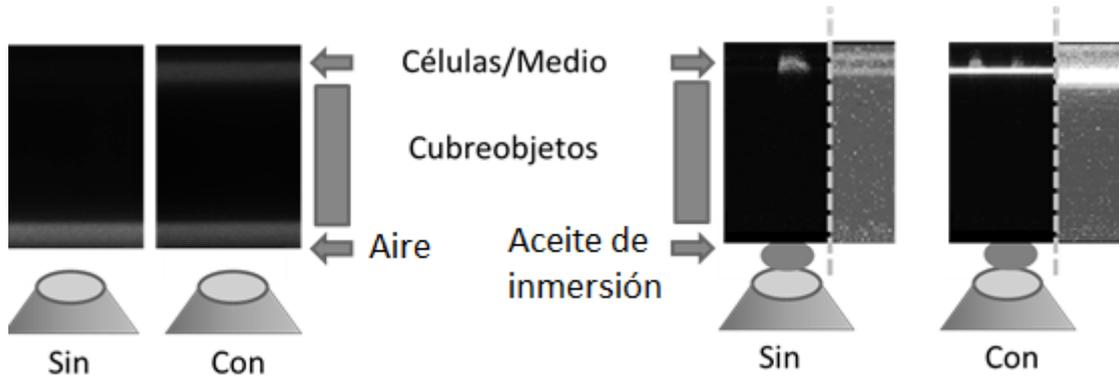
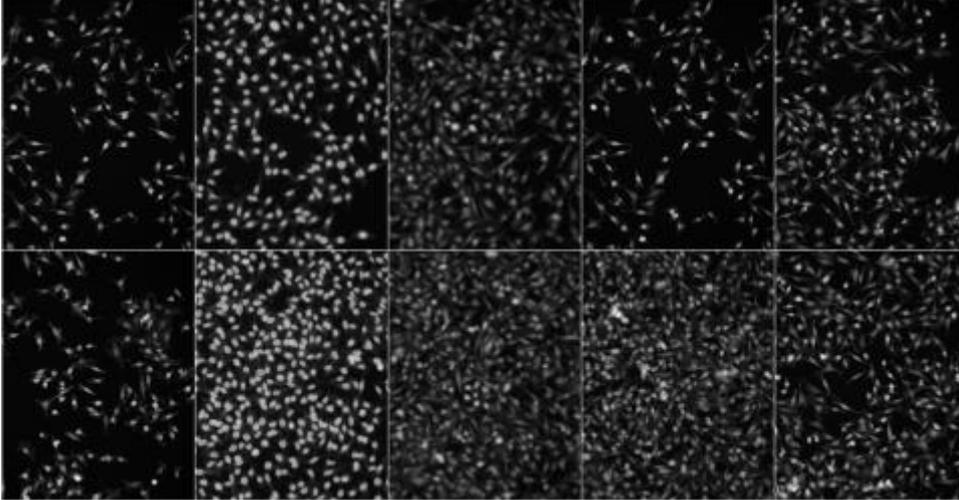


FIG. 3



**FIG. 4**

Sin Recubrimiento



Con Recubrimiento

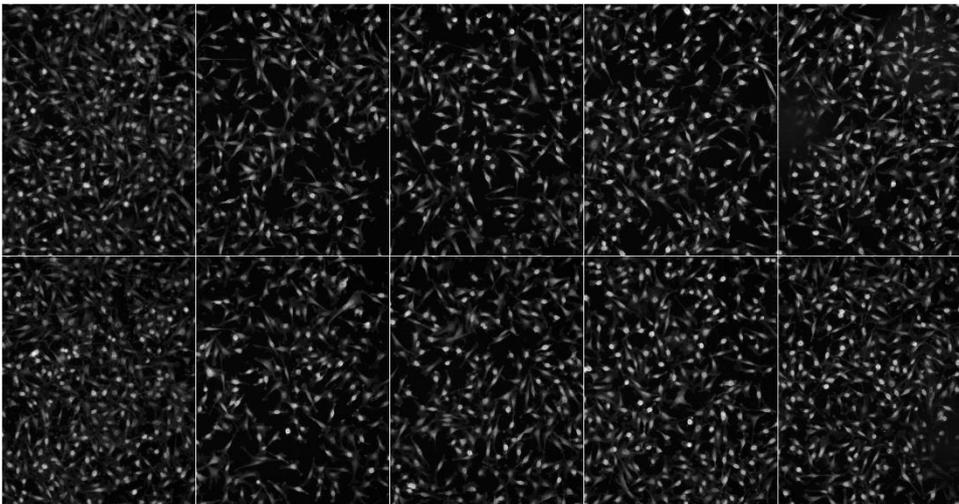


FIG. 5.

